



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI.

INDIRIZZO: METODOLOGIA CLINICA E SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE
CICLO XXII

**VALUTAZIONE DI NUOVI *TARGET* TERAPEUTICI IN
TUMORI DEL SURRENE E RUOLO DI *SONIC*
HEDGEHOG NELLA BIOLOGIA DELLA GHIANDOLA
SURRENALICA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Supervisore: Ch.mo Prof. Franco Mantero

Dottorando: Isabella Finco

1. Indice

1. Indice	1
2. Abstract	4
3. Riassunto	8
4. Introduzione	12
4.1 Sviluppo della corteccia surrenalica	13
4.2 Tumori del surrene	14
4.3 Somatostatina	15
4.4 Recettori della somatostatina	17
4.5 Analoghi sintetici della somatostatina	21
4.5.1 Octreotide.....	21
4.5.2 SOM230.....	22
4.6 Angiogenesi	23
4.6.1 Angiogenesi: cenni storici	24
4.6.2 Angiogenesi: meccanismi	25
4.6.3 Angiogenesi tumorale	27
4.7 La famiglia VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	29
4.7.1 VEGF-A	30
4.7.2 VEGF-B	31
4.7.3 VEGF-C.....	31
4.7.4 VEGF-D.....	32
4.7.5 PlGF.....	33
4.7.4 VEGF-E.....	33
4.8 Recettori di VEGF	33
4.8.1 VEGFR1.....	34
4.8.2 VEGFR2.....	35
4.8.3 VEGFR3.....	36
4.9 Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF)	37
5. Scopo dello studio	39
6. Materiali e metodi	40
6.1 Soggetti	40
6.2 Colture cellulari	40
6.3 Allestimento di colture primarie	41
6.4 Estrazione di RNA e trascrizione inversa	41

6.5	Analisi dell'espressione genica mediante <i>Real Time</i> PCR quantitativa	42
6.7	Analisi immunohistochimica (IHC)	43
6.6	Studi di proliferazione cellulare	43
6.6	Studi di secrezione del cortisolo	44
6.7	Studi di secrezione dell'aldosterone	45
6.8	Effetto di SOM230 sull'espressione di fattori angiogenetici nella linea H295R	45
6.9	Analisi statistica	46
7.	Risultati	47
7.1	Caratterizzazione dell'espressione dei recettori SST in tumori del surrene	47
7.1.1	Espressione dei recettori SST nelle cellule H295R	47
7.1.2	Espressione dei recettori SST nei tessuti surrenalici normali	47
7.1.3	Espressione dei recettori SST nei tessuti surrenalici tumorali	47
7.2	Analisi immunohistochimica	49
7.3	Gli analoghi della somatostatina non influenzano la proliferazione cellulare	50
7.4	Effetto di SOM230 sulla secrezione di ormoni steroidei	52
7.4.1	Effetto di SOM230 sulla secrezione di cortisolo nelle cellule H295R	52
7.4.2	Effetto di SOM230 sulla secrezione di aldosterone nelle cellule H295R	53
7.4.3	Effetto di SOM230 sulla secrezione di cortisolo in colture primarie di ACC	54
7.4.4	Effetto di SOM230 sulla secrezione di aldosterone in colture primarie di APA	55
7.4.5	Confronto tra espressione dei recettori SST nei tessuti e risposta ex vivo a SOM230	55
7.5	Analisi del profilo d'espressione di VEGF, EG-VEGF e dei loro recettori nei tessuti surrenalici normali e tumorali	55
7.5.1	Espressione di VEGF e EG-VEGF nelle cellule H295R	55
7.5.2	Espressione di VEGF, EG-VEGF e dei loro recettori nei tessuti controllo di surrene	55
7.5.3	Espressione dei recettori VEGF, EG-VEGF e dei loro recettori nei tessuti tumorali di surrene	57
7.6	Effetto di SOM230 sull'espressione di fattori angiogenetici in cellule H295R	60
8.	Discussione	62
9.	Introduzione (I)	66
9.1	Sonic Hedgehog	67
9.2	Via di segnalazione di Hedgehog durante l'embriogenesi	67
9.3	Via di segnalazione di Hedgehog nell'omeostasi dei tessuti e nella tumorigenesi	69
9.4	Gradienti morfogeni di Hh e gradienti di attività di Ci/Gli	70
9.5	La via di segnalazione Hh	71

10.Scopo dello studio (I)	73
11.Materiali e metodi (I)	74
11.1 Colture cellulari	74
11.2 Linee murine	74
11.2.1 Gli1CreERT2	75
11.2.2 R26R	76
11.2.3 SmoM2EYFP.....	76
11.2.4 Incroci murini	76
11.2.5 Attivazione della Cre ricombinasi ERT2.....	77
11.3 Caratterizzazione del genotipo delle progenie murine	78
11.4 Analisi istologiche, immunoistochimiche e di immunofluorescenza	78
11.4.1 Colorazione ematossilina-eosina.....	78
11.4.2 Analisi immunoistochimiche.....	79
11.4.3 Immunofluorescenza.....	79
11.4.4 Rivelazione dell'attività β -galattosidasica.....	79
11.5 Estrazione di RNA e trascrizione inversa	80
11.6 Real Time PCR quantitativa (qPCR)	80
12.Risultati (I)	83
12.1 Espressione di mRNA dei geni della via di segnalazione di Hh in surrene	83
12.2 Espressione <i>in vivo</i> dei componenti della via di segnalazione Hh	84
12.3 Determinazione <i>in vivo</i> dell'espressione di Gli1	85
12.3 Studio dell'overespressione del gene Smoothened (Smo)	87
12.3.1 Overespressione di Smo nell'embrione di topo.....	88
12.3.2 Overespressione di Smo nel topo adulto.....	89
12.4 Analisi molecolare dell'espressione dei geni coinvolti nella via di segnalazione di Shh nei topi adulti	92
12.4 Analisi dell'espressione dei geni della famiglia Wnt	94
13.Discussione (I)	96
14.Bibliografia	99

2. Abstract

Introduction: Benign adrenal tumors are relatively common with occurrences of 3-7% of the population. Malignant adrenal tumors or adrenocortical carcinomas (ACC) are relatively rare but highly malignant and presents with extremely poor prognosis.

Somatostatin (SST) is a widely distributed polypeptide that modulates endocrine and exocrine secretion, cell proliferation and apoptosis via five somatostatin receptors (SSTR1-5). Somatostatin's inhibitory effects on tumor growth may be the result of it suppressing the synthesis and/or secretion of growth factors and growth-promoting hormones. Octreotide and SOM230 are multi-ligand SST analogues with high affinity for SSTRs. In human adrenal gland the expression of SSTRs was previously demonstrated by immunohistochemistry, but only very few information are available about the effectiveness of somatostatin analogs in ACC.

Previous evidence showed that a SSTR1 selective agonist inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR2) expression. Moreover, a new steroidogenic tissue specific angiogenic factor (EG-VEGF) has been described and its role in adrenal tumors is currently unknown. The ability of certain tumors to escape anti-angiogenic strategies might be due, at least in part, to the expression of organ specific angiogenic molecules, like EG-VEGF.

Aim of the study: In the literature, very little information is available on the effect of somatostatin analogs on adrenal tumors, aim of this study is to analyze the expression of SSTRs and angiogenic factors in adrenocortical tumors, and to observe the effect of a somatostatin analog (SOM230) on hormone secretion, cell viability and angiogenesis in adrenal cells.

Material, Subjects and Methods: SSTR and angiogenic factor expression was analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR) in 13 adrenocortical carcinomas (ACC), 24 aldosterone-producing adenomas (APA), 11 cortisol-producing adenomas (CPA) and 7 normal adrenals (NA), and verified by immunohistochemistry for 4 SSTRs in 14 samples. The effect of SOM230 on cortisol or aldosterone secretion in H295R and primary cell cultures was determined by RIA whereas the effect on cell viability in H295R by MTT test. VEGF and EG-VEGF mRNA levels after SOM230 treatment in H295R were detected by qPCR.

Results: SSTR1 and SSTR2 mRNA was expressed in 100% of adrenal tumors. ACC exhibited an increase in almost all SSTRs whereas only some APA over-expressed SSTR3 and SSTR1 compared to NA. CPA expressed SSTR similar to NA. IHC confirmed the mRNA

expression data. Furthermore SOM230 at nanomolar concentrations inhibited hormone secretion in primary adrenal cultures and H295R cells but, as we found for the treatment with octreotide, no effect on cell viability was evident.

VEGF, VEGFR1, VEGFR2 and EG-VEGF mRNA was highly expressed in all our tissues; PROKR1 mRNA levels were low, moreover we found its presence in 72,7% ACC and CPA and in 90% APA. 64% of ACC had VEGF and EG-VEGF overexpressed, whether APA had a marked overexpression of VEGF and VEGFR1. The CPA's expression pattern was similar to NA.

SOM230 also inhibits VEGF and EG-VEGF mRNA expression at concentrations of 10^{-6} M and 10^{-8} M in H295R cells.

Conclusions: The findings of SSTR over-expression (particularly in ACC) and the hormone secretion inhibition by SOM230 suggest a potential therapeutic role for this broad-spectrum somatostatin analog in adrenal tumors. This idea is also supported by the angiogenic factor overexpression found in ACC and APA and by the inhibitory effects on two of them exhibited by SOM230 .

Background (I): Development of the mammalian adrenal gland is regulated by a diverse network of growth and transcription factors. The adrenal cortex is a critical steroidogenic endocrine tissue, generated at least in part from the coelomic epithelium of the urogenital ridge. Neither the intercellular signals that regulate cortical development and maintenance nor the lineage relationships within the adrenal are well defined.

Sonic Hedgehog (Shh) is a ligand of the Hedgehog family (Hh) and its major functions are found in the body patterning, fate specification, cell proliferation and cell survival. Gli1, Gli2, and Gli3 are transcription factors transcriptionally regulated by Smoothened (Smo), an Hh receptor inhibited by Patched in absence of Hh. Moreover, several studies have observed the connection between Shh pathway and Wnt pathway, a pathway very important in the developing adrenal and in the formation of adrenal tumors.

Aim of the study (I): Today very little is known about the Shh role in the adrenal biology. Aim of this study is to characterize the expression of Hh pathway components in the adrenal gland in mouse models, in particular of Gli1 by molecular and histological studies, and to study the phenotype of a mouse model carrying a constitutive active expression of Smo molecularly by qPCR and histologically by immunofluorescence.

Material and Methods (I): qPCR and RT-PCR analysis for the Hh pathway genes were carried out on RNA from murine wild type (wt) adrenals and from Y1 cells; RT-PCRs for Wnt ligands were performed on RNA from transgenic animals and their controls. Adrenals from reporter mice for Shh, Ptch and Gli1 expression were X-gal stained to detect the expression of these genes in the tissues.

The following crossings were also made to localize the Gli1 gene expression in the adrenal tissue. Gli1CreERT2 mice were bred with R26R reporter mice. For the embryological study, pregnant females were IP injected with tamoxifen (100mg/kg) at 13,5dpc. The animals were sacrificed at the following time points: 16,5dpc, 18,5dpc and P1. For studies on adults, Gli1CreERT2-R26R mice, carrying both transgenes in heterozygosis, were injected at P21 with 100mg/kg/die tamoxifen for 14 days, then the tissues were harvested at 9, 25 and 57 weeks of age and stained for X-gal.

To overexpress Smo in Gli1-positive cells, Gli1CreERT2 mice were crossed with SmoM2EYFP mice. Pregnant females were injected with tamoxifen and sacrificed at 16,5dpc or 18,5dpc or tissues were harvested from pups 1day after their birth. Gli1CreERT2-SmoM2EYFP heterozygous mice were injected at P21 with tamoxifen for 14 days. The tissues were harvested at 5, 10 or 28 weeks after birth. The tissues were stained by immunofluorescence.

Results (I):We found the presence of all the Hh pathway genes in wt adrenal, with the exception of Ptch2; Shh is the most expressed ligand of the Hh family in wt adrenal. We found Shh being expressed in the subcapsular region, whereas Ptch1 and Gli1 in the adrenal capsule. Gli1 is expressed both in embryos and in adult mice in the adrenal capsule; we also found Gli1-positive clusters in the cortex.

The Smo overexpression in adults results in a thinner capsular COUPTII positive-cells layer, in an increase of proliferation and in a wider (at 28 week-time point) or stronger (at 10 weeks) β -catenin expression. The results were confirmed by qPCR performed on RNA extracted from controlateral adrenals. To investigate which Wnt ligand could be involved in this process, we determined by RT-PCR for all Wnt ligands that there was a change in the Wnt2a, Wnt4, Wnt5a and -5b, Wnt11 and Wnt15 expression. In embryos we observed an increase of the adrenal size and more proliferating cells.

Conclusion (I): In this study we found the expression of Hh pathways genes in the adrenal, moreover we observed Shh expression in the subcapsula adrenal zone, whereas Ptch and Gli1

expressing cells are identified in the capsule. We also noticed that Gli1-positive cells, organized in clusters, migrate centripetally and become part of the adrenocortex, supporting the idea of the adrenal capsule providing cell progenitors.

Overexpressing Smo in Gli1 expressing cells increased the proliferation and resulted in a thinner capsule, so in the next future we will study which cell population decreased in the capsule. We also noticed an increase of β -catenin expression and/or of β -catenin expressing cells at different time points, thus we analyzed which Wnt ligand is expressed in a different way compared to our controls by RT-PCR, and now we will deepen our analysis by qPCR.

All the obtained results are promising because we identified an important role of the Gli1 expressing cells and, at the same time, a potential relationship between Wnt and Shh pathway in the adrenal development and maintenance.

3. Riassunto

Introduzione: I tumori surrenalici benigni sono relativamente comuni con un'incidenza del 3-7%. Invece i tumori maligni, o carcinomi della corticale del surrene (ACC), sono piuttosto rari ma altamente maligni e presentano una prognosi infausta.

La somatostatina (SST) è un polipeptide ampiamente distribuito che modula la secrezione endocrina ed esocrina, la proliferazione cellulare e l'apoptosi tramite cinque recettori somatostatinici (SSTR1-5). Gli effetti inibitori della somatostatina sulla crescita tumorale possono essere il risultato della soppressione della sintesi e/o del rilascio di fattori di crescita e ormoni promuoventi la crescita. Octreotide e SOM230 sono analoghi multi-ligando di SST con alta affinità per i recettori SST. L'espressione dei recettori SST è stata dimostrata in ghiandole surrenali umane mediante immunistochemica, ma poche sono le informazioni disponibili riguardanti l'efficacia di analoghi della somatostatina in ACC.

Studi precedenti hanno mostrato che un agonista selettivo di SSTR1 inibisce il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e l'espressione del suo recettore (VEGFR2). È stato inoltre descritto un nuovo fattore angiogenico specifico dei tessuti steroidei (EG-VEGF), e il suo ruolo nei tumori surrenalici è attualmente ignoto. La capacità di alcuni tumori di sfuggire alle terapie anti-angiogeniche potrebbe essere dovuta, almeno in parte, all'espressione di molecole angiogeniche organo-specifiche, come EG-VEGF.

Scopo dello studio: In letteratura, pochissime informazioni sono disponibili sull'effetto di analoghi della somatostatina in tumori surrenalici; pertanto scopo di questo studio è quello di analizzare l'espressione di SSTRs e di fattori angiogenici nei tumori cortico-surrenalici, nonché di osservare l'effetto di un analogo della somatostatina (il SOM230) sulla secrezione ormonale, sulla vitalità cellulare e sull'angiogenesi in cellule surrenaliche.

Materiali e Metodi: Tramite real-time PCR quantitativa (qPCR) è stata analizzata l'espressione dei recettori SST e dei fattori angiogenici in 13 carcinomi della corticale del surrene (ACC), in 24 adenomi secernenti aldosterone (APA), in 11 adenomi secernenti cortisolo (CPA) e in 7 ghiandole surrenali normali (NA); successivamente si è verificata l'espressione di 4 SSTR mediante analisi immunistochemica in 14 campioni. L'effetto di SOM230 sulla secrezione di cortisolo o di aldosterone in colture di cellule H295R e in colture primarie è stato determinato mediante RIA, e l'effetto sulla vitalità di cellule H295R con MTT test. I livelli di espressione di VEGF e EG-VEGF dopo trattamento di cellule H295R con SOM230 sono stati studiati mediante qPCR.

Risultati: L'mRNA per SSTR1 e SSTR2 è stato espresso nel 100% dei tumori surrenalici. ACC ha dato un aumento in quasi tutti i SSTR, laddove solo alcuni APA, comparati con NA, overesprimevano SSTR3 e SSTR1. CPA esprimevano SSTR similmente a NA. L'immunoistochimica ha confermato i dati relativi all'espressione di mRNA. Inoltre SOM230 a concentrazioni nanomolari ha inibito la secrezione ormonale in colture primarie e in cellule H295R ma, come per il trattamento con octreotide, non ha sortito alcun effetto sulla vitalità cellulare.

L'mRNA di VEGF, VEGFR1, VEGFR2 e EG-VEGF era altamente espresso in tutti i nostri tessuti; i livelli di PROKR1 erano invece bassi, inoltre abbiamo trovato la presenza di questo gene nel 72,2% di ACC e CPA e nel 90% di APA. Il 64% degli ACC aveva VEGF e EG-VEGF overespressi, mentre gli APA avevano una marcata overespressione di VEGF e VEGFR1. Il *pattern* d'espressione dei CPA era simile a quello dei NA.

SOM230 inibisce anche l'espressione dell'mRNA di VEGF e EG-VEGF alle concentrazioni di 10^{-6} M and 10^{-8} M in cellule H295R.

Conclusioni: Le evidenze della sovraespressione di SSTR (in particolare in ACC) e l'inibizione della secrezione ormonale da parte di SOM230 suggerisce un potenziale ruolo terapeutico per questo analogo ad ampio spettro della somatostatina nei tumori surrenalici. Questa idea è supportata anche dall'overespressione dei fattori angiogenici trovata in ACC e APA e dagli effetti inibitori esercitati da SOM230 su due di essi.

Introduzione (I): Lo sviluppo del surrene nel mammifero è regolato da una complessa rete di fattori di crescita e di trascrizione. La corteccia surrenalica è un tessuto endocrinologico steroidogenico critico, generata almeno in parte dall'epitelio celomico della cresta urogenitale. Né i segnali intracellulari che regolano lo sviluppo e il mantenimento della corteccia, né le relazioni tra i diversi *lineage* nel surrene sono ben definiti

Sonic Hedgehog (Shh) è un ligando della famiglia *Hedgehog* (Hh) e le sue maggiori funzioni sono state trovate nel *patterning* degli assi corporei, nella specificazione del fato di una cellula, nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare. Gli1, Gli2 e Gli3 sono fattori di trascrizione regolati trascrizionalmente da *Smoothed* (Smo), un recettore inibito da *Patched* in assenza di Hh. Inoltre, diversi studi hanno osservato la connessione tra la via di segnalazione di Shh e quella di *Wnt*, un *pathway* molto importante nello sviluppo surrenalico e nella formazione di tumori del surrene.

Scopo dello studio (I): Oggi molto poco è conosciuto sul ruolo di Shh nella biologia del surrene. Scopo di questo studio è caratterizzare l'espressione dei componenti della via di segnalazione di Hh, in particolare di Gli1 con analisi molecolari e istologiche, nella ghiandola surrenalica di modelli murini, e di studiare molecolarmente e istologicamente, mediante immunofluorescenza, i fenotipi di un modello murino caratterizzato da un'espressione costitutivamente attiva di Smo.

Materiali e metodi (I): Analisi di qPCR e RT-PCR sono state condotte su RNA estratto da surreni di topi *wild type* (wt) e da cellule Y1; reazioni di RT-PCR per i ligandi Wnt sono state eseguite su RNA proveniente da animali transgenici e dai loro controlli.

Surreni di topi reporter per l'espressione di Shh, Ptch e Gli1 sono stati sottoposti a X-gal *staining* per individuare la loro espressione nei tessuti.

Per localizzare l'espressione del gene Gli1 nel tessuto surrenalico sono stati fatti i seguenti incroci. Topi Gli1CreERT2 sono stati incrociati con topi reporter R26R. Per lo studio embriologico, femmine di topo gravide sono state iniettate intraperitonealmente (IP) con tamoxifen (100mg/kg) nel giorno 13,5dpc. Gli animali sono stati sacrificati ai seguenti *time point*: 16,5dpc, 18,5dpc e P1. Per studi sugli adulti, topi Gli1CreERT2-R26R portanti in eterozigosi entrambi i transgeni, sono stati iniettati con tamoxifen 100mg/kg/die dal ventunesimo giorno di vita (P21) per 14 giorni, sono stati poi raccolti i tessuti a 9, 25 e 57 settimane d'età e sottoposti a X-gal staining.

Per sovraesprimere Smo nelle cellule positive a Gli1, topo Gli1CreERT2 sono stati incrociati con topi SmoM2EYFP. Femmine gravide sono state iniettate IP con tamoxifen e sacrificate a 16,5 o 18,5 dpc, oppure i tessuti sono stati raccolti da cuccioli di topo di un giorno di vita. Topi eterozigoti Gli1CreERT2-SmoM2EYFP sono stati iniettati dal P21 con tamoxifen per 14 giorni. I tessuti sono stati raccolti a 5, 10 o 28 settimane di vita. I tessuti sono stati sottoposti a immunofluorescenza.

Risultati (I): Abbiamo trovato la presenza di tutti i geni coinvolti nella via di segnalazione di Hh nel surrene wt, con l'eccezione di Ptch2; Shh è il ligando della famiglia Hh più espresso nel surrene wt. Abbiamo trovato la sua espressione nella regione sotto-capsulare del surrene, mentre Ptch1 e Gli1 erano nella capsula surrenalica. Gli1 è espresso nella capsula sia negli embrioni che nei topi adulti, inoltre abbiamo osservato gruppi di cellule positivi per Gli1 nella corteccia surrenalica.

