

# RELAZIONE FINALE DEL PRIMO ANNO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE (XXVII CICLO) – ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Dr Pittarella Pamela

Docente guida: Prof. Filippo Renò

Titolo del progetto: Ruolo del recettore ErbB4 nella biologia del neuroblastoma

La famiglia dell' EGF (epidermal growth factor) comprende numerosi fattori di crescita che controllano diverse risposte cellulari, come proliferazione e apoptosi. A questa famiglia appartengono proteine quali il TGF- $\alpha$  (transforming growth factor), il fattore di crescita EGF-simile legante l'eparina (*HB-EGF*), l' anfiregulina, la betacellulina e l'epiregulina, l' ultimo fattore scoperto e purificato dal terreno condizionato della linea cellulare tumorale derivata da fibroblasti NIH3T3/clone T7. Queste proteine agiscono attraverso una famiglia di recettori tirosina chinasi denominati ErbB o HER, composta da 4 recettori correlati strutturalmente (EGFR/HER-1, ErbB-2/HER-2, ErbB-3/HER-3, ErbB-4/HER-4). Questi recettori presentano un dominio extracellulare ricco di cisteine, un singolo dominio transmembrana, e una porzione citoplasmatica composta da un dominio con attività enzimatica tirosin-chinasica e residui tirosinici che vengono fosforilati in seguito all'attivazione del recettore. Il legame del ligando induce la dimerizzazione dei recettori con conseguente attivazione del dominio catalitico tirosin chinasi e successiva transfosforilazione di multipli residui tirosinici nel dominio citoplasmatico. I residui fosforilati reclutano proteine segnale contenenti domini di legame alla fosfotirosina (PTB, phosphotyrosine binding) coinvolte nella regolazione delle risposte intracellulari (Wong et al. 2004, Draper et al. 2003, Richards et al. 2010).

I recettori ErbB sono espressi in una varietà di tessuti di origine epiteliale e mesenchimale, e ricoprono un ruolo fondamentale nello sviluppo, proliferazione e differenziazione cellulare. Inoltre, essi sono overespressi in molti tumori, dove agiscono regolando sopravvivenza, crescita e differenziazione cellulare, e la loro espressione è correlata a progressione tumorale e scarsa sopravvivenza e risposta alle terapie (Ho et al. 2005, Richards et al. 2010).

Fra i tumori del sistema nervoso il neuroblastoma (NB) è uno dei più frequenti tumori solidi extracranici indifferenziati dell'infanzia, ed origina dalle cellule neuroepiteliali della cresta neurale. Questo tipo di tumore è caratterizzato da prognosi infausta e richiede generalmente un approccio terapeutico aggressivo con una percentuale di successo pari a circa il 50% , rappresentando pertanto una delle più grandi sfide dell'oncologia pediatrica.

Ad oggi il ruolo dei recettori ErbB nella biologia del NB non è stato ancora determinato, anche se è risaputo che una delle caratteristiche dei tumori è la loro dipendenza dai fattori di crescita (Ho et al. 2005, Richards et al. 2010).

Diversi studi sottolineano l'importanza del ruolo dell' EGF nella modulazione del comportamento delle cellule di neuroblastoma. L' epiregulina (Epi) è l'unico membro della famiglia dell' EGF in grado di legare tutte le possibili combinazioni naturali dei recettori ErbB, attivando sia gli omodimeri HER-1 ed HER-4, che tutti i possibili eterodimeri di ErbB, anche se nessuno di tali recettori la lega con alta affinità. Ciononostante, il suo legame alle diverse combinazioni di ErbB trasduce un segnale mitogenico più potente di quello mediato da EGF da solo nei cheratinociti (Shelly et al. 1998).

Visto che le cellule di neuroblastoma originano dalla linea neuroepiteliale, ed è risaputo che sia EGF che TGF $\alpha$  ne stimolano la proliferazione, abbiamo ritenuto interessante studiare gli effetti, ancora sconosciuti, dell' epiregulina, sulla proliferazione e sul comportamento di una linea cellulare di NB, le SK-N-BE.

Inaspettatamente, è stata osservata una riduzione dose-dipendente indotta da Epi della proliferazione delle SK-N-BE, accompagnata da una differenziazione morfologica.