La sovraespressione di Smo negli adulti porta ad uno strato di cellule capsulari positive per COUPTFII più sottile, ad un incremento della proliferazione ed a un'espressione di β -catenina più diffusa (a 28 settimane) o più forte (a 10 settimane). I risultati sono stati confermati mediante qPCR svolta su RNA estratto dai surreni controlaterali. Per investigare quale ligando Wnt possa essere coinvolto in questo processo, abbiamo determinato mediante RT-PCR che, rispetto ai nostri controlli, vi era un cambiamento nell'espressione di Wnt2a, Wnt4, Wnt5a e 5b, Wnt11 e Wnt 15. Negli embrioni abbiamo osservato un aumento delle dimensioni del surrene e delle cellule proliferanti.

Conclusioni (I): In questo studio abbiamo trovato l'espressione dei geni coinvolti nella via di segnalazione di Hh nel surrene, inoltre abbiamo osservato che l'espressione di Shh è localizzata nella zona subcapsulare del surrene, mentre quella di Ptch e Gli1 è confinata nella capsula surrenalica. Abbiamo però osservato che cellule Gli1-positive, organizzate in piccoli gruppi, migrano in maniera centripeta e diventano parte della corteccia surrenalica, supportando l'idea che la capsula surrenalica sia la sede di progenitori cellulari.

L'overespressione di Smo nelle cellule esprimenti Gli1 ha aumentato la proliferazione e al contempo è risultata in una capsula più sottile, perciò nel prossimo futuro studieremo quale popolazione cellulare è diminuita nella capsula.

Abbiamo inoltre notato un aumento dell'espressione di β -catenina e/o delle cellule esprimenti β -catenina nei diversi time point, abbiamo quindi analizzato quale ligando Wnt è espresso in maniera diversa rispetto ai nostri controlli mediante RT-PCR, e adesso approfondiremo l'analisi mediante qPCR.

Tutti i risultati ottenuti sono promettenti perché abbiamo individuato un ruolo importante delle cellule esprimenti Gli1 e, allo stesso tempo, una potenziale relazione tra le vie di Wnt e Shh nello sviluppo e nel mantenimento del surrene.

4. Introduzione

Il surrene è un organo pari facente parte dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA, *hypothalamic-pituitary-adrenal*).

Nell'uomo i due surreni appaiono come due ghiandole endocrine cordonali posizionate a livello della vertebra toracica T12 e situate nei pressi dei reni.

L'apporto ematico è garantito da tre distinte arterie soprarenali: la superiore trae origine dall'arteria frenica inferiore, la centrale direttamente dall'aorta e l'inferiore dall'arteria renale.

Il sistema di drenaggio venoso è dato dalla vena centrale: a sinistra essa decorre secondo l'asse longitudinale della ghiandola e va a sboccare nella vena renale, mentre a destra, dopo un breve decorso, si immette direttamente nella vena cava inferiore [1].

Il parenchima surrenalico è diviso in due regioni istologicamente e funzionalmente distinte: una esterna detta corteccia surrenalica, derivata dalle cellule del mesoderma intermedio, ed una interna, più piccola, detta zona midollare, originata dalle cellule della cresta neurale del neuroectoderma.

Nella corteccia è possibile distinguere differenti organizzazioni cellulari:

- la Zona glomerulare (ZG), costituita da cellule parenchimali organizzate in *cluster* circolari intorno a gomitoli di capillari, chiamati glomeruli, e che sintetizzano e secernono ormoni mineralcorticoidi quali, ad esempio, l'aldosterone;
- la Zona fascicolata (ZF), deputata alla sintesi e alla secrezione di glucocorticoidi, una classe di ormoni steroidei, tra cui si annovera il cortisolo, in grado principalmente di agire sul metabolismo glucidico e di ridurre le risposte infiammatorie e immunitarie. Le cellule di questa zona sono organizzate in file disposte radialmente e separate da *trabeculae* e vasi sanguigni ;
- la Zona reticolata (ZR), le cui cellule sono arrangiate in reticoli uniformi di tessuto connettivo e vasi sanguigni, produce ormoni sessuali come androgeni, estrogeni e progesterone.

La midollare del surrene è ricoperta completamente dalla corticale e comprende due popolazioni di cellule parenchimali, le cellule cromaffini e le cellule gangliari simpatiche. Essa è il sito principale di conversione dell'amminoacido tirosina nelle catecolammine adrenalina e noradrenalina. Questi ormoni, sotto condizioni di stress, vengono rilasciati nel sangue e innescano le risposte tipiche del "combatti o fuggi", quali l'aumento della frequenza

cardiaca, il restringimento dei vasi sanguigni, la broncodilatazione e l'accelerazione del metabolismo.

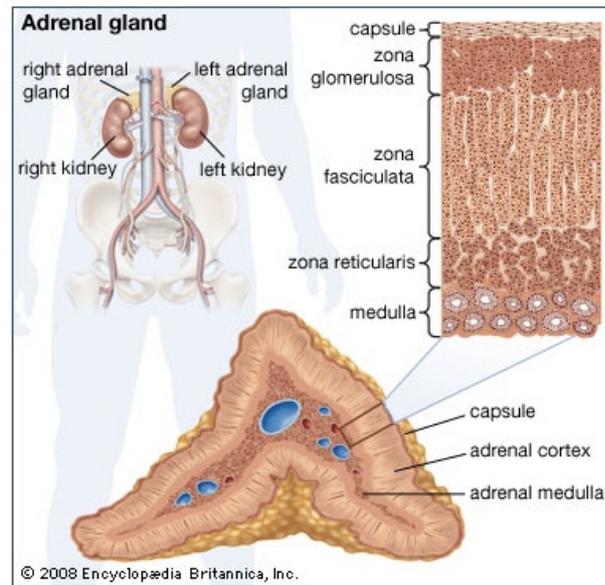


Figura 4.1 Anatomia del surrene. Disegno macroscopico e microscopico del surrene, nel quale è visibile la diversa organizzazione istologica del surrene: capsula, zona glomerulosa, zona fascicolata, zona reticolare e midollare (fonte: Encyclopedi Britannica).

4.1 Sviluppo della corteccia surrenalica

Lo sviluppo della corteccia surrenalica è un processo che può essere suddiviso in tre parti.

Inizialmente vi è la specificazione del primordio surreno-gonadale e del conseguente primordio surrenalico, proliferazione regolata da un programma di espressione genica sequenziale, influenzato da un segnale locale paracrino di molecole di segnalazione e principalmente indipendente da quelli che sono i regolatori endocrini della funzione surrenalica nell'adulto.

La differenziazione funzionale e la zonazione della ghiandola sono guidate dalla stimolazione della corteccia surrenalica da parte di fattori che fungeranno in seguito da segnali endocrini atti a regolare la steroidogenesi (prooppiomelanocortine POMC).

La crescita e il mantenimento dell'organo adulto sono determinati dai bisogni funzionali dell'organismo e sono regolati primariamente da fattori endocrini e paracrini [2].

Sebbene vi siano differenze tra l'organogenesi umana e murina, entrambe le specie condividono una comune origine mesodermica e il programma di sviluppo. In passato si credeva che il precursore surrenalico originasse dalla condensazione di cellule epiteliali

celomiche, ma circa una decina di anni fa è stato visto, durante lo sviluppo della ghiandola surrenalica bovina, come vi sia un importante contributo da parte delle cellule originanti dal mesoderma intermedio, collegando quindi lo sviluppo del tessuto surrenalico di mammifero al suo omologo, le cellule inter-renali nei bassi vertebrati [3].

4.2 Tumori del surrene

Le masse surrenali costituiscono una patologia comune che riguarda il 3-7% della popolazione e i tumori della corticale del surrene rappresentano più dell'80% di queste. Essi possono essere maligni o benigni, funzionali o non funzionali.

I tumori attivi sono invece più rari. L'iperaldosteronismo primario (PA) è il più frequente e nell'80% dei casi è causato da un adenoma secernente aldosterone, mentre i rimanenti casi sono attribuibili o ad un'iperplasia bilaterale (iperaldosteronismo idiopatico) o ad un'iperplasia unilaterale (iperplasia surrenale primaria).

L'ipercortisolismo, a differenza dell'iperaldosteronismo primario, si attesta approssimativamente a un caso ogni 100-500 mila persone. Di questi, il 70% dei casi è causato da un tumore ipofisario secernente corticotropina (morbo di Cushing), il 10% da un tumore ectopico secernente corticotropina e il 20% da lesioni surrenali, che sono più comunemente adenomi surrenalici, ma l'ipercortisolismo surrenalico può condurre a carcinoma surrenalico e ad un'iperplasia bilaterale macro- o micronodulare. Il carcinoma corticosurrenalico (ACC) è una patologia piuttosto rara, con un'incidenza annuale compresa tra lo 0,5 e i 2 casi per milione di persone. I soggetti maggiormente colpiti da ACC sono bambini con meno di 5 anni e gli adulti con un'età tra i 40 e i 50 anni; vi è inoltre una predominanza dei soggetti femminili rispetto ai maschili [4].

Poiché generalmente la diagnosi di cancro del surrene viene effettuata ad uno stadio avanzato della malattia, la sopravvivenza a 5 anni varia tra il 20 e il 45%.

Uno dei maggiori problemi che si riscontrano nel trattamento dei pazienti con carcinoma surrenalico consiste nell'osservazione che questo tipo di neoplasia è scarsamente responsiva a tutti i trattamenti, inclusi sia la chemioterapia citotossica che la radioterapia. La terapia di scelta è sempre, ove possibile, la chirurgia, anche se la malattia è metastatica. Vi è la possibilità di un trattamento di tipo medico soprattutto nel caso ci si trovi di fronte a una malattia inoperabile, e quindi a scopo palliativo. Le terapie mediche consistono nell'utilizzo del mitotane, molecola che inibisce la steroidogenesi e con azione citotossica sulle cellule

corticoadrenali, come terapia adiuvante nel post-chirurgico e nei pazienti operati con residuo tumorale e nell'utilizzo di regimi chemioterapici diversi in pazienti con progressione di malattia già in trattamento con mitotane.

Nonostante alcuni progressi, la comprensione della biologia dei tumori surrenalici è ancora incompleta. Precedenti studi hanno stabilito che la tumorigenesi surrenalica è un processo *multistep* risultante da alterazioni genetiche sequenziali che portano alla progressione da fenotipo normale ad adenomatoso e, eventualmente, maligno [5].

4.3 Somatostatina

La somatostatina (Figura 4.2), altrimenti conosciuta come GHIH (*Growth Hormone Inhibiting Hormone*) o SRIF (*Somatotropin Release-Inhibiting Factor*) è un ormone polipeptidico prodotto dall'ipotalamo e da cellule del sistema APUD (sistema neuroendocrino diffuso, *Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*) che regola il sistema endocrino ed è coinvolto nella neurotrasmissione e nella proliferazione cellulare tramite interazione con recettori della somatostatina accoppiati a proteine G, inoltre può concorrere all'inibizione di numerosi ormoni secondari.

La somatostatina fu dapprima scoperta tramite i suoi effetti, quando nel 1968 Krulich e collaboratori, nel tentativo di isolare il fattore ipotalamico capace di stimolare la secrezione della somatotropina, conosciuta anche come ormone della crescita, isolarono invece un peptide a basso peso molecolare con attività inibitoria [6]. Nel 1969 Hellman e Lernmark individuarono la medesima sostanza a livello delle isole pancreatiche di piccione [7], ma fu nel 1973 quando Roger Guillemin e i suoi collaboratori isolarono e sequenziarono un tetradecapeptide capace di inibire la secrezione della somatotropina, che fu chiamato appunto somatostatina [8, 9].

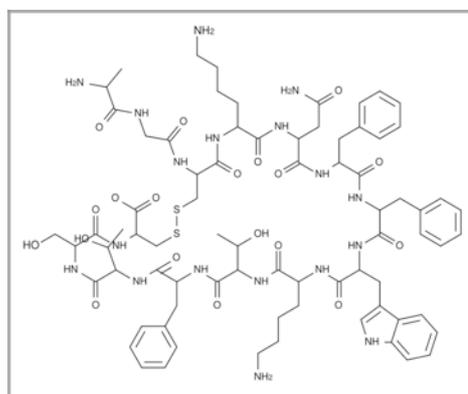


Figura 4.2. Struttura molecolare del peptide somatostatina

La produzione della somatostatina interessa diverse strutture del sistema digerente, quali stomaco, intestino e cellule delta del pancreas, in particolare le cellule δ antrali dello stomaco, dove inibisce le cellule G produttrici di gastrina regolandone la funzione.

Nell'asse ipotalamo-ipofisario questo peptide è prodotto da cellule neuronendocrine del nucleo periventricolare dell'ipotalamo. Questi neuroni protrudono nell'eminenza mediana, nella quale la somatostatina viene rilasciata tramite nervi neurosecretori, i quali terminano nella circolazione portale ipotalamo-ipofisaria, i cui vasi sanguigni trasportano l'ormone peptidico fino alla ghiandola pituitaria anteriore, nella quale la somatostatina inibisce la secrezione dell'ormone della crescita da parte delle cellule somatotrope. Nel nucleo periventricolare i *neuroni somatostatini* mediano gli effetti del *feedback* negativo dell'ormone della crescita sul suo rilascio: essi rispondono all'alta circolazione di ormone della crescita e somatomedine (un ormone la cui produzione è stimolata dalla somatotropina - STH- al fine di promuovere crescita e divisione cellulare) incrementando il rilascio di somatostatina e riducendo così la secrezione di ormone della crescita [10].

A livello d'azione la somatostatina viene classificata come un ormone inibitorio per via delle sue principali azioni, quali appunto l'inibizione, già menzionata, del rilascio di ormone della crescita (GH) che si oppone agli effetti dell'ormone rilasciante l'ormone della crescita (GHRH); l'inibizione del rilascio dell'ormone tiroide-stimolante (TSH); la soppressione del rilascio degli ormoni gastrointestinali gastrina, colecistochinina (CCK), secretine, motilina, peptide intestinale vasoattivo (VIP), polipeptide gastrico inibitorio (GIP) ed enteroglucagone; inoltre riduce le contrazioni muscolari lisce e il flusso sanguigno nell'intestino, sopprime il rilascio degli ormoni pancreatici insulina e glucagone, inibisce l'azione secretoria esocrina del pancreas. Tra le molteplici funzioni della somatostatina vi è anche la partecipazione al bilanciamento idrico per mezzo dei suoi effetti sul sistema renina-angiotensina [11].

Nei mammiferi la somatostatina è codificata da un unico gene, nell'uomo situato nel cromosoma 3 in locazione 3q28, e sintetizzata inizialmente come pre-pro-somatostatina, un precursore lungo 116 amminoacidi e caratterizzato all'estremità N-terminale da un peptide segnale di 24 residui. Il precursore viene poi rapidamente trasformato in un peptide lungo 92 amminoacidi, la pro-somatostatina [12, 13]. Nei mammiferi il pro-ormone viene processato ad entrambe le estremità N-terminale e C-terminale a dare due prodotti biologicamente attivi, la somatostatina-14 (SST-14) e la somatostatina-28 (SST-28) (Figura 4.3). Lungo la sequenza amminoacidica della pre-pro-somatostatina sono presenti tre siti a livello dei quali il

precursore viene clivato mediante alcuni enzimi proteolitici per dare le differenti forme di somatostatina: un sito dibasico (Arg-Lys) e un sito monobasico (Arg) all'estremità C-terminale che generano la somatostatina-14 e -28 rispettivamente, e un sito monobasico (Lys) all'estremità N-terminale che dà origine alla pro-somatostatina [14].

La somatostatina-28 è costituita da 28 amminoacidi, la sua estremità C-terminale contiene la struttura della somatostatina-14, la quale risulta costituita da 14 amminoacidi tra i quali è presente un ponte disolfuro che lega il terzo e il quattordicesimo residuo. In realtà il nucleo attivo, responsabile dell'attività biologica della proteina, è ristretto ai residui 7, 8, 9, 10 (Phe-Trp-Lys-Thr). Le differenti forme molecolari di somatostatina non sono distribuite, nei diversi tessuti, in modo uniforme: la SST-14 predomina nel tessuto nervoso ed è virtualmente l'unica forma presente nella retina, nel sistema nervoso periferico, nel pancreas e nei neuroni presenti a livello dello stomaco; la SST-28 si trova, invece, ad elevate concentrazioni nel cervello, nell'intestino, nel pancreas e nello stomaco [15].

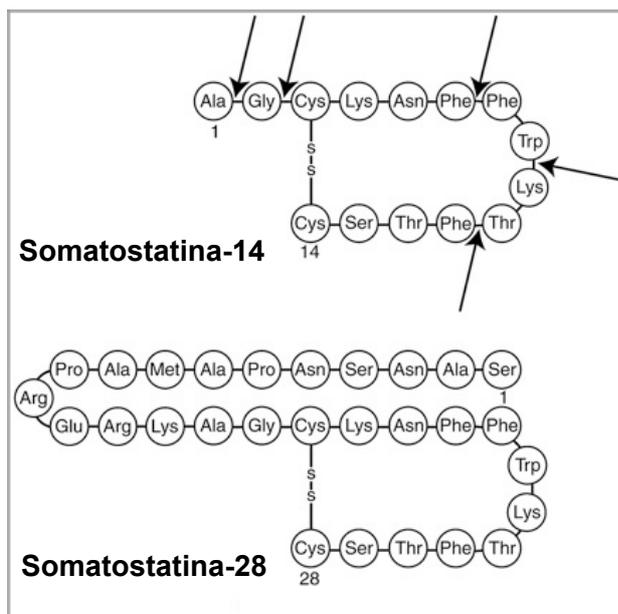


Figura 4.3. Struttura primaria della somatostatina-14 e della somatostatina-28. I siti chiave di degradazione enzimatica nella somatostatina-14 sono indicati con delle frecce nere. Immagine modificata da [16].

4.4 Recettori della somatostatina

Gli effetti biologici della somatostatina nei mammiferi sono mediati da cinque recettori di membrana ad alta affinità, ossia i recettori per la somatostatina SSTR-1, -2 (A e B), -3, -4, -5, identificati e clonati per la prima volta nei primi anni '90 [17-20]. Questi recettori SST sono largamente distribuiti in molti tessuti, dal sistema nervoso centrale al pancreas e all'intestino,

ma anche nell'ipofisi, nei reni, nella tiroide, nei polmoni e nelle cellule del sistema immunitario e le due forme di somatostatina (somatostatina-28 e somatostatina-14) hanno un'affinità quasi equivalente per tutti i sottotipi recettoriali, anche se sembra che la somatostatina-28 sia dotata di un'affinità lievemente maggiore per il recettore SSTR5 [16].

Tutti i sottotipi recettoriali sono codificati da geni separati posti su differenti cromosomi; entrambe le isoforme sst2 a e b derivano invece da un unico gene ma sono frutto di *splicing* alternativo. I geni sst1, sst3, sst4, sst5 non presentano introni nelle loro porzioni codificanti la proteina, ma sono comunque stati ritrovati introni nelle regioni 5' non tradotte dei geni sst2, sst3 e sst5 [21].

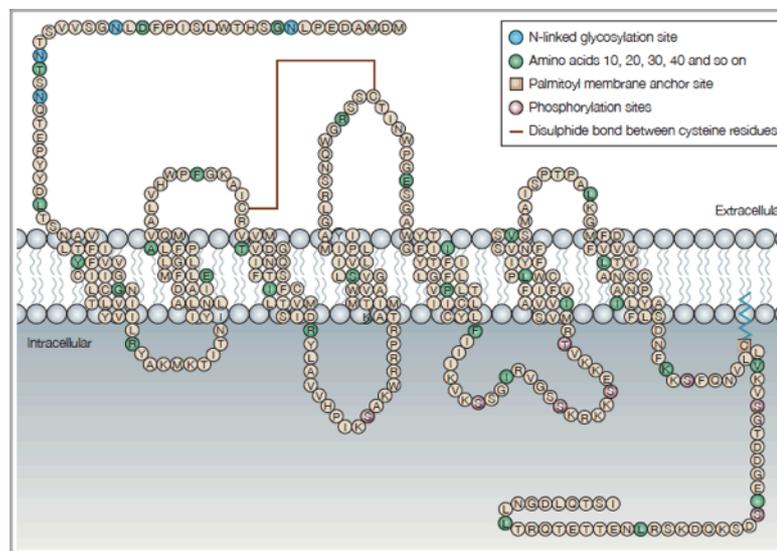


Figura 4.4. Esempio di struttura del recettore SRIF (raffigurato è il recettore SST2A). I potenziali siti di glicosilazione N-linked sono indicati in blu, mentre in rosa quelli di fosforilazione. Sono raffigurati inoltre un legame disulfide e la locazione della potenziale sito di palmitoilazione.

Tutte e sei le varianti recettoriali sono accomunate dalla tipica architettura dei recettori accoppiati a proteine G, incluse sette regioni putative transmembrana, la tripletta aminoacidica altamente conservata Asp-Arg-Tyr (*DRY motif*) nella parte citoplasmatica del terzo dominio transmembrana, un sito di glicosilazione N-linked nel dominio N-terminale e, ad eccezione di sst3, un dominio putativo di palmitoilazione (Figura 4.4). Nei mammiferi, un'altra caratteristica importante è relativa alla settima regione transmembrana, dove vi è una sequenza aminoacidica altamente conservata (Tyr-Ala-Asn-Ser-Cys-Ala-Asn-Pro-Ile/Val-Leu-Tyr) che è considerata tipica dei recettori per la somatostatina di

mammifero. Inoltre tutti questi recettori contengono all'estremità C-terminale la sequenza consenso schematizzabile con (S/T)-X-Φ-Stop, dove X può essere ogni amminoacido e Φ indica un residuo aminoacidico idrofobico. Studi hanno inoltre dimostrato che questa sequenza è un potenziale sito di legame a dominio PDZ, che può essere importante per interazioni tra i recettori somatostatinici e proteine *scaffold* [22].

In base all'omologia di sequenza, i sottotipi recettoriali possono essere suddivisi in due sottogruppi: SRIF 1 e 2. Il gruppo recettoriale SRIF1 comprende i recettori sst2, sst3 e sst5, mentre sst1 e sst4 appartengono al gruppo SRIF2. Questa classificazione è basata su caratteristiche strutturali ed è fortemente supportata dalle loro proprietà farmacologiche. I recettori SRIF1, a differenza di quelli SRIF2, legano prontamente i classici analoghi octo- o esapeptidici octreotide, lanreotide, seglitide e vapreotide.

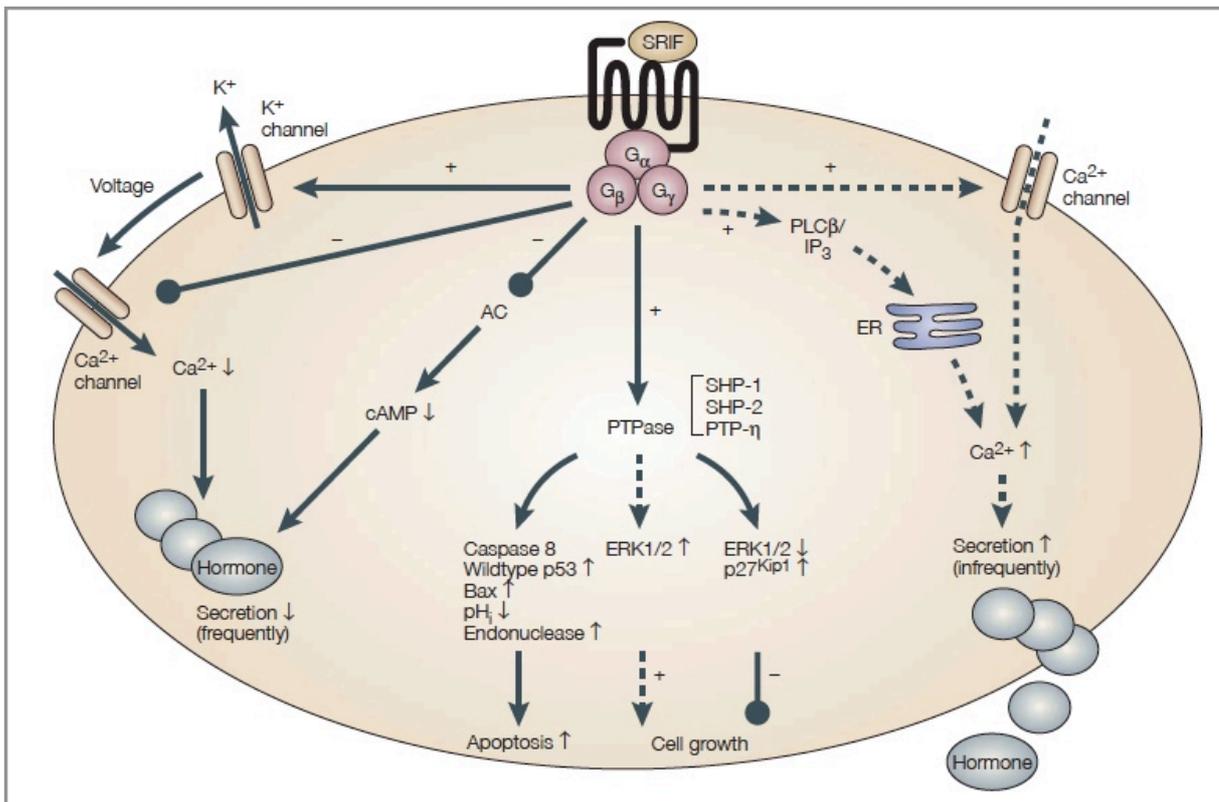


Figura 4.5 Modulazione mediata da recettore SRIF delle cascate di segnale che influiscono nei processi di secrezione ormonale, apoptosi e crescita cellulare. Nella maggioranza delle cellule vi è una diminuzione della secrezione ormonale, ma vi sono anche alcune eccezioni: nelle cellule B i recettori somatostatinici promuovono un aumento della secrezione ormonale. La somatostatina svolge inoltre un ruolo nel controllo della crescita cellulare e nell'apoptosi in maniera dipendente da proteine G, le quali attivano fosfotirosine fosfatasi (PTPasi) che portano alla defosforilazione di proteine trasduttori del segnale. L'inibizione di ERK1/2 indotta da SRIF blocca la degradazione di p27^{kip1}, un inibitore chinasi ciclina-dipendente,

causando l'arresto della crescita. Vi sono però alcuni casi, rari, in cui la somatostatina può stimolare la proliferazione. (AC, adenil ciclasi; ER, reticolo endoplasmatico; ERK, chinasi extracellulare segnale-regolata; G α ,G β , G γ , subunità delle proteine G; PLC, fosfolipasi C; IP3, inositolo trifosfate; pHi, pH intracellulare; PTPase, fosfotirosina fosfatasi)[23].

I recettori SST hanno a livello cellulare diverse funzioni, a volte discordanti tra loro (tabella 4.1; figura 4.5). Essi svolgono un ruolo nel decremento delle secrezioni ormonali, nella promozione dell'apoptosi e nell'inibizione della crescita cellulare. In rari casi essi possono svolgere il ruolo opposto, promuovendo la crescita cellulare e la secrezione ormonale [23]

E' noto, inoltre, che i tumori endocrini esprimono l'mRNA dei diversi SSTR e che ciascun tumore esprime più di un sottotipo recettoriale [24]. È stata vista anche una differente espressione di questi recettori in adenomi surrenalici ed un unico studio ha valutato l'espressione di recettori SST in carcinomi surrenalici mediante analisi immunohistochimiche [25].

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Cromosoma	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3
Espressione	Cervello, ipofisi, pancreas, fegato, reni	Cervello, ipofisi, pancreas, linfociti, VSMC, stomaco, reni	Cervello, ipofisi, cellule T, stomaco	Cervello, Pancreas, stomaco, polmoni, placenta	Cellule linfoidi, ipofisi, pancreas, stomaco
Signalling					
Attività cAMP	↓	↓	↓	↓	↓
Attività fosfotirosina-fosfatasi	↑	↑	↑	↓↑	↑
Attività MAP chinasi	↑	↓↑	↓↑	↑	↓
Attività fosfolipasi C/ IP3	↑	↑	↑	↑	↓
Secrezione					
GH	↓	↓		↓	↓
Adrenocorticotropina		↓			↓
Crescita/morte cell.					
Proliferazione	↓	↑↓	↓	↑↓	↓
Apoptosi		↑	↑		

Tabella 4.1 Schema delle principali caratteristiche dei recettori SST. Le frecce indicano se il recettore è implicato nell'aumento (↑) o nel decremento (↓) del processo indicato, o se entrambe le funzioni possono verificarsi in talune condizioni (↓↑). (Modificata da [23]).

4.5 Analoghi sintetici della somatostatina

Le molteplici azioni della somatostatina ne fanno un candidato per diagnosi e trattamento dei tumori ma, a causa della breve emivita inferiore a 3 minuti, si è reso necessario lo sviluppo di analoghi sintetici dotati di un'attività simile ma di un'emivita più lunga. Questi analoghi, oltre alle proprietà sopracitate, hanno dimostrato di possedere attività antineoplastiche in modelli sperimentali tumorali *in vitro* e *in vivo* [26]. Gli effetti della somatostatina sulla crescita tumorale possono essere il risultato della soppressione della sintesi e/o della secrezione di fattori di crescita e di ormoni promuoventi la crescita. Si ritiene che questi analoghi inibiscano la proliferazione cellulare inducendo l'apoptosi [27].

Sono stati sintetizzati centinaia di analoghi e due di essi, l'octreotide e il lanreotide, sono attualmente in uso clinico. La particolarità di questi analoghi è costituita dal fatto che essi perdono il sito chiave di clivaggio enzimatico e ciò li rende più stabili.

4.5.1 Octreotide

L'octreotide (OCT) è un octopeptide che mima gli effetti della somatostatina, ma, a differenza di essa, è un inibitore più potente di GH, glucagone e insulina. È dotato di una emivita di 90 minuti.

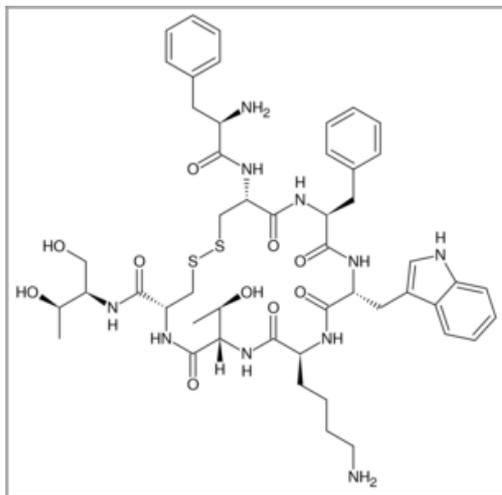


Figura 4.6. Struttura del peptide octreotide.

Nel 1978 Vale pubblicò il primo lavoro riguardante un analogo della somatostatina, un octopeptide con attività biologica pari a quella della somatostatina, derivato da uno scheletro esapeptidico ciclico con due cisteine legate con ponte disolfuro[28]. Successivamente furono apportate modifiche del peptide con l'introduzione di due isomeri D-aminoacidici e L-

treoninolo all'estremità C-terminale, aumentando la stabilità metabolica anche sotto condizioni aggressive, quali alte temperature e succhi gastrici [29]. Questo polipeptide fu chiamato SMA 201-955 o octreotide, mentre fu sviluppato commercialmente dalla Novartis Pharmaceuticals (allora Sandoz) con il nome Sandostatin®. Nel 1988 questo composto ottenne la prima approvazione, da parte della FDA (*Food and Drug Administration*), per il trattamento sintomatico dei tumori gastrointestinali e pancreatici. Nei successivi venti anni, questo analogo della somatostatina è stato impiegato in differenti ambiti clinici, come ad esempio nel trattamento dell'acromegalia.

Precedenti studi [10, 30, 31] hanno dimostrato come l'octreotide si leghi preferenzialmente ai recettori SSTR2 e SSTR5, mentre ha un'affinità più moderata per il recettore SSTR3 e bassa per SSTR1 e SSTR4. Il legame dell'octreotide ai recettori di tipo 2 e 5 inibisce la crescita tumorale e la secrezione ormonale in tumori neuroendocrini, in particolare nell'acromegalia, e, per questo motivo appunto viene usato per il trattamento di queste patologie. Inoltre è stato dimostrato recentemente come esso promuova l'apoptosi in cellule umane di tumore somatotropo attraverso il legame a SSTR2 [32].

Grazie alle moderne tecniche di ingegneria molecolare sono stati scoperti composti peptidici e non peptidici con affinità per più di un recettore o dotati di affinità universale per tutti e cinque i sottotipi. Questi analoghi, come il ligando multiplo SOM230, sono in fase di studio preclinico.

4.5.2 SOM230

SOM230 (o Pasireotide) è un analogo della somatostatina con un'alta affinità di legame per i sottotipi recettoriali SST1, 2 e 3; comparato con octreotide, SOM230 ha un'affinità di legame di 30, 5, e 40 volte maggiore ai recettori SST1, SST3, e SST5 rispettivamente, e di 2,5 volte inferiore a SSTR2 [33]. Inoltre è dotato di un'emivita plasmatica nell'uomo approssimativamente pari a 12 ore, grazie alla sua struttura cicloesapeptidica che lo rende metabolicamente più stabile [34].

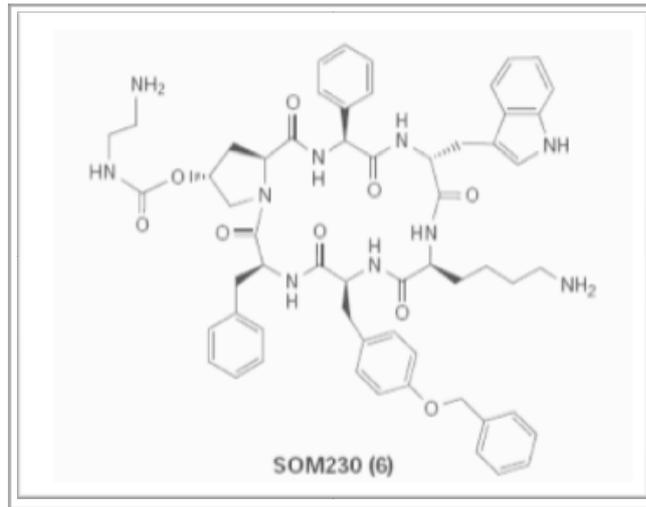


Figura 4.7. Rappresentazione molecolare della SOM230.

In questi anni molti studi hanno mostrato l'efficacia dell'impiego della SOM230 nel trattamento di patologie endocrine in modelli cellulari *in vitro* e animali *in vivo*, in quanto questo farmaco è in grado di sopprimere potentemente la secrezione di GH, IGF-1 e ACTH. Studi preclinici hanno evidenziato anche effetti diretti e indiretti della SOM230 sui meccanismi antitumorali, tra cui l'apoptosi mediata dai recettori SST e l'attività anti-angiogenica [35]. Precedenti lavori hanno inoltre mostrato che un inibitore selettivo per SSTR1 inibisce l'espressione di VEGF e del suo recettore VEGFR2 [36].

L'espressione di questi recettori nei tumori surrenalici, e più in generale nei tumori endocrini, fanno della SOM230 un promettente candidato per la terapia antitumorale surrenalica.

4.6 Angiogenesi

Un passaggio obbligato per lo sviluppo di un fenotipo tumorale è costituito dallo sviluppo di nuovi vasi. La fitta rete ramificata di cellule vascolari endoteliali e di supporto è essenziale per il trasporto di ossigeno, nutrienti e di molecole segnale e per la rimozione di anidride carbonica e di tutti i prodotti metabolici finali da cellule, tessuti ed organi.

La neovascolarizzazione, ovvero la formazione di nuovi vasi sanguigni, è divisa in due componenti: la prima, la *vasculogenesi* embrionale o classica, è un processo di formazione di nuovi vasi sanguigni dagli emangioblasti che si differenziano in cellule del sangue e in cellule endoteliali mature; la seconda, conosciuta come *angiogenesi* (dal greco *angêion*, vaso e *gênesis*, nascita), è il processo di formazione di nuovi vasi da vasi già esistenti attraverso un

processo di “*sprouting*” capillare. Le cellule endoteliali mature, infatti, si dividono e vengono incorporate nei nuovi capillari.

4.6.1 Angiogenesi: cenni storici

Mentre il termine “*angiogenesis*” fu citato per la prima volta nel 1787 dal chirurgo inglese John Hunter per descrivere la crescita dei vasi sanguigni nelle corna della renna, fu solo nel 1935 quando il patologo americano Arthur Tremain Hertig descrisse l’angiogenesi nella placenta delle scimmie incinte. Il concetto di angiogenesi tumorale fu poi introdotto per la prima volta da Moses Judas Folkman [37, 38]. Effettuando esperimenti sulla crescita neoplastica dei tumori in organi isolati, egli ipotizzò che la complessa biologia tumorale implicasse anche il processo angiogenetico. Per la prima volta fu proposto il concetto rivoluzionario che i tumori non crescono oltre una certa misura senza l’ausilio di uno specifico sistema di rifornimento di sangue a loro dedicato e che le neoplasie in fase di accrescimento liberano una sostanza ignota (*tumor angiogenesis factor*) che stimola la formazione di nuovi vasi. La crescita e la trasformazione in formazione maligna di un piccolo gruppo circoscritto di cellule mutate sarebbero dunque promosse dal processo angiogenico. Folkman osservò anche che spesso le metastasi si sviluppano dopo la rimozione del tumore principale, e ciò lo portò a dedurre successivamente che le cellule neoplastiche producono fattori sia inibenti che attivanti l’angiogenesi.

Nel 1975 Folkman e Brem isolarono il primo inibitore angiogenico nella cartilagine [39]; circa otto anni dopo Harold Dvorak e colleghi scoprirono il VPF, *Vascular Permeability Factor*, una sostanza responsabile della permeabilità dei vasi collegati al tumore [40].

Il 1984 è un altro anno importante nella storia dell’angiogenesi: ad Harvard Yuen Shing e Michael Klagsbrun purificarono il primo fattore angiogenico, il *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) [41]. Successivamente si scoprì che la matrice extracellulare è la sede in cui vengono immagazzinate le proteine angiogeniche. La svolta vera e propria avviene nel 1989, in un laboratorio della Genentech Napoleone Ferrara e i suoi colleghi isolarono e clonarono il fattore di crescita endoteliale VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [42, 43]. Fu dimostrata inoltre la capacità da parte di micromasse tumorali silenti di crescere, vascolarizzarsi e divenire metastatiche. Nello stesso anno un medico statunitense, Carl White, utilizzò con efficacia interferone $\alpha 2a$ per trattare un tumore benigno del polmone [44]. Ciò aprì la strada ai primi trial clinici con terapia anti-angiogenica. Nello studio pubblicato da

Keck [45] vi fu la dimostrazione che VPF e VEGF erano in realtà lo stesso fattore, sottolineando come un singolo fattore vascolare può avere funzioni multiple [46].

Nel 1994 Michael O'Reilly identificò l'angiostatina, un inibitore endogeno dell'angiogenesi; tre anni dopo egli isolò un secondo inibitore endogeno dell'angiogenesi, l'endostatina, e successivamente un terzo [47]. Ad Harvard Raghu Kalluri ne trovò ulteriori sette e, ad oggi, sono conosciuti una quindicina di questi composti endogeni [48]. O'Reilly pubblicò inoltre uno studio in cui presenta la completa regressione del tumore usando cicli ripetuti di angiostatina ed endostatina [49]. Gli anni successivi ad oggi sono caratterizzati da un incremento della produzione di farmaci basati sull'angiogenesi e non solo per l'impiego nella terapia anti-tumorale, ma anche nella cura di patologie come psoriasi, coronaropatie e vasculopatie. Inoltre Robert Kerbel e Judah Folkman scoprirono che alcuni chemioterapici tradizionali a bassi dosaggi, se somministrati in modo frequente e continuato, possono inibire l'angiogenesi. Ad oggi sono stati svolti e sono tutt'ora in corso numerosi *trial* clinici con farmaci inibitori dell'angiogenesi, un campo, questo, che si è rivelato essere promettente per il trattamento e la cura di molte patologie.

4.6.2 Angiogenesi: meccanismi

Nello sviluppo embrionale, come già accennato, le diverse cellule endoteliali si formano a partire da quelle staminali che vanno incontro a differenziazione in cellule ematopoietiche (precursori delle ematiche) ed angioblasti (processo di vasculogenesi). Negli individui adulti invece stimoli fisiologici, quali condizioni ischemiche ed ipossiche, in seguito a cicatrizzazioni di ferite e nel ciclo mestruale portano all'angiogenesi, cioè formazioni di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli già esistenti.

Ipossia o ischemia sono fondamentali per la partecipazione e l'attivazione delle cellule endoteliali al processo di angiogenesi, sia fisiologico che patologico. A seguito di questi stimoli vi è la produzione, da parte di cellule tumorali ipossiche, macrofagi e di altre cellule del sistema immunitario, del fattore di crescita endoteliale (VEGF). Fattori endogeni pro-angiogenici sono, oltre al già citato VEGF, FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*), TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), proliferina, PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), interleuchina-8, e HGF-3 (*Hepatocyte Growth Factor 3*). Spesso l'angiogenesi può coinvolgere molti fattori di crescita pro-angiogenici e differenti tra loro (tabella 4.2) [50], ma diversi studi dimostrano come VEGF giochi un ruolo chiave sia nell'angiogenesi fisiologica che nella patologica [51].

Tabella 4.2 Principali fattori pro-angiogenici (colonna di sinistra) e anti-angiogenici (colonna di destra)

Fattori pro-angiogenici	Fattori anti-angiogenici
Angiogenina	Angiostatina
Leptina	Endostatina
Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)	Interferone α e β (IFN)
Fattore di crescita degli epatociti (HGF)	Interleuchina-12
Interleuchina-8	Proteine indotte dall'interferone
Fattore di crescita placentare	Maspina
Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)	Inibitore dell'attivatore del plasminogeno
Pleiotropina	Fattore piastrinico 4
Fattore di crescita trasformante (TGF)	Inibitori tissutale delle metalloproteasi
Fattore di necrosi tumorale α (TNF- α)	Inibitore del fattore di crescita endoteliale
Fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)	Vasostatina
Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)	Trombospondina-1

In generale, la cascata di eventi che interessano il processo angiogenetico è riassunta nella figura 4.8.