La proliferazione cellulare è stata valutata attraverso un saggio fluorimetrico che determina il numero di cellule in base alla loro attività metabolica; come risultato, dopo 72 ore di incubazione, si è osservato come l' epiregulina determini una riduzione dose-dipendente della crescita cellulare; riduzione che è risultata essere statisticamente significativa.

L' epiregulina ha anche indotto un differenziamento morfologico dose e tempo-dipendente delle cellule di neuroblastoma verso un fenotipo neuronale, caratterizzato da un incremento degli sprouting assionali in termini sia di numerosità che di lunghezza.

Inoltre, come visto tramite zimografia, la stimolazione con Epi incrementa l'espressione ed il rilascio di metalloproteasi-9 (MMP-9), un marker di differenziamento di queste cellule (Chambaut-Guèrin et al. 2000). Il differenziamento verso il fenotipo neuronale implica un riarrangiamento delle proteine citoscheletriche, accompagnato da un rimodellamento della matrice extracellulare, come confermato dall'incremento di MMP-9, enzima coinvolto nel processo di crescita neuritica, nella migrazione cellulare e organizzazione delle cellule in gruppi ganglionari.

Visto che l' Epi è un membro della famiglia dell' EGF ed agisce tramite attivazione dei recettori ErbB, abbiamo eseguito uno studio di inibizione per le diverse vie di segnalazione cellulare poste a valle di ErbB, valutandone gli effetti a livello morfologico. L'inibizione della fosfatidil inositolo-3-chinasi (PI3K), sia tramite wortmannina (Wrt) che LY294002, così come l'inibizione dell'adenilato ciclasi e della proteina chinasi C (PKC), effettuata usando rispettivamente SQ22536 o H7, non hanno mostrato effetti morfologici apprezzabili sul differenziamento neuronale indotto dall' epiregulina. Al contrario, invece, l'inibizione delle MAPK ERK1/2, sia attraverso U0126 che PD98059, ha provocato una riduzione del differenziamento neuronale delle SK-N-BE indotto da Epi, suggerendo quindi un possibile coinvolgimento di tali enzimi nei fenomeni osservati. Al fine di confermare tale ipotesi, è stata valutata, tramite western blot, la cinetica di attivazione di ERK1/2 a seguito di trattamento con Epi: l'espressione totale di ERK1/2 non è risultata alterata, mentre il trattamento con Epi ha indotto la massima fosforilazione di ERK1/2 dopo un'ora di trattamento; tale effetto è risultato inoltre essere dose-dipendente.

Il coinvolgimento di ERK1/2 nel differenziamento neuronale delle SK-N-BE è stato ulteriormente confermato, tramite zimografia, dalla diminuzione dell'espressione della MMP-9 indotta da Epi, in presenza degli inibitori di ERK1/2. Infatti, il pretrattamento delle cellule con U0126 (10  $\mu$ M), un inibitore di ERK1 e 2, inibisce completamente l'espressione di MMP-9 nelle cellule trattate con Epi, mentre il pretrattamento con PD98059 (5  $\mu$ M), un inibitore di ERK1, la riduce solamente. Come atteso, la fosforilazione di ERK1/2 indotta da Epi è stata completamente inibita da U0126, mentre il trattamento con PD98059 l'ha ridotta solo parzialmente.

Lo step successivo di questo progetto sarà uno studio più dettagliato dell'espressione e dell'attivazione dei recettori ErbB nelle cellule SK-N-BE, volto alla comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nel differenziamento indotto da Epi, nonché lo studio degli effetti di questo fattore di crescita anche su altre linee cellulari di neuroblastoma umano. Inoltre, ci stiamo occupando della creazione di microparticelle di PLGA (copoly lactic

acid/glycolic acid) caricate con epiregulina, da utilizzare come veicolo per il delivery del fattore di crescita nelle cellule in coltura, che potrebbe rappresentare un nuovo e utile strumento per contrastare la proliferazione delle cellule di neuroblastoma.