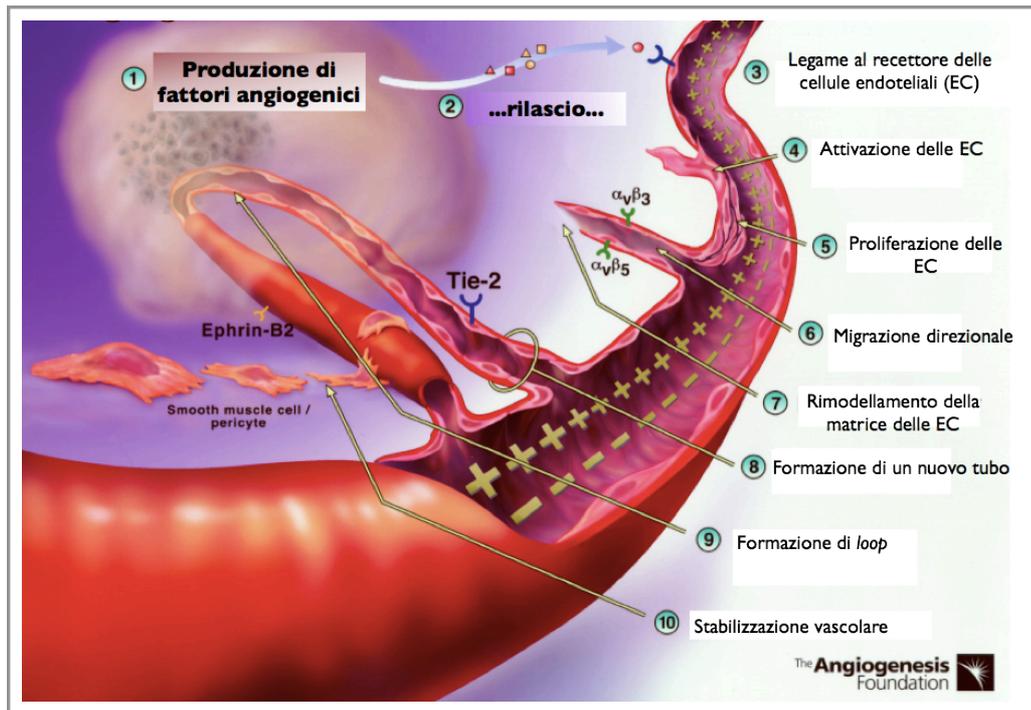


Figura 4.8 Il processo multifasico dell'angiogenesi. In seguito alla produzione e alla secrezione di fattori di crescita angiogenici (1) da parte del tessuto malato o danneggiato, le proteine rilasciate diffondono nei tessuti circostanti (2). Il fattore di crescita angiogenico si lega a specifici recettori situati sulle cellule endoteliali (EC) nei pressi dei vasi sanguigni già esistenti (3). Una volta avvenuto il legame a questi recettori, il segnale raggiunge il nucleo cellulare e le EC vengono attivate, iniziano quindi a produrre nuove molecole, tra le quali vi sono proteasi che iniziano la digestione della membrana basale (4). Le EC cominciano a proliferare e a migrare nella sede di formazione dei nuovi vasi (5). Molecole di adesioni quali le integrine $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 4$, aiutano la creazione dei nuovi germogli vascolari fungendo da "appigli" e permettendo quindi una migrazione direzionale (6). Vengono prodotti ulteriori enzimi, come le metalloproteasi della matrice (MMP), per dissolvere il tessuto presente davanti al vaso nascente per farvi spazio: come il vaso viene esteso, il tessuto è rimodellato (7). Le EC danno quindi luogo alla formazione di un nuovo vaso sanguigno (8) e i singoli vasi si connettono formando *loop* per permettere la circolazione del sangue (9) e dando luogo a una rete di anastomosi. I fattori secreti dalle EC richiamano infine le cellule di supporto, i periciti e le cellule muscolari lisce per costruire la membrana basale e dare supporto al vaso. In questo stadio finale i vasi sviluppano anche le caratteristiche specifiche proprie del tessuto o organo che devono irrorare (modificato da © 2009 The Angiogenesis Foundation).

4.6.3 Angiogenesi tumorale

L'angiogenesi, come già accennato precedentemente, può avere anche implicazioni patologiche. La formazione di nuovi vasi sanguigni si riscontra nei processi infiammatori, durante la riparazione delle ferite, riveste inoltre un ruolo significativo anche in condizioni patologiche quali tumori, malattie infiammatorie croniche (artrite reumatoide, psoriasi, ecc.),

vasculopatie (microangiopatia diabetica) e malattie degenerative (arteriosclerosi e cirrosi) [52-56].

Gli studi di Folkman sull'angiogenesi tumorale [37, 38, 57, 58] all'inizio e i successivi modelli sperimentali in seguito hanno dimostrato la necessità delle cellule tumorali di essere perfuse. Da un modello sperimentale emerge la considerazione che il sistema "cellula-capillare" è un'unità funzionale favorente la crescita neoplastica. Infatti i tumori sperimentali non sono capaci di accrescersi oltre i 2-3 mm³ in assenza di un supporto vascolare tale da permettere la perfusione di ossigeno e glucosio verso le cellule tumorali medesime; il range di distanza affinché una cellula possa essere perfusa è di 100-200 µm. Oltre alla perfusione, anche gli effetti paracrini che le cellule endoteliali esercitano sulle cellule tumorali danno un contributo positivo sulla progressione del tumore, in quanto promuovono il rilascio di fattori di crescita e di alcune citochine che promuovono la proliferazione delle cellule neoplastiche. Si verifica così un fenomeno paracrino bidirezionale, caratterizzato da una stimolazione reciproca delle cellule tumorali e delle cellule endoteliali [59-61].

I vasi sanguigni tumorali non sono normalmente organizzati in venule, arteriole e capillari, ma possiedono le loro caratteristiche tipiche; essi hanno inoltre un'alterata espressione di antigeni sulla superficie cellulare e sono sprovvisti della connessione con le cellule di supporto, il cui numero può essere inferiore o superiore rispetto ai vasi normali. Per tutti questi motivi il flusso ematico tumorale tende ad essere irregolare, più lento e con una disfunzionalità dei capillari. Vi è inoltre un continuo rimodellamento di questi ultimi, una permeabilità capillare variabile e tendente ad aumentare nel corso del tempo, ed associata generalmente ad un aumento della pressione interstiziale [62].

L'apporto nutritivo cellulare che ne consegue non è ottimale, in quanto può esservi ipossia in seguito a un incremento della distanza tra le cellule e i capillari o un'inefficienza dei vasi stessi. L'ipossia sviluppatasi è di elevata importanza poiché contribuisce alla formazione di nuovi vasi inducendo la produzione di VEGF e dei suoi recettori e aumentando l'infiltrazione dei macrofagi. Il tumore diviene metastatico quando riesce a superare diverse barriere, tra cui quelle vascolari, e le cellule tumorali, trasportate nel circolo ematico, raggiungono un letto vascolare distante [63]. Per il successo di questi processi sono importanti molecole di adesione come caderine, selettine e integrine. Successivamente le cellule devono acquisire la capacità di indurre angiogenesi in modo da formare un nuovo tumore, il tumore secondario.

Spesso, all'inizio della formazione di un tumore, vi è una fase avascolare, in cui le neoformazioni rimangono quiescenti e la crescita tumorale rimane stabile per il bilanciamento tra proliferazione ed apoptosi. La vascolatura dell'ospite, cooptata dal tumore, regredisce dando luogo ad una massa tumorale secondaria avascolare e ad un aumento dell'apoptosi che provoca una importante perdita cellulare. Alla fine di tale processo la parte terminale del tumore innesca il processo angiogenico, causando una crescita esponenziale della vascolarizzazione. Questa transizione è definita *switch angiogenico* [64] ed è il risultato di una modificazione dell'equilibrio tra attivatori e inibitori dell'angiogenesi (tabella 4.2).

4.7 La famiglia VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGF-A, spesso chiamato VEGF, è il mediatore dell'angiogenesi più studiato. Esso appartiene alla famiglia di proteine VEGF composta da cinque membri: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (*Placental Growth Factor*). Ognuna di queste proteine contiene una sequenza segnale che viene clivata durante la biosintesi; inoltre, lo *splicing* alternativo del pre-mRNA genera molteplici isoforme di VEGF, VEGF-B e PlGF [65, 66]. Queste proteine giocano un ruolo non solo nell'angiogenesi, ma anche nella vasculogenesi e nella linfoangiogenesi.

La famiglia di ligandi VEGF interagisce con i recettori tirosin-chinasici situati nelle cellule endoteliali VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3, ma vi sono anche co-recettori non enzimatici quali neuropilina-1 e -2 (Nrp1 e Nrp2) che possono regolare le interazioni con i recettori. Ognuno di questi recettori è una proteina tirosin-chinasica di tipo V che consiste in una componente extracellulare contenente sette domini transmembrana "*immunoglobulin-like*", un singolo segmento transmembrana, un segmento iuxtamembrana, un dominio intracellulare tirosin-chinasico che contiene un inserto chinasico di 70-100 residui aminoacidici, e una coda carbossi-terminale [67].

L'ipossia, la diminuzione della concentrazione di ossigeno, è un evento che porta all'espressione di molte proteine, inclusi trasportatori del glucosio e enzimi della glicolisi per la promozione del catabolismo del glucosio, eritropoietina per l'incremento della produzione di globuli rossi e quindi in funzione di un aumento del trasporto di ossigeno, e VEGF, il quale promuove l'angiogenesi, che a sua volta favorisce un maggior trasporto dell'ossigeno. L'aumento dei prodotti genici costituisce una risposta adattativa all'ipossia e la famiglia HIF

(*Hypoxia-Inducible transcription Factor*) è la principale famiglia di fattori coinvolta, in particolare l'espressione di HIF-1 α risultata aumentata durante ipossia [68].

L'inducibilità dovuta a ipossia è conferita da un elemento, *Hypoxia Response Element* (HRE), presente nel *promoter* o in *enhancer* del gene *target*. Nel gene VEGF, sebbene esso codifichi per molte varianti, HRE è presente nella regione promotoriale e consiste dei nucleotidi 975-968 (5'TACGTGGG3') [69].

Oltre all'ipossia, altri fattori di crescita, ormoni, oncogeni e geni *tumor suppressor* regolano l'espressione del gene VEGF, ad esempio è stato dimostrato che l'ormone adrenocorticotropina (ACTH) regola VEGF sia *in vitro* in cellule surrenaliche bovine, che *in vivo* in surreni murini [70-72].

4.7.1 VEGF-A

La scoperta di VEGF (VEGF-A) rappresenta la convergenza del lavoro di diversi gruppi negli anni '80 [40, 42, 45, 73, 74], i quali identificarono e isolarono inizialmente VEGF e VPF (*Vascular Permeability Factor*) come fattori dotati di alto potere mitogeno per le cellule endoteliali, ma, in seguito ad ulteriori investigazioni, realizzarono che si trattava dello stesso fattore.

VEGF è una proteina capace di provocare vasodilatazione, aumento della permeabilità vascolare e rilascio di proteasi, importanti per l'invasione cellulare e rimodellamento dei tessuti. In aggiunta VEGF può prevenire l'apoptosi delle cellule endoteliali.

La proteina, contenente un sito di glicosilazione N-terminale, consiste di nove isoforme risultato di splicing alternativo di un pre-mRNA trascritto da un singolo gene contenente otto esoni [75, 76]. Proteina ed mRNA sono espressi in molteplici organi e tessuti; Berse e collaboratori riscontrarono che in *Cavia porcellus* i più alti livelli di espressione di mRNA di VEGF sono in surrene, cuore e rene, mentre la mucosa gastrica, fegato e milza hanno la minor espressione [77]. Da aggiungere vi è anche che questo fattore è espresso in una larga varietà di tumori maligni umani, inclusi quello del seno, del colon-retto e del polmone a cellule non piccole [75] e una sua aumentata espressione è stata vista nei carcinomi corticosurrenalici [78, 79].

Il maggior precursore proteico umano contiene 232 amminoacidi, in seguito alla rimozione della sequenza segnale di 26 residui aminoacidici, vi è la formazione della proteina matura. La principale isoforma è VEGF-165, seguita da VEGF-189 e 121. Le altre molecole, meno rappresentate, sono VEGF-183, -165b (una isoforma inibitoria), -162, -148 e -145 [75, 80].

Muller e collaboratori determinarono mediante cristallografia a raggi X la struttura di VEGF₈₋₁₀₉ umano e notarono che questo forma un omodimero antiparallelo covalentemente collegato da due ponti disolfidici tra Cys51 and Cys60. La caratteristica dominante in ciascun monomero è un motivo ricco in residui di *cisteina* altamente conservato noto come *cystine knot* che consiste in un anello di otto residui formato da ponti disolfidici Cys57–Cys102 e Cys61–Cys104 con un terzo legame disolfidico (Cys26–Cys68) che attraversa l’anello formando un nodo (“knot”, appunto) [81].

4.7.2 VEGF-B

VEGF-B consiste in due isoforme risultato di splicing alternativo di un pre-mRNA sintetizzato da un singolo gene di sette esoni. Dopo la rimozione del peptide segnale di 21 residui, vengono prodotti VEGF-B167 (contenente 167 amminoacidi) e VEGF-B186 (contenente 186 ammin acidi). Il primo, VEGF-B186, è secreto dalle cellule e diffonde liberamente, mentre il secondo, VEGF-B167, che è anche l’isoforma predominante, si lega ad un proteoglicano eparan-sulfato e non diffonde liberamente diffusibile *in vivo*.

Entrambi i VEGF-B esistono come omodimeri legati da ponti disolfidici. La capacità di VEGF di legarsi a VEGFR2 non condivisa da VEGFB, nonostante le strutture terziarie siano praticamente sovrapponibili [82], può essere dovuta a una sottile differenza strutturale nel *loop* 5-6. È stata riscontrata l’espressione di alti livelli di messaggero di VEGF-B mRNA in molti tumori umani, tra cui timoma benigno, carcinoma del seno, fibrosarcoma, linfoma non di Hodgkins e melanoma primario e metastatico.[83].

La funzione di VEGF-B non è chiara, sembra essere richiesto per la normale funzione cardiaca negli adulti, ma non è necessario per lo sviluppo cardiovascolare o l’angiogenesi. La sue espressione nei tumori umani e la sua abilità ad attivare VEGFR1 e neuropilina-1 indicano che VEGF-B rappresenta un potenziale bersaglio per terapie anti cancro.

4.7.3 VEGF-C

VEGF-C è sintetizzato come pre-proteina e viene sottoposta a complicati processamenti proteolitici per diventare una proteina matura [84, 85]. Una sequenza segnale di 31 residui amino-terminali è rimossa dalla pre-pro-proteina di 419 residui aminoacidici portando alla formazione di una pre-proteina di 388 residui. Due precursori di VEGF-C formano un omodimero antiparallelo collegato da legami disolfidici che si estendono da ciascuna delle

due estremità C-terminali alle N-terminali dei propeptidi. Prima di essere secreto, il dimero va incontro a proteolisi dopo residui dibasici (Arg-227, Arg-228). L'ultimo passaggio del processamento avviene extracellularmente mediante un meccanismo "ill-defined" che rimuove i residui 32-111 creando la proteina matura. Sebbene la forma dimerica matura di VEGF-C contenga otto residui cisteinici omologhi come VEGF e VEGF-B, la forma omodimerica di VEGF-C perde i legami disolfidici inter-subunità [86, 87].

Il gene VEGF-C contiene sette esoni. Nell'uomo sono espressi alti livelli di mRNA in tessuto cardiaco adulto, ovaie, placenta, muscolo scheletrico e piccolo intestino. Diversi altri tessuti adulti sono caratterizzati da modesti livelli di trascritto, tra cui reni, polmoni, pancreas, prostata, milza e testicoli.

Una forma non processata di VEGF-C si lega a VEGFR3, che svolge un ruolo importante nella linfogenesi, mentre la forma pienamente processata si lega sia a VEGFR2 sia a VEGFR3. [85]. VEGF-C svolge un ruolo attivo durante la linfoangiogenesi nel corso dell'embriogenesi e partecipa al mantenimento dei vasi linfatici differenziati [88].

A livello tumorale VEGF-C è espresso in modo significativo soprattutto nelle neoplasie di seno, cervice, colon, polmone, prostata e stomaco [86, 89, 90].

4.7.4 VEGF-D

VEGF-D, come VEGF-C, è sintetizzato come pre-pro-proteina la quale è sottoposta a complicati processi proteolitici. Il precursore contiene estensioni C- e N- terminali che vengono clivate come per VEGF-C. La proteina matura è un omodimero non covalente.

La forma completamente processata di VEGF-D si lega a VEGFR2 e VEGFR3, ma esiste anche una forma non processata che si lega a VEGFR3 e che è importante per la linfoangiogenesi [91, 92].

Il gene VEGF-D contiene sette esoni ed è stato trovato nel cromosoma X [93].

Studi su topi privi di VEGF-C e VEGF-D hanno dimostrato che, mentre il primo fattore di crescita è essenziale per la sopravvivenza e il suo segnale è richiesto per la migrazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali linfatiche, rivelandosi indispensabile per la linfoangiogenesi embrionale [94], la funzione esercitata da VEGF-D può essere sostituita da VEGF-C e forse da altri fattori [95].

Alti livelli di trascritto sono stati ritrovati in colon di uomo adulto, cuore, polmoni, muscolo scheletrico e piccolo intestino, mentre bassi sono quelli in ovaie, pancreas, prostata e testicoli

[96]. Carcinomi del colon-retto, del seno, gastrici e della tiroide, e neoplasia cervicale intraepiteliale, glioblastoma e melanoma presentano una overespressione di VEGF-D. La sua espressione correla inoltre con metastasi linfonodali nei carcinomi del colon-retto, polmone e ovarico, suggerendo VEGF-D come potenziale *target* anti-cancro e anti-metastasi [97].

4.7.5 PIGF

Il fattore di crescita della placenta (PIGF) è una glicoproteina omodimerica con il 42% di identità con VEGF. In comune con la famiglia VEGF ha inoltre gli otto residui cisteinici che partecipano alla formazione di legami disolfidici inter- e intra-subunità; inoltre anche la sua struttura terziaria è simile a quella di VEGF [98, 99]. Il gene di PIGF contiene sette esoni e sono da annoverare quattro isoforme, frutto di *splicing* alternativo del pre-mRNA: PIGF-131, -152, -203 e -224 [100]. Diverse isoforme di PIGF sono espresse in tumori del seno, gastrici, della prostata e in quello del polmone a cellule non piccole [101-104], ma anche nel normale tessuto cardiaco, nel muscolo scheletrico, nella retina e nella pelle [105-107].

Uno dei ruoli di PIGF è l'aumento del segnale proveniente da VEGF e la sua espressione potrebbe interferire con le terapie anti VEGF [108].

4.7.4 VEGF-E

VEGF-E è un fattore non umano codificato da parapoxvirus. Esso stimola la chemotassi, la proliferazione e, in vivo, l'angiogenesi. Esso può legarsi con alta affinità a VEGFR2, ma non è in grado di legarsi a VEGFR1.

VEGF-E supporta l'angiogenesi associata alle lesioni da parapoxvirus e la sua attività sulla permeabilità vascolare è comparabile a quella di VEGF [109].

4.8 Recettori di VEGF

I recettori a cui si legano i fattori della famiglia VEGF sono tre: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 (figura 4.9). Essi verranno qui di seguito descritti brevemente.

Come già accennato, a questi recettori si legano differenti ligandi VEGF, come riassunto nella tabella 4.4.

VEGFR1	VEGFR2	VEGFR3
VEGF	VEGF (isoforme comprese tra i 110 e i165 aminoacidi)	VEGF-C (forma matura e non)
VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D (forma matura e non)
PlGF	VEGF-D	
	VEGF-E	

Tabella 4.4 Recettori dei ligandi della famiglia VEGF e isoforme di VEGF che si legano a ciascun recettore. Modificato da [65].

4.8.1 VEGFR1

VEGFR1 (o Flt-1, *fms-like tyrosyl kinase-1*, dove “fms” si riferisce al sarcoma virus felino di McDonough) si lega a VEGF, PlGF e VEGF-B.

Il suo peso molecolare è di circa 210 kDa e la sua funzione varia a seconda dello stadio di sviluppo e della posizione in cui si trovano le cellule endoteliali che lo producono [110]. L’affinità di VEGFR1 per VEGF è maggiore rispetto a quella di VEGFR2 (circa 10pM contro 75-750 pM), inoltre, in seguito ad attivazione da parte di VEGF, è dotato di una più debole attività di fosforilazione tirosin-chinasica. L’attivazione di VEGFR1 non ha effetti proliferativi o sul citoscheletro diretti [110, 111], ma comunque la sua attivazione è implicata nell’aumento dell’espressione, nelle cellule endoteliali, di attivatori del plasminogeno di tipo urochinasico e dell’inibitore-1 dell’attivatore del plasminogeno [112], molecole coinvolte nella degradazione della matrice extracellulare e nella migrazione cellulare. Un altro importante ruolo di VEGFR1 è svolto nella chemotassi dei monociti [113].

Il gene umano VEGFR1 contiene 30 esoni e si trova sul cromosoma 13 in posizione 13q12. Lo *splicing* alternativo del pre-mRNA genera una isoforma solubile, detta sVEGFR1, la quale può legare ed inibire l’azione di VEGF [114]. sVEGFR1, dopo il clivaggio del peptide segnale, è formato da 661 aminoacidi corrispondenti ai primi 6 dei 7 domini extracellulari immunoglobulinici.

In uno studio [115] sull’affinità dei recettori, Park e colleghi notarono che PlGF si lega solo a VEGFR1. Nonostante alte concentrazioni del fattore di crescita della placenta non sono sufficienti per stimolare la proliferazione in vitro di cellule endoteliali dei capillari surrenalici bovini, PlGF potenzia la mitogenesi di queste cellule quando vengono aggiunte concentrazioni sub-ottimali di VEGF.

L'attivazione della protein-tirosin chinasi recettoriale e l'inizio della trasduzione del segnale coinvolgono l'autosfosforilazione dei residui tirosinici e molti recettori vanno incontro a autofosforilazione attraverso quello che è chiamato un loop di attivazione che aumenta l'attività dell'enzima. VEGFR1 al contrario non segue questa via. Sono stati identificati nella coda carbossi-terminale di questo recettore sei residui che fungono da siti di fosforilazione: uno di essi, la fosfotirosina 1169, è implicata nel legame e nell'attivazione della fosfolipasi C- γ 1 (PLC- γ 1), che portano all'attivazione della via di segnalazione delle MAP (*Mitogen-Activated Protein*) chinasi [116, 117].

4.8.2 VEGFR2

VEGFR2, conosciuto anche come Flk-1/KDR, *Fetal liver kinase-1/Kinase Domain-containing Receptor*, è un recettore a cui si legano proteine VEGF a più basso peso molecolare (da 110 a 165 residui aminoacidici, tabella 4.4). Il suo peso molecolare è di circa 210kDa [111], esso è il mediatore principale di migrazione, proliferazione e sopravvivenza delle cellule endoteliali stimolata da VEGF, nonché dell'aumento della permeabilità vascolare. Nonostante l'affinità fra VEGF e VEGFR2 sia minore di quella fra VEGF e VEGFR1, VEGFR2 è dotato di una più solida attività protein tirosin-chinasica in risposta al suo ligando.

Il legame di VEGF a VEGFR2 induce la dimerizzazione di quest'ultimo, dimerizzazione che porta alla *trans*-autofosforilazione del recettore e alla sua attivazione: una chinasi di un dimero catalizza la fosforilazione di residui tirosinici sul secondo, e il secondo catalizza la fosforilazione dei residui tirosinici sul primo. I due maggiori siti di fosforilazione sono Tyr1175 e Tyr1214 [118]; l'autofosforilazione dei residui 1054 e 1059 all'interno del loop di attivazione di VEGFR2 conduce all'incremento dell'attività chinasica [119].

La fosforilazione di VEGFR2 porta all'attivazione di PLC- γ che a sua volta provoca l'attivazione della proteina chinasi C. Diversi esperimenti forniscono prove del fatto che VEGFR2 è *trans*-attivato, mediante *trans*-fosforilazione, da VEGFR1 ed è quindi possibile un *cross-talk* tra vie di segnalazione. Inoltre, sebbene VEGFR1 e -2 siano in grado di formare complessi tra di loro in assenza di un ligando attivante, questa associazione aumenta solo in seguito a stimolazione mediata da ligandi che si legano ad entrambi i recettori [120].

Vi è inoltre una forma solubile circolante di VEGFR2, come per VEGFR1[121]. L'espressione di VEGF e VEGFR1, ma non di VEGFR2, aumenta in caso di ipossia [122].

4.8.3 VEGFR3

VEGFR3, o Flt-4, è il terzo recettore di questa famiglia. Il suo peso molecolare è di circa 170kDa. Esso svolge primariamente un ruolo nel rimodellamento del plesso primario capillare nell'embrione e contribuisce all'angiogenesi e alla linfoangiogenesi nell'adulto. La sua espressione, presente nelle cellule vascolari endoteliali embrionali, tende a decrescere durante lo sviluppo e rimane poi ristretta ai vasi linfatici dopo la loro formazione [123].

VEGFR3 va incontro a clivazione proteolitica nel sesto dominio immunoglobulinico, mentre le due componenti della catena originale rimangono collegate da un ponte disulfide [124].

L'ipossia decresce l'espressione di questo recettore in colture di cellule staminali embrionali [125].

Cinque residui tirosinici, 1230, 1231, 1265, 1337 e 1363, posti nell'estremità carbossi-terminale, sono stati identificati come siti di autofosforilazione. La fosfotirosina 1337 è il sito di legame da cui prende il via l'attivazione della trasduzione del segnale della MAP-chinasi [126]. Un'altra caratteristica di VEGFR3 è che può creare complessi con VEGFR2 [126, 127].

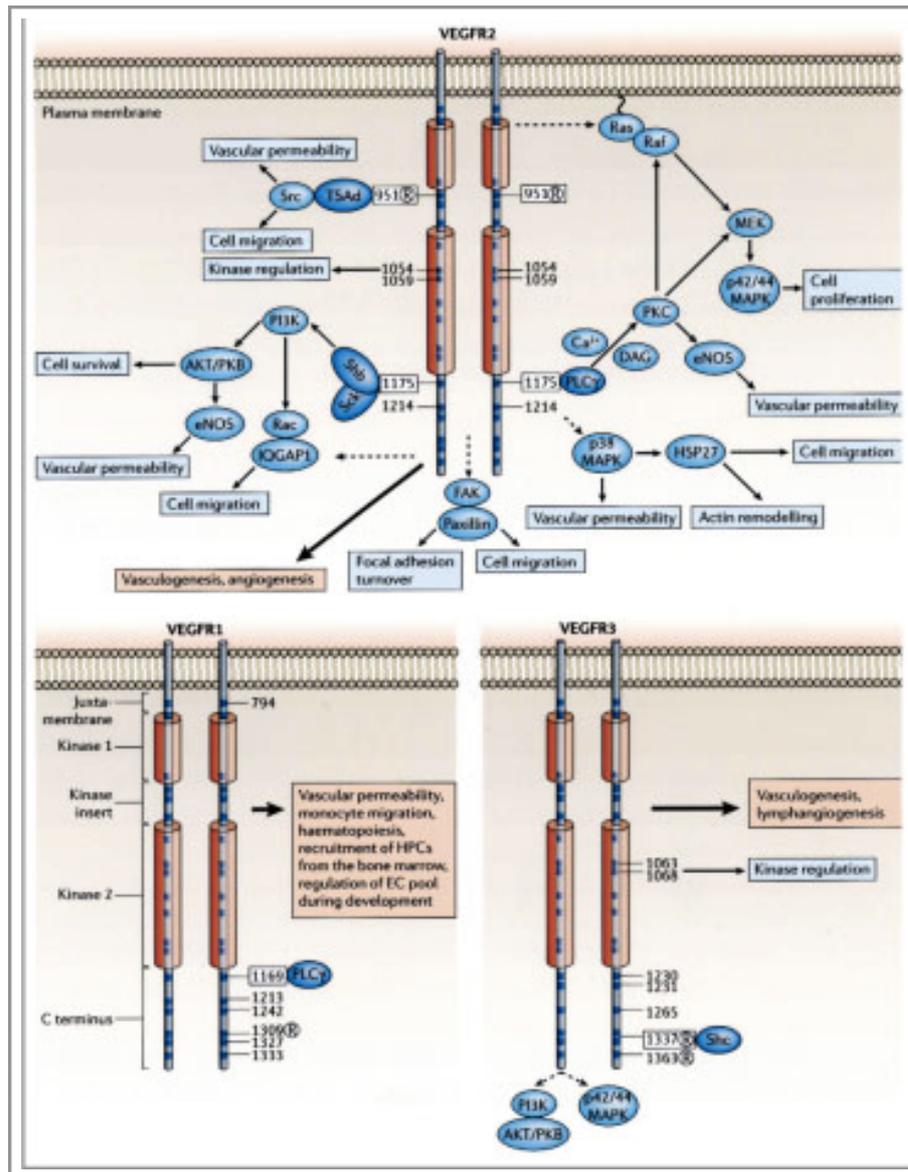


Figura 4.9 Siti di fosforilazione dei recettori VEGFR. I numeri indicano i siti di fosforilazione tirosinica, la R cerchiata indica che l'uso dei siti di fosforilazione è dipendente per VEGFR2 da uno stato angiogenico della cellula, per VEGFR1 da un ligando particolare e per VEGFR3 da eterodimerizzazione. Punti blu nei recettori indicano le posizioni dei residui tirosinici, mentre le linee tratteggiate rappresentano le vie di trasduzione del segnale "ill-defined".

Legenda :DAG, diacylglycerol; EC, endothelial cell; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; FAK focal adhesion kinase; HPC hematopoietic progenitor cell; HSP27, heat shock protein-27; IQGAP, GTPase with four IQ protein motifs; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, MAPK and ERK kinase; p42/44 MAPK, Erk1/2; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C-; Sck, Shc-related protein; Shb, SH2 and beta-cells; TSAd, T-cell-specific adaptor. [128]

4.9 Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF)

Un altro fattore angiogenico di recente individuazione è EG-VEGF (o PK1, Prokineticin-1) [129].

Esso appartiene alla famiglia delle proteine AVIT, tra i cui membri si annoverano Bv8 (*Bombina variegata peptide 8*, peptide isolato nella pelle di rana) e MIT1 (*Mamba Intestinal protein 1*).

La forma matura di EG-VEGF umano è un peptide composto da 86 aminoacidi, incluse dieci cisteine che hanno un elevato grado di omologia (80%) con MIT1, la proteina non tossica purificata dal veleno del serpente *Dendroaspis polylepis polylepis*, comunemente conosciuto come *black mamba* [130]. L'omologo umano di Bv8 è la proteina Prokineticin-2 (PK2), la quale ha il 44% di identità aminoacidica con PK1 e che è maggiormente espressa nel sistema nervoso centrale dove promuove la sopravvivenza dei neuroni, nel nucleo sovrachiasmatico dell'ipotalamo dove influisce sul ritmo circadiano e nei tubuli seminiferi testicolari [131-135]. L'espressione di EG-VEGF invece interessa cellule secernenti steroidi presenti in surrene, placenta, testicoli e ovaio. Inoltre è stato visto che esso funge da mitogeno per le cellule endoteliali delle ghiandole endocrine, del tratto gastrointestinale e di molti tumori che presentano un fenotipo fenestrato [136]. Un recente studio ha individuato la presenza di EG-VEGF nel pancreas umano e nell'adenocarcinoma del pancreas [137].

Esperimenti in vivo utilizzando EG-VEGF trasportato da adenovirus hanno dimostrato una risposta angiogenica forte in tessuti steroidogenici come ovaio e testicoli, ma nessun apparente effetto in muscolo scheletrico e cornea. EG-VEGF inoltre può indurre fenestrazione nelle cellule endoteliali da solo o in combinazione con VEGF [138].

Con Bv8, EG-VEGF condivide oltre che all'83% di identità aminoacidica, anche i recettori PROKR1 e PROKR2 (*Prokineticin Receptor-1 e -2*), recettori accoppiati a proteine G [139].

Il ruolo di EG-VEGF nel surrene non è ad oggi completamente conosciuto. Sembra comunque che EG-VEGF attivi la fosforilazione delle MAP chinasi ERK1 e ERK2 Akt e e-NOS [139] e che agisca come fine regolatore, essendo la sua azione complementare a quella del sistema VEGF/VEGFR [136]. Uno studio svolto su ghiandole surrenaliche bovine ha individuato l'espressione di EG-VEGF e dei suoi due recettori nelle cellule di zona glomerulosa e fascicolata; inoltre ha osservato che EG-VEGF stimola la proliferazione delle cellule della corticale del surrene ma non ha effetti sulla steroidogenesi [140].

Presi assieme questi studi confermano il ruolo di mitogeno selettivo di EG-VEGF per le cellule endoteliali derivate da tessuti endocrini,

5. Scopo dello studio

Sulla base dei dati riportati in letteratura riguardanti l'impiego di analoghi della somatostatina nel trattamento di patologie endocrine, lo scopo di questa parte del mio progetto di dottorato è quello di valutare nuovi target terapeutici nei tumori surrenali, al fine di aumentare le conoscenze sulla biologia dei tumori del surrene e per trovare un eventuale razionale per l'adozione di nuovi piani terapeutici più efficaci e di quelli già in uso che, come nel caso dei carcinomi del surrene, non sono risolutivi.

In particolare, gli obiettivi di questo studio sono:

- Studiare il *pattern* d'espressione dei recettori della somatostatina e dei principali fattori coinvolti nell'angiogenesi nei tessuti di tumori surrenali e in tessuti surrenalici normali.
- Studiare l'espressione dei recettori della somatostatina e dei fattori angiogenetici sulle cellule della linea cellulare stabilizzata di carcinoma surrenalico H295R, utilizzata come possibile modello di cellule surrenaliche.
- Valutare *in vitro* gli effetti citostatici, citotossici e sull'angiogenesi degli analoghi della somatostatina SOM230 e octreotide sulla linea H295R e su colture primarie di carcinoma e adenoma surrenalico allestite da tessuti provenienti dalla chirurgia di pazienti diagnosticati con tumore surrenalico.
- Valutare *in vitro* gli effetti di SOM230 e octreotide sulla secrezione degli ormoni cortisolo e aldosterone nelle cellule H295R e nelle colture primarie allestite.

6. Materiali e metodi

6.1 Soggetti

È stata creata una banca di tessuti provenienti dalla chirurgia di pazienti ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera di Padova, con relativo database per consentirne un facile accesso e per avere un registro dei campioni conservati.

I tessuti surrenalici presenti nella banca sono 13 carcinomi (ACC, *Adrenal Cortical Cancer*), 24 iperaldosteronismi primari (APA, Aldosteron Producing Adenoma), 11 Cushing surrenalici (CPA, *Cortisol Producing Adenoma*) e 7 tessuti controllo (NA; *Normal Adrenal*) provenienti da procedimenti di trapianto del rene.

L'eziologia di ciascuna massa è stata stabilita a livello pre-operatoria attraverso parametri biochimici e risonanza magnetica o tomografia computazionale. Le diagnosi cliniche sono state controllate mediante analisi istologiche dei tessuti. La malignità è stata diagnosticata in accordo con i criteri istopatologici proposti da Weiss (atipia nucleare, mitosi atipiche e frequenti, una bassa percentuale di cellule chiare, architettura, necrosi, invasione di strutture venose, sinusoidali o capsulari) [141].

La stadiazione, basata su studi di risonanza e corroborata da quanto ritrovato durante la chirurgia, è stata riportata in accordo con i criteri di McFarlane–Sullivan (stadio I: tumore di dimensioni uguali o inferiori a 5 cm; stadio II: tumore di dimensioni maggiori di 5 cm; stadio III: infiltrazione da parte del tumore di strutture vicine o linfonodi positivi; stadio IV: infiltrazione delle strutture vicine e linfonodi positive o presenza di metastasi distanti) [142, 143]. Nei 13 carcinomi presenti nella banca dei tessuti, tre sono stati catalogati come stadio III mentre i restanti come IV.

Previo consenso informato scritto del paziente e in seguito all'approvazione dello studio da parte dell'organo etico competente, parti di tessuto prelevate durante la chirurgia sono state conservate in RNA Later (Ambion) a -20°C fino al momento dell'analisi dell'espressione genica. Le restanti porzioni sono state utilizzate per analisi di immunohistochimica e/o per l'allestimento di colture primarie.

6.2 Colture cellulari

La linea cellulare H295R deriva da tessuto di carcinoma surrenalico umano ottenuto dall' "American Tissue Cell Culture" (ATCC, Rockville, MD).

Le cellule sono state trattate con terreno DMEM-F12 (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12) supplementato con siero bovino fetale (FBS, Fetal Bovine Serum) al 5%, insulina (1µg/ml), apo-transferrina (1µg/ml), selenio (1µg/ml) e antibiotico (penicillina/streptomicina 100µg/ml). Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C con 5% CO₂.

6.3 Allestimento di colture primarie

I pezzi operatori provenienti dalla chirurgia sono stati trattati secondo il protocollo di seguito descritto. La porzione di surrene a disposizione viene posta, direttamente in sala operatoria, in terreno DMEM-F12 supplementato con il 5% di siero bovino fetale (FBS), insulina (1µg/ml), apo-transferrina (1µg/ml), selenio (1µg/ml) e antibiotico (penicillina/streptomicina 100µg/ml), e subito trasportata in laboratorio. In seguito essa viene dissezionata per eliminare eventuale tessuto adiposo e il tessuto midollare surrenalico. Successivamente si provvede allo sminuzzamento del tessuto isolato tramite forbici, bisturi e pinze sterili, si trasferisce quanto ottenuto in un tubo sterile e lo si incuba in una soluzione di DMEM, 1% antibiotico e collagenasi (2mg/ml) per 45°C in bagnetto termostato a 37°C, facendo in modo che sia presente un'agitazione costante.

Trascorso il tempo necessario, si disgrega il campione servendosi di una pipetta sterile e lo si trasferisce su un filtro di nylon da 100µm per trattenere i pezzi non disgregati. Il filtro viene poi lavato per tre volte con 10 ml di terreno di coltura per eluire le cellule.

Le cellule ottenute vengono sottoposte a centrifugazione a 1300 rpm per 8 minuti e a lavaggi con terreno per eliminare la collagenasi residua. Dopo l'ultima risospensione in terreno DMEM-F12 supplementato, le cellule possono essere piastrate.

6.4 Estrazione di RNA e trascrizione inversa

L'RNA totale è stato estratto da tessuti tumorali surrenalici (13 carcinomi, 24 iperaldosteronismi primari, 11 Cushing surrenalici) e da tessuti surrenalici normali (7 campioni) mediante il kit "RNeasy Mini Kit" (Qiagen) secondo il protocollo indicato dal produttore. La concentrazione dell'RNA è stata misurata al Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific) prima e dopo aver effettuato il trattamento con "Turbo Dnase free" (Ambion), secondo le istruzioni della casa produttrice, in particolare è stata utilizzata 1U di enzima per 1 µg di RNA. La qualità dell'RNA ottenuto è stata confermata tramite Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent). Successivamente si è eseguita la retrotrascrizione dell'RNA mediante SuperScript

III Rnase H-RT (Invitrogen): 1µg RNA totale, 200ng di *random primers* e 1µl of dNTPs (10nM) sono stati inizialmente denaturati per 5 minuti a 65°C, successivamente sono stati aggiunti 200 unità di SuperScript III RNase H-RT, 1µl DTT (0.1M), 4µl di 5X *reaction buffer*, e 40U dell'inibitore RNase OUT e sono stati portati a un volume finale di 20µl.

6.5 Analisi dell'espressione genica mediante *Real Time* PCR quantitativa

La *Real Time* PCR quantitativa è stata utilizzata per eseguire la quantificazione dell'mRNA oggetto di studio proveniente sia da campioni di tessuto che da cellule. La metodica impiegata è quella della SYBR green PCR, che utilizza una molecola fluorescente che si lega al solco minore del DNA, usando il sistema ABI9700 (Applied Biosystems).

I *primer* dei geni umani SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5, VEGF-A (chiamato da qui in avanti VEGF), VEGFR1, VEGFR2, EG-VEGF e PROKR1 sono stati disegnati con il programma "Primer Express" (Applied Biosystems) Il gene housekeeping adottato per la normalizzazione dei dati è stato quello della β -actina, i cui *primer* sono stati disegnati col medesimo programma (tabella 6.1).

Gene	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
β -actina	GGGACGACATGGAGAAAATCTG	CACGCAGCTCATTGTAGAAGGT
SSTR1	GGGTGCTGTCGGGATAACG	TTTCTTGGGTTCCCTCCATCAA
SSTR2	AAGGTGAGCGGCACAGATG	TTCATTCAGCCGGGATTTG
SSTR3	TGTGCCAACCCATCCTTT	GCGGAAGCCCTGCTTGA
SSTR4	CTGCGCCAACCCTATTCTCT	AGAGAACCCGCTGGAAGGAT
SSTR5	GAAGGTGACGCGCATGGT	GACGATGTTGACGGTGAAGAAG
VEGF	GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTCT	TCAGGGTACTCCTGGAAGATGTC
VEGFR1	TCTGGCACCCCTGTAACCA	TCCAGGATAAAGGACTCTTCATTATTG
VEGFR2	CACCACTCAAACGCTGACATGTA	CCAAGTCCAATACCAGTGGAT
EG-VEGF	TGTGACCTTCTGCCAGAATTGT	GGGCTTCAGTGGTTAACTGGTAA
PROKR1	CGGCATTGGAACTTCATCTTT	TGAGGTTGCGCAGTTTCTTGT

Tabella 6.1 Sequenze nucleotidiche dei primer utilizzati per amplificare in Real-Time PCR quantitativa i geni analizzati.

La reazione è stata condotta in un volume totale di 30µl secondo i parametri indicati dall'azienda produttrice, usando la power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 50 nM di primer (eccetto i primer per la β-actina, utilizzati alla concentrazione di 30nM) e 20 ng di RNA retrotrascritto. I prodotti delle RT-PCR sono stati separati con corsa elettroforetica su gel d'agarosio 2% per controllare la riuscita della reazione.

I dati sono stati ottenuti come valori di Ct (ossia il numero del ciclo a cui il *plot* logaritmico della PCR interseca una linea soglia prestabilita) e sono stati usati per determinare il ΔCt ($\Delta Ct = Ct \text{ del gene } target - Ct \text{ del gene } housekeeping$). Per calcolare di quante volte cambia l'espressione genica tra due categorie di campioni è stata utilizzata la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Le misure sono state condotte in triplicato.

6.7 Analisi immunoistochimica (IHC)

L'analisi immunoistochimica è stata svolta su sezioni di tessuti provenienti da 6 ACC, 5 APA e 3 CPA fissati in formalina e inclusi in paraffina, utilizzando un dispositivo automatizzato per lo *staining* (Vision BioSystems 'Define' Bond Polymer Refine Detection, Vision BioSystems) con un sistema interamente automatizzato (Bond-maX).

Le sezioni sono state seccate a 62°C per 30 minuti. Gli anticorpi anti-SSTR1, -2, -3 e -5 (Sigma-Aldrich Inc.) sono stati diluiti in "Bond primary antibody diluent" alla concentrazione di 1:1000. Le sezioni sono state pre-trattate per 10 minuti con "Bond enzyme" e incubate *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario, in seguito per 20 minuti con l'anticorpo secondario, 30 minuti con polimero e con "diaminobenzidine Define" per 10 minuti. Successivamente è stata svolta la colorazione di contrasto con ematossilina e le sezioni sono state disidratate in alcol e chiarificate in xilene, quindi è stato svolto il montaggio con DPX. Nelle analisi sono stati inclusi sia un controllo negativo, costituito da sezioni prive dell'anticorpo primario durante l'incubazione, sia un controllo positivo, rappresentato da sezioni di pancreas.

6.6 Studi di proliferazione cellulare

Le cellule della linea commerciale H295R, prima linea cellulare derivata da un carcinoma adrenocorticale che mantiene la produzione di steroidi, sono state piastrate in *multiwell* da 96 pozzetti per colture cellulari alla densità di 3×10^4 cellule in 0,2 ml di *medium* per pozzetto. Dopo 72 ore il terreno di coltura è stato sostituito con *medium* contenente FBS 0,1% per un periodo d'incubazione *overnight* a 37°C con il 5% di CO₂. Successivamente è stata effettuata

l'incubazione con terreno di coltura con FBS 0,1% contenente differenti concentrazioni di SOM230 e di octreotide (da 10^{-4} a 10^{-9} M).