## **Bibliografia:**

Chambaut-Guérin A. M., Hérigault S., Rouet-Benzineb P., Rouher C. and Lafuma C. (2000) Induction of matrix metalloproteinase MMP-9 (92 kDa gelatinase) by retinoic acid in human neuroblastoma SKNBE cells: relevance to neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 74, 508-517.

Chiu B., Mirkin B. and Madonna M. B. (2007) Epidermal growth factor can induce apoptosis in neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* 42, 482-488.

Draper BK, Komurasaki T, Davidson MK, Nanney LB. (2003) Epiregulin is more potent than EGF or TGF $\alpha$  in promoting in vitro wound closure due to enhanced ERK/MAPK activation. *J Cell Biochem.* 89, 1126-37.

Ho R., Minturn J. E., Hishiki T., Zhao H., Wang Q., Cnaan A., Maris J., Evans A. E. and Brodeur G.M. (2005) Proliferation of Human Neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 65, 9868-9875.

Komurasaki T., Toyoda H., Uchida D. and Morimoto S. (2006) Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Oncogene* 15, 2841-2848.

Richards K. N., Zweidler-McKay P. A., Van Roy N., Speleman F., Treviño J., Zage P. E. and Hughes D. P. M. (2010) Signaling of ERBB receptor tyrosine kinases promote neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Cancer* 116, 3233-3243.

Shelly M., Pinkas-Kramarski R., Guarino B. C., Waterman H., Wang L. M., Lyass L., Alimandi M., Kuo A., Bacus S. S., Pierce J. H., Andrews G. C. and Yarden Y. (1998) Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 273, 10496-10505.

Wong R W. C. and Guillaud L. (2004) The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 147–156.

## **Seminari e corsi frequentati:**

25 gennaio 2012 Dr. Paolo Fortina *"Next-generation DNA sequencing and target arrays in the clinics"*

22 marzo 2012 Prof. Antonino Neri *"Molecular classification of multiple myeloma"*

23 marzo 2012 Prof.ssa Isabel Merida *"Role of Diacylglycerol kinases in the control of T cell activation and differentiation programs"*

28 marzo 2012 Prof. Costantino Pitzalis *"Developing strategies for tissues specific targeting using peptides and antibodies isolated by in vivo phage display selection"*

29 marzo 2012 Prof. Ingo Nindl *"The role of cutaneous HPV in skin cancer"*

15 maggio 2012 Prof. Mauro Perretti *"Microparticles as novel effectors in Inflammation"*

21 maggio 2012 - 1 giugno 2012 Prof. Steven Ellis *"Genetics and molecular medicine"* (corso)

31 maggio 2012 Prof. Pier Paolo Piccaluga *"Peripheral T-cell lymphoma: from biology to clinical management"*

23 maggio 2012 Prof. Andrea Danani *"Numerical simulations as virtual microscope at the nanoscale: some examples with dendritic molecules"*

10 luglio 2012 Dr. Kim De Keersmaecker *"Next generation sequencing in T-ALL"*

13 luglio 2012 Prof. Sjaak Philipsen *"Molecular control of human fetal globin expression: towards a potential cure for  $\beta$ -thalassemia and sickle cell anemia"*

## **Risultati presentati a convegni e congressi nazionali durante il primo anno del dottorato di ricerca:**

M. Rizzi, F. Carniato, **P. Pittarella**, L. Marchese and F. Renò *"Flow cytometry evidence of human granulocyte interactions with polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS)"*  
XI National Congress of Biotechnology, Varese, 27th-29th June 2012

**P. Pittarella**, M. Rizzi and F. Renò *"Epiregulin induced human neuroblastoma cells differentiation through ERK1/2 signaling pathway"* 66° Congresso Nazionale S.I.A.I.  
Società Italiana di Anatomia e Istologia, Pistoia, 20 - 23 Settembre 2012

M. Rizzi, **P. Pittarella**, D. Campoccia, I. Cangini, L. Montanaro, C. R. Arciola, F. A. Manzoli and F. Renò *"Vitamin E modifies poly(D,L)lactic acid wettability and reduces bacterial adhesion"* 66° Congresso Nazionale S.I.A.I. Società Italiana di Anatomia e Istologia, Pistoia, 20 - 23 Settembre 2012