La citostaticità e la citotossicità è stata valutata mediante saggio MTT (test del sale blu di tetrazolio), che si basa su una reazione colorimetrica: il giallo MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, un tetrazolio) viene ridotto a formazano viola nei mitocondri delle cellule vitali. Viene aggiunta una soluzione di solubilizzazione come il DMSO per dissolvere i prodotti del formazano viola, altrimenti insolubile. L'assorbanza di questa soluzione colorata può essere quantificata misurandola con uno spettrofotometro ad una determinata lunghezza d'onda.

Questa riduzione avviene solamente se degli enzimi, le riduttasi mitocondriali, sono attive e per questo motivo la conversione può essere correlata direttamente al numero di cellule vitali. Quando la quantità di formazano viola prodotto dalle cellule trattate con il farmaco è comparato con la quantità di formazano prodotto dalle cellule non trattate che fungono da controllo, l'efficacia del farmaco nel causare morte cellulare può essere dedotta attraverso la realizzazione di una curva dose-risposta.

È stata aggiunta la soluzione di MTT (2mg/ml in PBS) in ogni pozzetto; dopo un'incubazione di 4 ore a 37°C le piastre sono state centrifugate (10 minuti a 1000rpm), i soprannatanti rimossi e si sono aggiunti in ciascun pozzetto 0,1 ml di DMSO. Si è proceduto quindi con la lettura dell'assorbanza delle piastre a una lunghezza d'onda di 550nm e di 620 nm. L'assorbanza è stata misurata a 24, 48 e 72 ore d'incubazione delle cellule con i farmaci.

In ogni saggio è stato introdotto un "bianco", ovvero pozzetti contenenti solo terreno di coltura.

La vitalità cellulare è stata calcolata applicando la formula:

$$\text{Vitalità} = (A \text{ campione trattato} - A \text{ bianco}) / (A \text{ controllo} - A \text{ bianco})$$

Il valore percentuale si ottiene moltiplicando per 100 i risultati della formula precedente.

6.6 Studi di secrezione del cortisolo

Per valutare l'effetto di SOM230 sul rilascio degli ormoni steroidei sono stati effettuati saggi *in vitro* trattando le cellule con forskolina (20 $\mu\text{mol/L}$), una molecola stimolante la produzione di cAMP e quindi la steroidogenesi, e contemporaneamente con SOM230 (da 10 μM a 1 nM) o Octreotide (da 10 μM a 1 nM). Per le colture primarie di ACC e APA sono state impiegate

solo concentrazioni nanomolari di SOM230 a causa del basso numero cellule ottenute dopo disgregazione del tessuto

Le cellule sono state piastrate in piastre *multiwell* sterili da 6 pozzetti ciascuna, in terreno DMEM-F12 supplementato con 5% FBS alla densità di 400 mila cellule per *well*. Sono state quindi lasciate nell'incubatore per 48 ore. Il terreno è stato poi sostituito con un terreno a bassa concentrazione di siero (0,1% FBS) e le cellule sono state incubate *overnight* a 37°C con il 5% di CO₂. Trascorso questo tempo, è stato sostituito il terreno con *medium* contenente lo 0,1% di FBS e le differenti concentrazioni di SOM230. Infine è stata aggiunta la forskolina e le piastre sono state riposte nell'incubatore. Dopo 24 ore è stato prelevato il terreno di coltura delle cellule e su di esso è stato eseguito il dosaggio del cortisolo in RIA (Radio Immuno Assay) con il kit commerciale "Cortisolo Riact" (Radim) in accordo con le direttive fornite dalla casa produttrice. Per ogni trattamento, svolto in triplicato, la determinazione del cortisolo è stata effettuata anch'essa in triplicato.

6.7 Studi di secrezione dell'aldosterone

Sono stati anche condotti studi ormonali sulla secrezione dell'aldosterone nelle cellule H295R, per vedere se essa è inibita dalla SOM230. Il protocollo seguito è il medesimo sopra descritto, con la differenza che le cellule sono state trattate con Angiotensina II (10nM) per stimolare la produzione di aldosterone e incubate con SOM230 alla concentrazione di 10 µM e 10 nM per 24 ore. La concentrazione di aldosterone è stata determinata con il kit commerciale ALDOCTK-2 (DiaSorin) secondo il protocollo fornito dal produttore.

Incubazione con il farmaco e dosaggio ormonale sono stati svolti in triplicato.

6.8 Effetto di SOM230 sull'espressione di fattori angiogenetici nella linea H295R

Per valutare l'effetto di SOM230 sull'espressione dell'mRNA di VEGF e EG-VEGF nelle cellule H295R, sono state piastrate le cellule in piastre *multiwell* sterili da 6 pozzetti ciascuna, in terreno DMEM-F12 supplementato con 5% FBS alla densità di 400 mila cellule per *well*. Dopo 48 ore il terreno è stato poi sostituito con un terreno a bassa concentrazione di siero (0,1% FBS) e le cellule sono state incubate *overnight* a 37°C con il 5% di CO₂. Trascorso questo tempo, è stato sostituito il terreno con *medium* contenente lo 0,1% di FBS, le cellule sono state poi stimulate con ACTH (10⁻⁷ M) per stimolare l'angiogenesi [71] e incubate con concentrazioni crescenti di SOM230 (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M and 10⁻⁵ M) per 24.

L'esperimento è svolto in triplicato e prevede un controllo costituito da cellule non trattate con farmaco e ACTH (basali) e un controllo fornito da cellule trattate solo con ACTH e non con SOM230..

Dopo 24 ore viene estratto l'RNA delle cellule, quantificato, retrotrascritto e su di esso viene effettuata la qPCR per i geni VEGF e EG-VEGF. I dati ottenuti per ogni concentrazione di SOM230 vengono comparati con quelli relativi ai due controlli.

6.9 Analisi statistica

Per analizzare i dati della secrezione ormonale è stato svolto il *paired t-test*.

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. Valori di *p* inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

7. Risultati

7.1 Caratterizzazione dell'espressione dei recettori SST in tumori del surrene

Questa parte dello studio verteva sulla definizione del profilo d'espressione dei recettori per la somatostatina nelle cellule e nei tessuti oggetto di studio, mediante Real-Time PCR quantitativa, e più precisamente utilizzando la metodica SYBR green.

7.1.1 Espressione dei recettori SST nelle cellule H295R

L'analisi dell'espressione dei recettori SST, mediante *Real-Time* PCR quantitativa, dell'RNA estratto dalla linea cellulare H295R ha evidenziato una predominante abbondanza di SSTR2 (Ct=30,7) e SSTR5 (Ct=33,4), mentre SSTR3 (Ct=35,6) e SSTR1 (Ct=36,7) hanno un'espressione inferiore e SSTR4 è quasi assente (Ct=39); il Ct della β -actina è 18,4.

7.1.2 Espressione dei recettori SST nei tessuti surrenalici normali

Il profilo d'espressione dei recettori SST emerso dall'analisi tramite *Real-Time* PCR quantitativa dei 7 controlli costituiti dai tessuti surrenalici normali (NA), ha evidenziato una maggiore espressione del recettore di tipo 2, seguita dal recettore 5 e 1, mentre non si è trovata espressione di SSTR3 e SSTR4.

L'espressione dei recettori SST nei controlli è stata valutata comparando i valori ottenuti dalla sottrazione del valore medio dei Ct della β -actina ($19,6\pm 0,7$) al Ct medio di ciascun SSTR. I valori così calcolati sono stati i seguenti: SSTR1 $33,3\pm 1,2$, SSTR2 $28,7\pm 1,2$, SSTR5 $30,5\pm 2,3$ (tabella 7.1).

7.1.3 Espressione dei recettori SST nei tessuti surrenalici tumorali

I diversi tessuti tumorali a nostra disposizione sono stati raggruppati a seconda della patologia (carcinomi, iperaldosteronismi primari, cushing surrenalici) ed è stata valutata l'espressione dei recettori per la somatostatina. Ogni valore è stato poi confrontato con il valore medio relativo all'espressione di ciascun recettore nell'insieme di tessuti surrenalici normali.

L'RNA messaggero di SSTR1 e SSTR2 è stato individuato in un'alta percentuale in tutti i campioni, mentre i restanti recettori sono espressi in maniera disomogenea nei tessuti tumorali (tabella 7.1).

Dall'analisi dei carcinomi, emerge che il recettore SST2 è quello con l'espressione più alta, con un Δ Ct $10,4\pm 3$, ed è presente in tutti i campioni, seguito da SSTR5 e SSTR1, entrambi

nell'84,6% dei casi, mentre i recettori SST3 e -4 sono espressi nella metà dei campioni e a livelli inferiori.

Una situazione simile si è riscontrata negli adenomi secernenti aldosterone. Il *pattern* di espressione di questi ultimi vede, come già accennato, un'elevata espressione di SSTR2 (ΔCt $9,8 \pm 2,3$) in tutti i campioni, seguita da quella di SSTR1, presente nel 96% dei campioni analizzati, SSTR5 nel 68%, SSTR3 solo nel 24% e a livelli non elevati, con un ΔCt medio pari a $20,2 \pm 2,3$. La reazione di qPCR non ha dato alcuna amplificazione del recettore 4 in nessuno dei 25 campioni.

L'assetto recettoriale negli adenomi produttori cortisolo ha rivelato un'espressione di SSTR2 e di SSTR5, con ΔCt medi pari a $10,8 \pm 3,2$ e $12,5 \pm 2,3$ rispettivamente, in tutti gli 11 campioni. SSTR1 risulta comunque molto presente (81,8% dei campioni), mentre SSTR3 e SSTR4 si sono rivelati completamente assenti.

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
NA	$^{\circ}7/7$ (100%) ΔCt $13,7 \pm 1,3$	$^{\circ}7/7$ (100%) ΔCt $9,1 \pm 1,6$	$^{\circ}0/7$ (0%) ΔCt ind	$^{\circ}0/7$ (0%) ΔCt ind	$^{\circ}6/7$ (85,7%) ΔCt $13,7 \pm 1,3$
ACC	$^{\circ}11/13$ (84,6%) ΔCt $12,5 \pm 3,9$	$^{\circ}13/13$ (100%) ΔCt $10,4 \pm 3$	$^{\circ}7/13$ (53,8%) ΔCt $15,7 \pm 4,8$	$^{\circ}5/13$ (30,7%) ΔCt $15,4 \pm 4,4$	$^{\circ}11/13$ (84,6%) ΔCt $10,5 \pm 3,2$
APA	$^{\circ}24/25$ (96%) ΔCt $12 \pm 2,2$	$^{\circ}25/25$ (100%) ΔCt $9,8 \pm 2,3$	$^{\circ}6/25$ (24%) ΔCt $20,2 \pm 1,9$	$^{\circ}0/25$ (0%) ΔCt ND	$^{\circ}17/25$ (68%) ΔCt $15,2 \pm 3,3$
CPA	$^{\circ}9/11$ (81,8%) ΔCt $14,4 \pm 2,3$	$^{\circ}11/11$ (100%) ΔCt $10,8 \pm 3,2$	$^{\circ}0/11$ (0%) ΔCt ND	$^{\circ}0/11$ (0%) ΔCt ND	$^{\circ}11/11$ (100%) ΔCt $12,9 \pm 1,8$

Tabella 7.1 Espressione dei sottotipi recettoriali SST in 13 ACC, 24 APA e 11 CPA comparati con 7 NA. Tra parentesi è riportata la percentuale dei campioni che esprimono il gene. Legenda: $^{\circ}$ numero campioni positivi /numero campioni totale; ΔCt indicato come valore medio \pm deviazione standard; ind= indeterminato.

È interessante notare come il recettore SST4 non sia espresso in surreni normali, adenomi secernenti aldosterone e adenomi secernenti cortisolo, ma sia stato individuato in 5 campioni di carcinoma della corticale del surrene, ovvero nel 30,7%, anche se il suo livello di espressione, rappresentato dal valore di ΔCt medio di $15,4 \pm 4,4$, ne indica un'espressione debole.

Bisogna notare inoltre che SSTR3, assente in NA e CPA, è espresso, seppur debolmente, nel 53,8% degli ACC e nel 24% degli APA.

7.2 Analisi immunoistochimica

Tessuti provenienti da 6 ACC, 5 APA e 3 CPA sono stati analizzati immunoistochimicamente, in particolare si è testata l'immunoreattività per i recettori SSTR1, -2, -3 e -5.

Nella figura 7.1 sono mostrate alcune immagini relative ai risultati di *staining* immunologico dei recettori per la somatostatina trovati essere più rappresentativi nei nostri campioni tumorali.

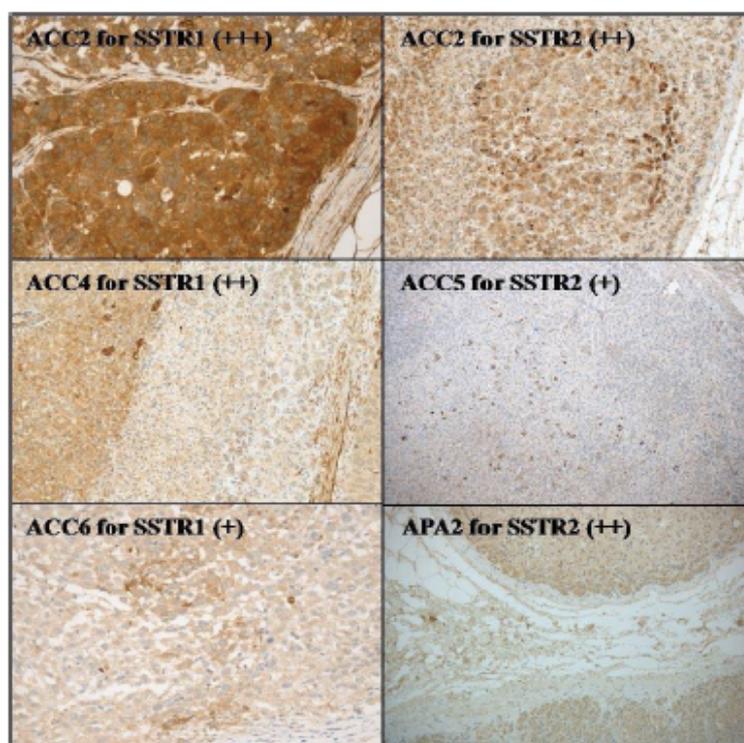


Figura 7.1 Analisi immunoistochimica per SSTR1 e SSTR2 in alcuni tessuti studiati. I numeri cardinali posti dopo la tipologia del campione (ACC o APA) indicano il paziente donatore del tessuto. Tra parentesi è riportata l'intensità dello *staining* analizzata semi-quantitativamente utilizzando come scala +++=forte; ++= moderata; +=debole; +/- *staining* pallido; -= assenza di *staining*.

Successivamente sono stati confrontati i risultati immunoistologici con i dati ottenuto mediante analisi di Real-Time PCR quantitativa. I campioni analizzati che hanno dato un risultato negativo per mancanza di immunoreattività sono stati quelli in cui non vi era stata amplificazione dell'RNA messaggero mediante Real-Time PCR quantitativa, mentre tutti gli altri tessuti analizzati, positivi allo *staining*, hanno confermato la presenza dei recettori e la conseguente presenza del loro mRNA.

Nella tabella 7.2 è stato riportato il valore medio di Ct ottenuto con qPCR e l'immunoreattività relativa a ciascun recettore analizzato nei pazienti studiati.

	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR5	
	qPCR (valore Ct)	IHC	qPCR (valore Ct)	IHC	qPCR (valore Ct)	IHC	qPCR (valore Ct)	IHC
ACC1	31,4	++	30,0	++	33,0	++	29,3	++
ACC2	28,6	+++	29,4	++	34,3	+	31,3	+
ACC3	ind	-	34,1	+/-	ind	-	30,1	+
ACC4	28,1	++	31,7	++	ind	-	ind	-
ACC5	34,1	+/-	33,2	+	38,6	+/-	29,7	++
ACC6	34,5	+	27,5	+	38,2	+/-	29,0	+++
APA1	ind	-	29,0	+	ind	-	ind	-
APA2	28,0	++	28,3	++	38,6	+/-	ind	-
APA3	30,1	+	29,6	+	ind	-	37,5	-
APA4	32,9	+	24,3	+++	ind	-	36,7	+/-
APA5	32	+	30	++	ind	-	32,4	+
CPA1	30,8	++	24,8	++	38,2	-	31,7	+
CPA2	32,2	+	29,9	+	ind	-	32,1	+
CPA3	33,5	+/-	32,8	+	ind	-	34,5	+/-

Tabella 7.2 Corrispondenza tra espressione dei recettori SST determinata mediante Real-time PCR quantitativa (qPCR) e immunoistochimica (IHC). Per l'analisi dell'espressione dell'mRNA viene riportato il valore di Ct medio relativo al campione, mentre per l'analisi IHC il punteggio assegnato a ciascuno *staining* utilizzando la scala: +++ = forte; ++ = moderata; + = debole; +/- = *staining* pallido; - = assenza di *staining*.

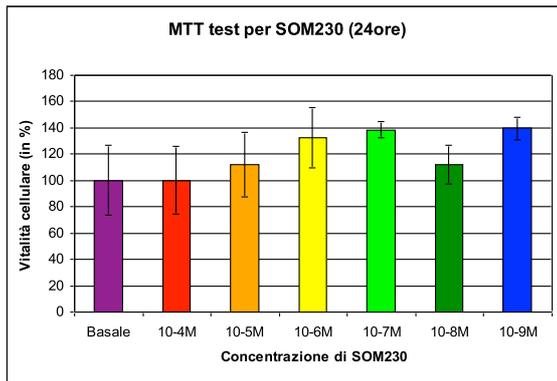
7.3 Gli analoghi della somatostatina non influenzano la proliferazione cellulare

I saggi MTT svolti sulle cellule H295R trattate con concentrazioni crescenti (da 10^{-9} M a 10^{-4} M) dell'analogo della somatostatina SOM230 e incubate per 24, 48 e 72 ore, hanno prodotto i risultati di vitalità cellulare mostrati negli istogrammi riportati in figura 7.2.

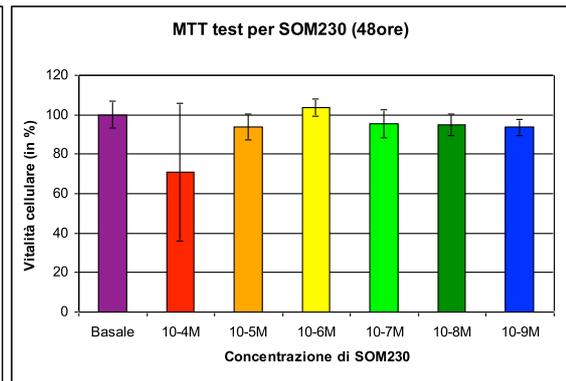
Rispetto al basale, ovvero alle cellule che non hanno ricevuto il trattamento con il farmaco, non si è osservata una diminuzione della proliferazione cellulare con somministrazione dell'analogo SOM230.

Risultati analoghi (non mostrati) sono stati riscontrati nelle colture primarie di due carcinomi della corticale del surrene.

A)



B)



C)

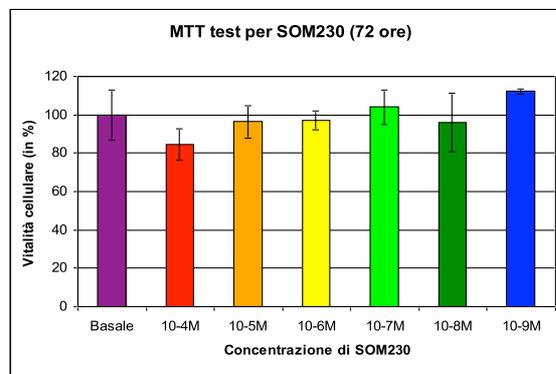
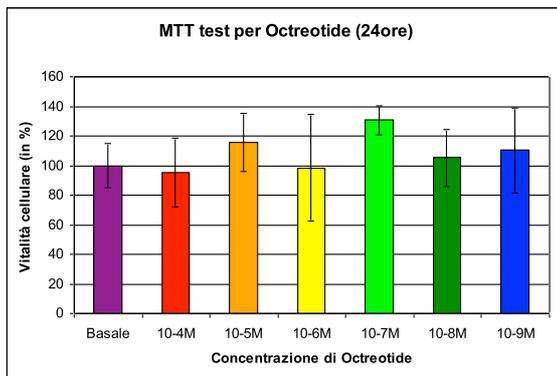


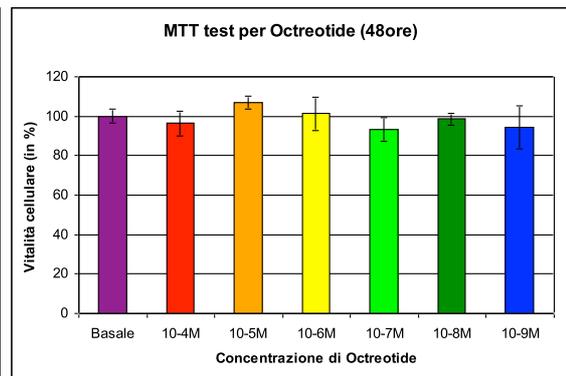
Figura .7.2 MTT-test nelle cellule H295R trattate con concentrazioni crescenti da $10^{-9}M$ a $10^{-4}M$ di SOM230. A) MTT test a 24 ore. B) MMT test a 48 ore. C) MTT test a 72 ore.

Come per SOM230, il medesimo saggio effettuato sulle cellule con Octreotide non ha rivelato una sensibile diminuzione della vitalità cellulare (figura 7.3).

A)



B)



C)

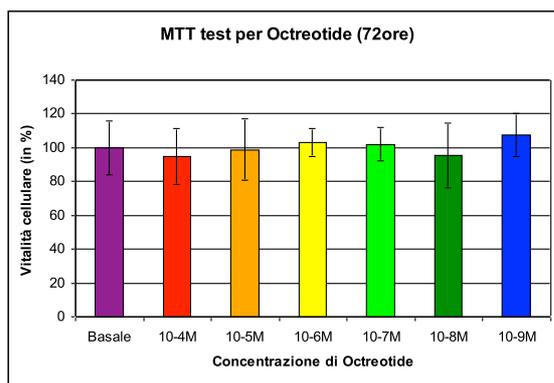


Fig.7.3 MTT-test nelle cellule H295R trattate con concentrazioni crescenti di Octreotide da 10^{-9} M a 10^{-4} M. A) MTT test a 24 ore. B) MMT test a 48 ore. C) MTT test a 72 ore.

7.4 Effetto di SOM230 sulla secrezione di ormoni steroidei

Questa parte di studio dimostra che SOM230, a opportune concentrazioni, può procurare un decremento della secrezione degli ormoni cortisolo e aldosterone sia nella linea stabilizzata di carcinoma surrenalico H295R che in colture primarie di tumori surrenalici.

7.4.1 Effetto di SOM230 sulla secrezione di cortisolo nelle cellule H295R

In cellule H295R è stata stimolata la secrezione di cortisolo mediante somministrazione di forskolina e successivamente sono state aggiunte concentrazioni di SOM230 da $10 \mu\text{M}$ a 1 nM . Dopo 24 ore di incubazione, è stato raccolto il terreno di coltura ed è stata analizzata la quantità di cortisolo presente in esso mediante RIA. I valori di cortisolo espressi in milligrammi sono stati normalizzati per i milligrammi di proteine estratti dalle medesime cellule, ottenendo perciò un valore finale di milligrammi di cortisolo per milligrammo di proteina.

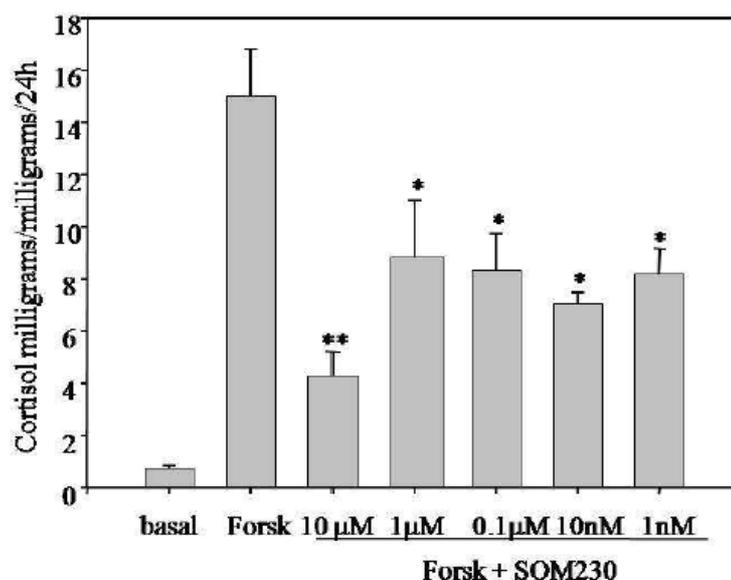


Figura 7.4 Effetto di SOM230 sulla secrezione di cortisolo nella linea cellulare H295R. I dati sono espressi in milligrammi di cortisolo (misurati mediante RIA) per milligrammo di proteina estratta dalle cellule dopo 24 ore di trattamento con SOM230 e forskolina. Gli asterischi indicano la riduzione della secrezione ormonale da parte delle cellule trattate. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$.

Il trattamento con SOM230 ha prodotto una marcata riduzione della secrezione di cortisolo nelle 24 ore, sia a concentrazioni nanomolari che micromolari (figura 7.4). Sui dati ottenuti è stato effettuato il t-test ed è stata considerata significativa una riduzione ormonale con una *P-value* inferiore allo 0,05.

7.4.2 Effetto di SOM230 sulla secrezione di aldosterone nelle cellule H295R

Cellule della linea H295R sono state trattate con angiotensina II per promuovere la produzione di aldosterone. In seguito è stata aggiunta il farmaco SOM230 in concentrazioni pari a 10 μ M e 10 nM e, dopo 24 ore di incubazione, il terreno è stato raccolto ed è stato compiuto il dosaggio ormonale. La quantità di aldosterone determinata, espressa in picogrammi, è stata normalizzata per i milligrammi di proteine estratte dalle medesime cellule trattate, ottenendo un valore finale espresso in picogrammi per milligrammo di proteina.

Concentrazioni nanomolari di SOM230 inducono una forte riduzione della secrezione di aldosterone nelle cellule H295R, come anche concentrazioni micromolari del farmaco, sebbene meno marcatamente (figura 7.5).

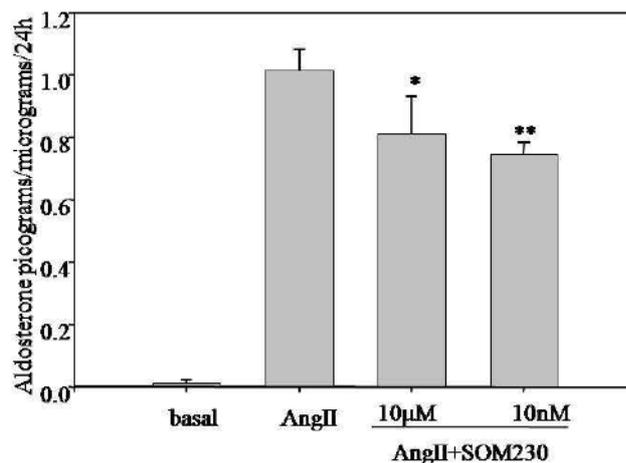


Figura 7.5 Effetto di SOM230 sulla secrezione di aldosterone nelle cellule H295R. I dati sono espressi in picogrammi di aldosterone (misurati mediante RIA) per milligrammo di proteina dopo 24 ore di trattamento con SOM230 e angiotensina II. Gli asterischi indicano la riduzione della secrezione ormonale da parte delle cellule trattate. *P<0,05; **P<0,005.

7.4.3 Effetto di SOM230 sulla secrezione di cortisolo in colture primarie di ACC

Due colture primarie di carcinoma surrenalico sono state trattate con forskolina per stimolare la produzione di cortisolo e quindi incubate per 24 ore con 1nM SOM230 e 10nM SOM230, al fine di studiarne l'effetto *in vitro*. La prima coltura analizzata (ACC1, figura 7.6 a) ha avuto un marcato e significativo decremento della secrezione di cortisolo ad entrambe le concentrazioni utilizzate, con un maggiore e significativo effetto alla concentrazione di SOM230 di 10nM.

La seconda coltura primaria di carcinoma (ACC2), trattata seguendo il medesimo protocollo, si è rivelata non responsiva al trattamento con SOM230. (figura 7.6 b).

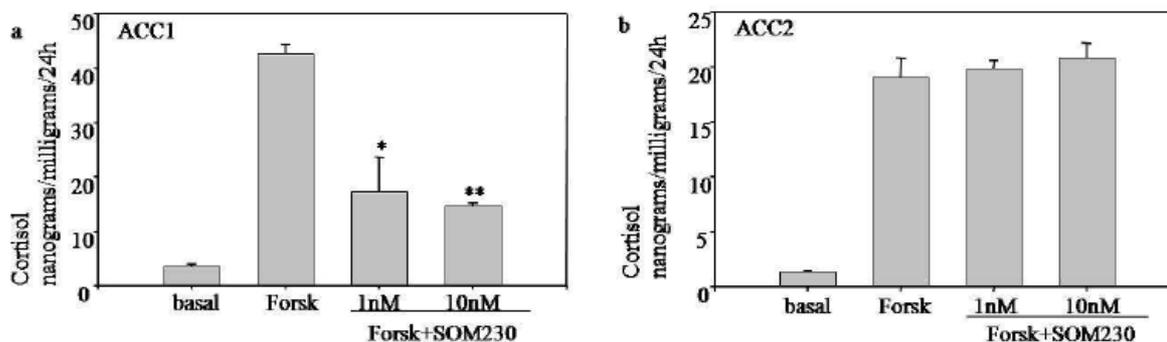


Figura 7.6 Effetto di SOM230 sulla secrezione di cortisolo su due colture primarie di carcinoma della corticale del surrene. I dati sono espressi in milligrammi di cortisolo per milligrammo di proteina dopo 24 ore di trattamento con SOM230 e forskolina. Gli asterischi indicano la riduzione della secrezione ormonale da parte delle cellule trattate. *P<0,05; **P<0,005.

7.4.4 Effetto di SOM230 sulla secrezione di aldosterone in colture primarie di APA

Le secrezioni ormonali di tre colture primarie, ottenute da adenomi secernenti aldosterone, sono state analizzate in seguito a stimolazione della produzione di aldosterone indotta da angiotensina II e successiva incubazione per 24 ore con concentrazioni di SOM230 (1nM e 10nM).

In tutte e tre le colture la concentrazione di farmaco 10nM sortisce una spiccata e significativa diminuzione della secrezione di aldosterone, mentre l'effetto di SOM230 1nM appare essere nullo (figura 7.7 A, B, C).

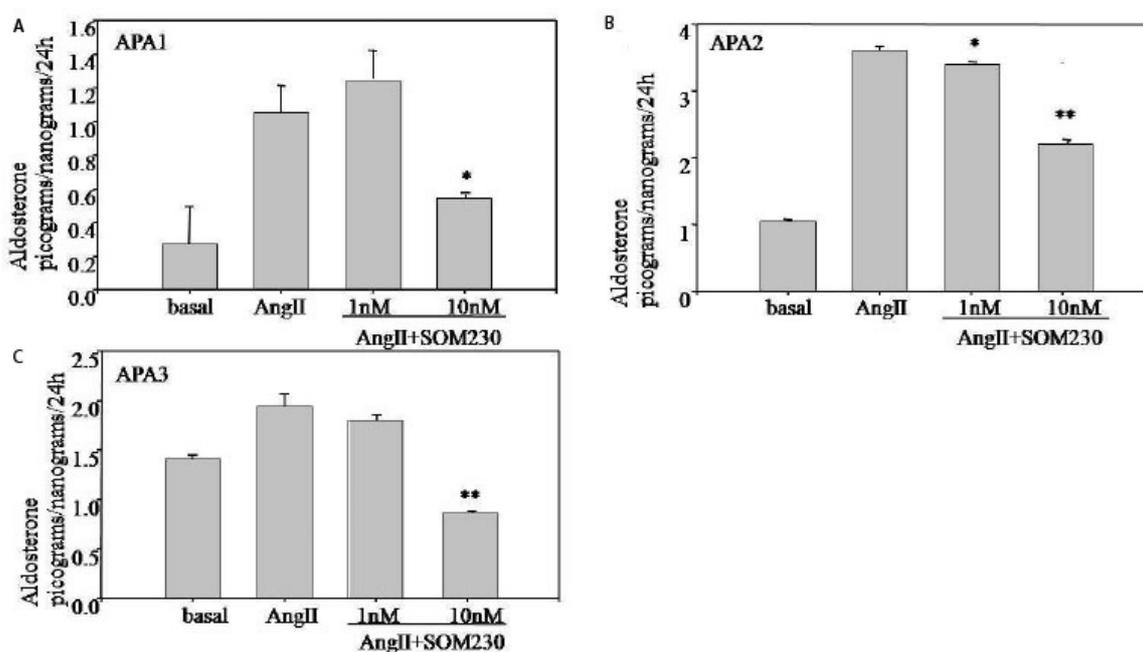


Figura 7.7 Effetto di SOM230 sulla secrezione di aldosterone su tre colture primarie di adenoma secernente aldosterone. I dati sono espressi in picogrammi di aldosterone per milligrammo di proteina. Gli asterischi indicano la riduzione della secrezione ormonale da parte delle cellule trattate. *P<0,05; **P<0,005.

7.4.5 Confronto tra espressione dei recettori SST nei tessuti e risposta ex vivo a SOM230

Sono stati messi a confronto i dati relativi al profilo d'espressione dei recettori per la somatostatina nei tessuti dai quali sono state ricavate le colture primarie, con i risultati di queste ultime al trattamento con SOM230.

Il raffronto è visualizzato nella tabella 7.3 di seguito riportata:

	SSTR1 Ct	SSTR2 Ct	SSTR3 Ct	SSTR4 Ct	SSTR5 Ct	Risposta ex vivo a SOM230
ACC1	37	31	39	ind	33	positivo
ACC2	ind	35	ind	ind	36	negativo
APA1	33	28	ind	ind	36	positivo
APA2	28	26	ind	ind	ind	positivo
APA3	ind	33	ind	ind	ind	positivo

Tabella 7.3 Correlazione tra l'espressione dei cinque SSTR e la risposta ormonale al trattamento con SOM230. Sono riportati i valori medi dei Ct per ciascun recettore, "ind" indica valore indeterminato (gene non espresso). "Positivo" indica la riduzione della secrezione ormonale dopo trattamento con SOM230, mentre "negativo" indica nessuna riduzione.

Dall'osservazione della tabella risulta che il recettore sempre presente e maggiormente espresso nei campioni responsivi al trattamento è SST2. Esso è presente anche nel carcinoma il cui trattamento con SOM230 non ha dato variazioni nella secrezione di cortisolo, ma il livello d'espressione di SSTR2 in ACC2 è basso, con un Ct di 35.

7.5 Analisi del profilo d'espressione di VEGF, EG-VEGF e dei loro recettori nei tessuti surrenalici normali e tumorali

In questa parte dello studio abbiamo studiato il profilo di espressione dei principali fattori angiogenici nei campioni di surrene normali e tumorali con la metodica in Real Time PCR SYBR green.

7.5.1 Espressione di VEGF e EG-VEGF nelle cellule H295R

L'RNA delle cellule H295R è stato retrotrascritto e sul cDNA prodotto è stata valutata l'espressione dei fattori angiogenici VEGF e EG-VEGF, mediante *Real-Time* PCR quantitativa. I valori di Ct ottenuti sono 23,1 per VEGF e 27,7 per EG-VEGF; il Ct della β -actina è 19,7.

7.5.2 Espressione di VEGF, EG-VEGF e dei loro recettori nei tessuti controllo di surrene

Il profilo d'espressione nel surrene normale dei geni VEGF, VEGFR1, VEGFR2, EG-VEGF e PROKR1, emerso dall'analisi dei 7 campioni surrenalici normali a nostra disposizione, è stata determinato attraverso il confronto dei valori ottenuti dalla sottrazione del valore medio dei Ct della β -actina ($19,6 \pm 0,7$) al Ct medio di ciascun gene. I valori così calcolati sono stati i

seguenti: VEGF 24,78±1,31; VEGFR1 27,47±1,31; VEGFR2 26,62±1,18; EG-VEGF 29,32 ±1,97; PROKR1 33,27±2,69. Tutti i geni erano presenti in ciascun campione studiato.

7.5.3 Espressione dei recettori VEGF, EG-VEGF e dei loro recettori nei tessuti tumorali di surrene

È stata determinato, sempre con la tecnica di real-time PCR quantitativa, il *pattern* d'espressione dei geni coinvolti nell'angiogenesi in 11 ACC, 20 APA e 11 CPA a nostra disposizione.

Sebbene i geni si siano rivelati espressi in tutti i campioni, eccetto il gene PROKR1, i valori di Ct ($\Delta Ct = Ct \text{ del gene } target - Ct \text{ del gene } housekeeping \beta\text{-actina}$) all'interno di ciascuna categoria sono molto variabili e il valore medio di ΔCt presenta una deviazione standard talvolta piuttosto elevata a causa di ciò.

Osservando i dati riportati in tabella 7.4, si può notare come VEGF sia un gene fortemente espresso in NA, ACC; APA, CPA, così pure i suoi recettori VEGFR1 e VEGFR2.

EG-VEGF, fattore angiogenetico tipico delle ghiandole endocrine, è altresì espresso, sebbene non ai livelli di VEGF in tutti i campioni studiati, a differenza del gene per il suo recettore PROKR1, comunque presente in una buona parte di tessuti, con percentuali che variano nell'intervallo del 100% per i NA e il 72,7% per ACC e CPA. Colpisce il dato riguardante il ΔCt di PROKR1 nei carcinomi: sebbene non espresso nella totalità dei tessuti, il livello medio di ΔCt risulta maggiore rispetto sia ai tessuti normali che rispetto agli altri tessuti tumorali.

	VEGF	VEGFR1	VEGFR2	EG-VEGF	PROKR1
NA	7/7 100% ΔCt 5,18±1,67	7/7 100% ΔCt 7,21±,85	7/7 100% ΔCt 7,02±1,64	7/7 100% ΔCt 9,70±2,22	7/7 100% ΔCt 13,67±2,24
ACC	11/11 100% ΔCt 4,93±1,93	11/11 100% ΔCt 7,85±2,83	11/11 100% ΔCt 6,48±1,75	11/11 100% ΔCt 8,29±6,88	8/11 72,7% ΔCt 10,63±5,73
APA	20/20 100% ΔCt 5,00±1,27	20/20 100% ΔCt 6,56±1,77	20/20 100% ΔCt 7,11±1,60	20/20 100% ΔCt 9,30±3,07	18/20 90% ΔCt 14,30±1,41
CPA	11/11 100% ΔCt 5,84±1,86	11/11 100% ΔCt 6,32±0,73	11/11 100% ΔCt 7,19±1,38	11/11 100% ΔCt 10,99±2,22	8/11 72,7% ΔCt 13,67±2,24

Tabella 7.4 Espressione di VEGF, EG-VEGF, VEGFR1, VEGFR2 e PROKR1 nei tessuti surrenalici. Il valore percentuale indica la percentuale di campioni che esprimono il gene. Legenda: °numero campioni positivi /numero campioni totale; ΔCt indicato come valore medio±deviazione standard

	VEGF	VEGFR1	VEGFR2	EG-VEGF	PROKR1
ACC	°7/11 (64%)	°6/11 (55%)	°5/11 (45%)	°7/11 (64%)	°4/11 (36%)
APA	°11/20 (55%)	°12/20 (60%)	°8/20 (40%)	°9/20 (45%)	°5/20 (25%)
CPA	°2/11 (18%)	°4/11 (36%)	°1/11 (9%)	°3/11 (27%)	°1/11 (9%)

Tabella 7.5 Sovraespressione di VEGF, EG-VEGF, VEGFR1, VEGFR2 e PROKR1 nei tessuti surrenalici tumorali normalizzati rispetto ai controlli. Legenda: °campioni con un incremento ≥ 2 /totale dei campioni; (%) percentuale di casi positivi con overespressione sul totale dei campioni per categoria.

Oltre alla determinazione dei ΔCt relativi a ciascun gene di ciascun gruppo di campioni, è stato calcolato anche di quante volte cambia l'espressione genica tra due categorie di campioni con la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (tabella 7.5). Sono stati considerati overespressi i valori di $2^{-\Delta\Delta Ct}$ maggiori o uguali a due.

I carcinomi sono il gruppo con più casi di overespressione dei geni studiati: VEGF è a livelli pari o uguali al doppio rispetto ai tessuti normali nel 64% dei casi, più ce in APA (55%) e CPA(18%). Il 64% di campioni di ACC presenta inoltre una sovraespressione di EG-VEGF, contro il 45% degli APA e il 27% dei CPA. Per quanto concerne i recettori, ad esclusione del recettore VEGFR1 che è iperespresso nel 60% dei nostri APA e nel 55% e 36% di CAP rispettivamente, i carcinomi presentano una casistica maggiore di overespressione dei recettori. Interessante è notare come nei CPA vi siano pochi pazienti che abbiano uno dei geni studiati considerati overespressi, mostrando un andamento poco dissimile a quello riscontrato in NA.

La distribuzione della sovraespressione relativa a ciascun gruppo di tessuti analizzato è meglio apprezzabile nei grafici riportati in figura 7.8.

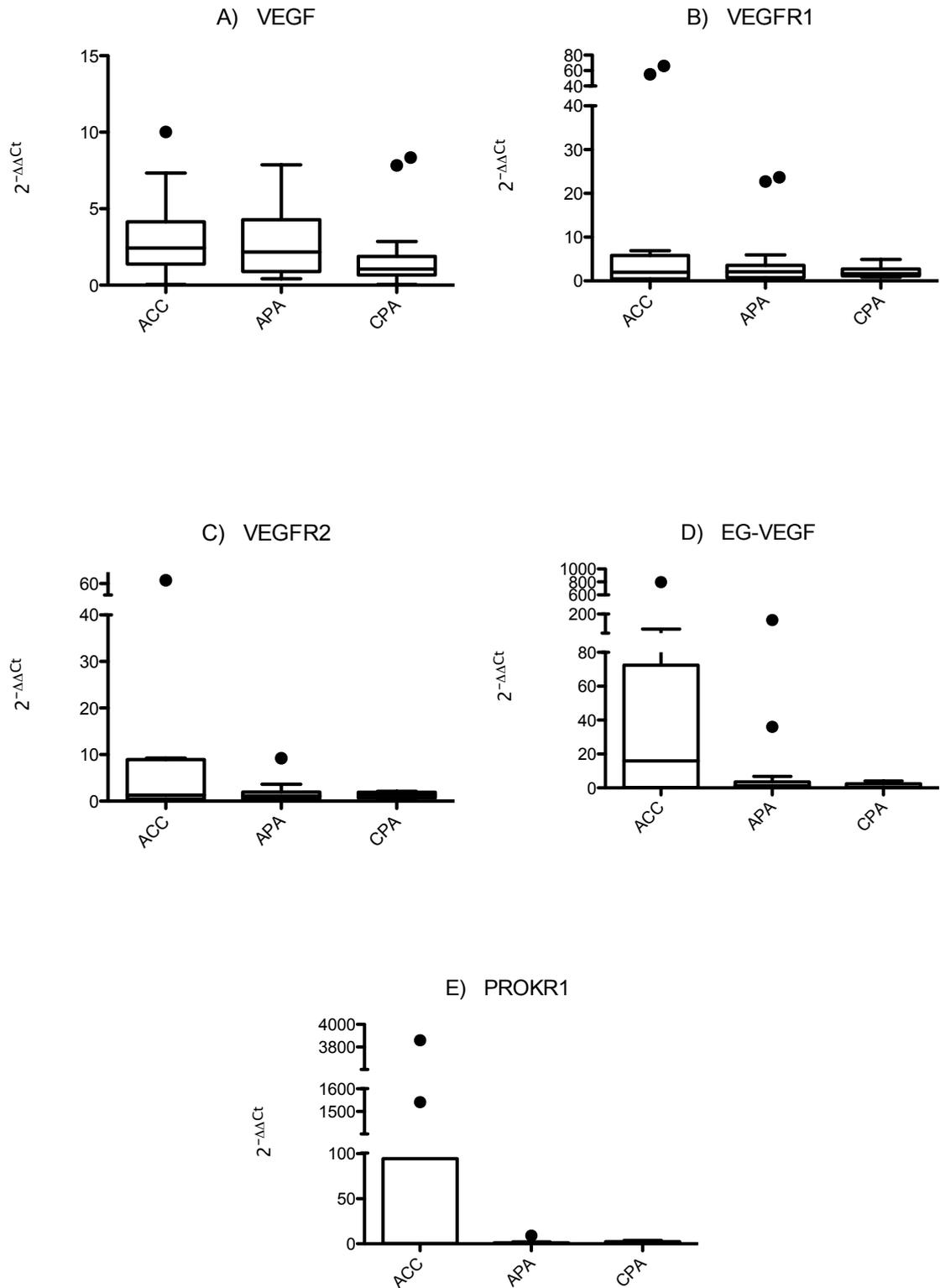


Figura 7.8 Overespressione dei geni VEGF (A), VEGFR1(B), VEGFR2 (C), EG-VEGF (D) e PROKR1 (E) in tessuti di ACC, APA e CPA. L'overespressione rispetto ai NA è stata calcolata come $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Come già ribadito, nei carcinomi, seguiti dagli adenomi secernenti aldosterone, vi è un comportamento poco omogeneo a livello di espressione, essendovi dei campioni che si discostano marcatamente rispetto al valore della media della categoria. In particolare, vi sono due pazienti con un *fold increase* di EG-VEGF rispetto ai NA superiore a 100 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ pari a 138 e 798), e quattro pazienti superiore a 15. Negli stessi ACC i recettori per lo stesso gene, anch'essi con un'espressione poco omogenea all'interno della categoria in esame, si sono rivelati essere overespressi solo in uno dei due ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ uguale a 3,7), mentre i campioni con un *fold increase* di 3859 e 1541 hanno valori di $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per EG-VEGF di 72,46 e 48,50 rispettivamente.

7.6 Effetto di SOM230 sull'espressione di fattori angiogenici in cellule H295R

Le cellule della linea di carcinoma surrenalico H295R sono state trattate con ACTH, ormone che fa aumentare l'espressione di VEGF, e trattate con concentrazioni nanomolari e micromolari di SOM230 per 24 ore. Successivamente è stato estratto l'RNA ed è stato analizzato mediante real-time PCR quantitativa l'mRNA relativo ai geni VEGF e EG-VEGF.

Dal grafico della figura 7.9 (A) si può notare un decremento dell'mRNA di VEGF quando si trattano le cellule con concentrazioni di SOM230 pari a $10^{-6}M$ e $10^{-8}M$, mentre la prima concentrazione porta l'espressione di VEGF a livelli basali, la seconda fa decrescere la produzione di VEGF di più del 50% rispetto alle cellule trattate con ACTH e di circa il 33% rispetto alle basali.

Un analogo effetto si riscontra nell'analisi dell'mRNA di EG-VEGF. Dopo 24 ore di trattamento con SOM230 $10^{-6}M$ i livelli d'espressione del gene sono riportati allo stato basale, mentre con concentrazioni di SOM230 $10^{-8}M$ si ha il 25% in meno di mRNA di EG-VEGF rispetto al basale e il 50% in meno rispetto alle cellule stimulate con ACTH (figura 7.9 B).

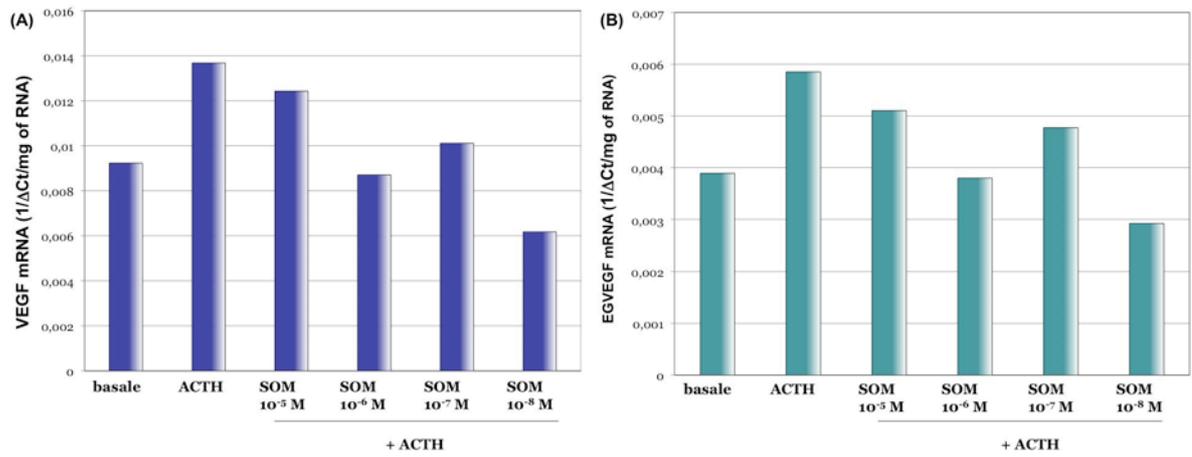


Figura 7.9 Espressione di VEGF (A) e EG-VEGF (B) in cellule H295R trattate con dosi decrescenti di SOM230. Dati espressi come l'inverso del ΔC_t diviso per i milligrammi di RNA estratto.

8. Discussione

In questo studio abbiamo analizzato l'espressione dei recettori della somatostatina e dei principali fattori angiogenici in tessuti surrenalici normali e in tessuti surrenalici provenienti da pazienti diagnosticati con carcinoma della corticale del surrene, o adenoma secernente aldosterone o adenoma secernente cortisolo.

La prima parte dell'analisi è stata focalizzata sui recettori SST, SSTR1-5. Abbiamo voluto innanzitutto dimostrare la loro espressione nel surrene normale e successivamente in campioni di tessuti tumorali. In letteratura, uno studio [25] svolto mediante tecniche di *Southern blot* e immunohistochimica (IHC) ha identificato tutti e cinque i recettori nel surrene, inoltre i dati relativi alla loro espressione, rilevata mediante IHC o southern blot, variavano nei diversi tumori della corticale del surrene [144-146]. Non sono comunque presenti studi sull'espressione di mRNA di SSTR, rilevata con la tecnica di real time PCR quantitativa, una tecnica molto più sensibile ed accurata, in una discreta casistica di carcinomi surrenali.

L'analisi del messaggero condotta sui nostri campioni è stata poi confermata a livello proteico con IHC. I risultati da noi trovati discordano con quanto presente in letteratura [25, 145], ossia la presenza di tutti e cinque i recettori SST in tessuti di surrene normale (NA), avendo noi riscontrato un'alta e diffusa espressione di SSTR2, seguita da SSTR5 e infine da SSTR1, mentre SSTR3 e SSTR4 risultavano assenti.

La presenza di un sottotipo recettoriale in un tumore potrebbe essere rilevante, in quanto potrebbe influenzare la risposta agli analoghi della somatostatina. Infatti, mentre SSTR1,-2,-3,-4 e-5 inducono arresto del ciclo cellulare [23], SSTR2, ma soprattutto SSTR3 sembra essere associato con l'apoptosi [147, 148]. Interessante è il fatto che SSTR3 non è espresso nei nostri NA, ma è presente nel 53,8% dei carcinomi della corticale del surrene (ACC) e nel 24% degli adenomi secernenti aldosterone (APA), sebbene non ad alti livelli ad eccezione di un ACC.

Florio e collaboratori nel 2003 dimostrarono che la somatostatina è un potente agente antitumorale in vivo che inibisce l'angiogenesi tumorale attraverso l'inibizione, mediata da SSTR3, dell'attività sia dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) sia delle MAP chinasi [149]. La presenza quindi di SSTR3 in ACC potrebbe essere determinante nella regolazione dell'angiogenesi nel cancro corticosurrenalico.

La presenza di mRNA di SSTR1 e SSTR5 nella gran parte dei nostri ACC, il ritrovamento di SSTR2 in tutti gli ACC e l'espressione di SSTR4 nel 31% di questi pazienti fanno pensare a

un ruolo per gli analoghi della somatostatina nei carcinomi della corticale del surrene. I nostri dati sono in disaccordo con quelli di Unger e colleghi, i quali recentemente hanno riscontrato una rara espressione dei recettori SST negli ACC mediante IHC [144], e che, pochi anni prima, osservarono percentuali variabili di espressione di SSTR2 e SSTR4 in tutti loro campioni di ACC e metà di essi positivi allo *staining* di SSTR5 e SSTR3 [145].

Nei campioni di APA presenti nella nostra banca tessuti, abbiamo trovato l'espressione di SSTR1 e SSTR2 in tutti i tumori, in accordo con quanto riscontrato attraverso IHC [144]. L'espressione di SSTR5 risulta assente in alcuni campioni, mentre è molto bassa nei restanti eccetto che in un paziente. In nessuno, comunque, è stato riscontrato SSTR4.

Il gruppo costituito da tessuti di adenomi secernenti cortisolo (CPA) è caratterizzato dalla forte presenza di SSTR2, ma anche SSTR5 e SSTR1 sono espressi, a differenza di SSTR3 e SSTR4. Contrariamente, il lavoro di Unger ha evidenziato uno *staining* positivo in un numero inferiore o uguale al 60% delle cellule tumorali per SSTR3 e al 30% per SSTR4[144].

In questo studio abbiamo dimostrato la corrispondenza tra l'espressione dell'RNA messaggero dei recettori SST e la presenza della proteina corrispondente nei nostri tumori del surrene. Per questa analisi immunostochimica abbiamo raccolto 6 campioni di ACC, 5 di APA e 3 di CPA e i dati molecolari sono stati confermati da *immunostaining*, dimostrando quindi che dall'mRNA trascritto viene, dopo tutti i passaggi necessari, codificata la proteina del recettore della somatostatina.

La conferma dell'espressione dei recettori nei nostri tessuti, sebbene questa sia variabile in ciascun gruppo di pazienti, ci ha portati ad analizzare i possibili effetti di farmaci analoghi della somatostatina su questi campioni, in particolare gli effetti di SOM230. Esso è un analogo a largo spettro già oggetto di alcuni *trial* clinici, i cui effetti sul rilascio dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e della crescita (GH) sono stati valutati in tumori umani dell'ipofisi e in linee cellulari ipofisarie murine [33, 150, 151], nonché in linee cellulari ipofisarie di ratto, ma non sono presenti dati riguardanti le cellule corticali del surrene.

Una delle funzioni di queste cellule è la produzione di ormoni glucocorticoidi e mineralcorticoidi, sintetizzati rispettivamente nella zona fascicolata e nella zona glomerulosa, tra cui si annoverano il cortisolo e l'aldosterone. Considerata la letteratura presente, siamo andati ad esaminare se SOM230 influiva o meno sul rilascio di ormoni. A questo scopo abbiamo effettuato esperimenti *in vitro* sul nostro modello cellulare d'elezione, la linea di

carcinoma della corticale del surrene H295R, ed *ex vitro*, allestendo colture primarie da pezzi operatori provenienti dalla chirurgia di due carcinomi della corticale del surrene e di tre adenomi secernenti aldosterone. Abbiamo trovato nelle cellule H295R una forte espressione di SSTR5 e SSTR2, come anche nei nostri ACC e CPA, e solo parzialmente nei nostri APA.

Prima di trattare le cellule con il farmaco, abbiamo stimolato e incrementato la loro produzione ormonale con due sostanze, la forskolina per il cortisolo negli ACC e nella linea H295R e l'angiotensina II per l'aldosterone negli APA e nelle cellule H295R. Analizzando il terreno di coltura delle cellule H295R dopo 24 ore, abbiamo verificato che la secrezione di entrambi gli ormoni era diminuita marcatamente in seguito a somministrazione di SOM230 a concentrazioni nanomolari. La riduzione del cortisolo nelle cellule surrenaliche è in accordo con un recente lavoro sull'uso di un analogo della somatostatina, in un caso di sindrome di Cushing ectopico, che ha portato il cortisolo libero nell'urina a livelli normali [152]. Alla luce di quanto osservato, si potrebbe ipotizzare che SSTR2 e SSTR5 sono implicati nella regolazione della steroidogenesi nelle cellule surrenaliche e potrebbero quindi essere utilizzati per inibirla.

Considerando che singole cellule, tessuti ed organi esprimono spesso più di un sottotipo SSTR, che i recettori possono interagire tra loro o con altre famiglie recettoriali e che la distribuzione dei SSTR varia tra specie [31], il potenziale terapeutico del ligando SOM230 può essere esplorato in casi specifici. Nei cinque tumori del surrene da noi analizzati (2 ACC e 3 APA) abbiamo riscontrato una marcata diminuzione della secrezione ormonale (in dettaglio, cortisolo in un ACC e aldosterone in tutti e tre gli APA). Tutti questi tumori sono caratterizzati da un'evidente espressione di SSTR2, mentre è assente quella relativa ai recettori SSTR3 e SSTR4, mentre è risultata variabile l'espressione di SSTR1 e SSTR5. L'unico caso di risposta negativa a SOM230 è stato un ACC privo di SSTR1, -3 e -4 e con una espressione molto debole di SSTR2 e -5 se comparata con gli altri tumori studiati.

I nostri risultati supportano l'idea dell'uso di analoghi della somatostatina ad ampio spettro nel trattamento delle malattie del surrene. Sono comunque necessari ulteriori studi *ex vivo*, soprattutto riguardanti i carcinomi, ma la rarità di questa patologia rende l'analisi molto ardua.

In una terza parte dello studio, una volta caratterizzati i profili recettoriali dei pazienti e della linea cellulare immortalizzata di carcinoma della corticale del surrene (H295R), abbiamo

studiato l'effetto dell'analogo SOM230 e dell'analogo octreotide sulla proliferazione cellulare *in vitro* ed *ex vivo*. Cellule H295R e cellule di due carcinomi corticosurrenali sono state incubate con concentrazioni decrescenti dei due farmaci per 24, 48 e 72 ore ed è stato effettuato il test di proliferazione cellulare MTT. Sfortunatamente, i dati raccolti non mostrano un effetto citostatico da parte di SOM230 e octreotide sulle cellule di ACC utilizzate. Questo ritrovamento non esclude, ma anzi suggerisce, in accordo con i risultati di SOM230 sulla secrezione ormonale, l'uso combinato del farmaco con altri agenti antitumorali nei carcinomi del surrene.

Poiché SOM230 è un analogo della somatostatina che lega con alta affinità i recettori 1, 2, 3 e 5 della somatostatina [35] (un'affinità maggiore rispetto a quella dell'analogo octreotide [16]), la maggiore espressione dei vari SSTR, particolarmente nei carcinomi, suggerisce un ruolo terapeutico nei tumori surrenali per questo analogo a largo spettro. Questa conclusione è supportata dal ritrovamento che SOM230 è in grado di influire sulla secrezione ormonale nelle cellule surrenalico, sebbene siano necessari per confermare questi risultati preliminari altri esperimenti *in vitro* e *ex vivo*.

Nell'ultima parte dello studio ci siamo focalizzati sull'espressione dei fattori angiogenetici nel surrene.

L'aumentata espressione del recettore SST1 riscontrata in alcuni carcinomi e negli iperaldosteronismi primari sembra essere promettente in ambito anti-angiogenico, in quanto un recente lavoro di Bocci e colleghi ha dimostrato come SSTR1 sia implicato nell'angiogenesi tumorale [36]. Alla luce di ciò abbiamo analizzato l'espressione di molecole pro-angiogeniche quali VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), una delle molecole maggiormente coinvolte nell'angiogenesi, di EG-VEGF (*Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor*), un mitogeno scoperto di recente che è stato dimostrato avere effetti angiogenici sull'endotelio di ghiandole endocrine. Sebbene il surrene sia stato uno dei primi tessuti in cui EG-VEGF è stato isolato [129] e vi siano studi riguardanti VEGF in questo organo [71, 153], in letteratura non sono presenti informazioni sull'espressione dei fattori angiogenici nei tumori surrenalici umani.

Mediante real-time PCR quantitativa abbiamo caratterizzato l'espressione dei geni VEGF-A (VEGF) e dei suoi due recettori VEGFR1 e VEGFR2, EG-VEGF e del suo recettore

PROKR1, tralasciando per ora i geni della stessa famiglia primariamente coinvolti nella linfoangiogenesi.

Nei tessuti di surrene normale abbiamo riscontrato l'espressione di tutti i geni studiati, e in particolare una marcata espressione di VEGF e dei suoi due recettori, seppur a livello non parimenti elevato, in accordo con il fatto che il surrene è un organo altamente vascolarizzato [71, 153].

Al contrario dei controlli costituiti da tessuti surrenali normali, i tessuti tumorali hanno mostrato livelli di espressione disomogenei. Seppur presenti nella totalità dei campioni, all'interno di ciascuna categoria questi geni sono espressi con una certa variabilità. Mentre non vi sono sostanziali differenze tra NA e CPA, i più eclatanti risultati si sono riscontrati nei carcinomi. In questo gruppo vi è l'overespressione in più della metà dei campioni di VEGF, VEGFR1 e EG-VEGF, ma due ACC hanno rivelato livelli di mRNA più di cento volte maggiori rispetto ai NA. Due diversi ACC presentavano un simile andamento per il gene PROKR1.

Negli adenomi secernenti aldosterone il gene più sovraespresso era VEGFR1 (60% dei pazienti), seguito dal ligando VEGF (55%), facendo supporre una preferenzialità della segnalazione di questo fattore angiogenico attraverso il recettore 1.

I risultati degli esperimenti svolti trattando cellule H295R con concentrazioni decrescenti di SOM230 mostrano un effetto marcato sulla riduzione dei livelli di mRNA di VEGF e EG-VEGF soprattutto alla concentrazione di 10^{-8} M in entrambi i geni analizzati, portando la loro espressione al di sotto dei normali livelli basali; naturalmente sono necessari ulteriori studi *in vitro* e soprattutto *ex vivo* per verificare l'eventuale relazione tra l'abbassamento della secrezione ormonale e l'inibizione dell'espressione di VEGF.

Gli analoghi della somatostatina potrebbero quindi inibire l'angiogenesi direttamente attraverso i recettori della somatostatina e indirettamente attraverso l'inibizione della secrezione di fattori di crescita come IGF-1 e VEGF [36]; in futuro potrebbe essere possibile utilizzare terapie farmacologiche personalizzate a seconda del profilo d'espressione recettoriale del paziente.

Queste osservazioni, sommate alle considerazioni precedenti, corroborano l'idea di un possibile uso di SOM230 nel trattamento di patologie surrenaliche in combinazione con altri farmaci.

9. Introduzione (I)

Un approccio allo studio dei tumori della corticale del surrene riguarda l'approfondimento delle vie di segnalazione molecolari coinvolte nello sviluppo embrionale della ghiandola surrenalica e del suo mantenimento nell'età adulta, e nell'osservazione di come queste siano eventualmente mutate in caso di patologia.

9.1 Sonic Hedgehog

Una delle molteplici vie di segnalazione basilari nello sviluppo embrionale è quella della famiglia di ligandi *Hedgehog* (Hh). Essa comprende tre proteine, *Sonic Hedgehog* (SHH), *Desert Hedgehog* (DHH) e *Indian Hedgehog* (IHH), le quali sono implicate nei processi di *fate specification*, ovvero di determinazione del destino di una cellula, di definizione degli assi corporei, di proliferazione e di sopravvivenza cellulare.

Hh fu inizialmente scoperto da Christiane Nüsslein-Volhard e Eric Wieschaus circa 30 anni fa come gene di “segmentazione-polarità” che controlla il *pattern* di formazione della cuticola negli embrioni di *Drosophila Melanogaster*[154] In seguito, con il clonaggio molecolare di Hh e la scoperta nei primi anni '90 della sua controparte nei vertebrati, sono stati compiuti enormi progressi nell'individuazione del ruolo di Hh e della sua via di segnalazione nello sviluppo degli organismi e di patologie. Il malfunzionamento della Hh, infatti, può contribuire a diverse patologie umane, tra cui malformazioni durante sviluppo embrionale, quali la sindrome di Gorlin, detta anche o Sindrome del carcinoma nevoide a cellule basali (NBCCS, *Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome*), una condizione che colpisce diverse parti del corpo e aumenta il rischio di sviluppare tumori, e la sindrome di cefalopolisindattilia di Greig, un disordine che riguarda lo sviluppo di arti, testa e faccia, e cancro, incluso il carcinoma a cellule basali e il medulloblastoma [155, 156].

Un segno contraddistintivo di Hh è la sua abilità di agire ad ampio raggio di controllare il destino delle cellule in funzione della concentrazione di Hh, attraverso la formazione di gradienti.

9.2 Via di segnalazione di Hedgehog durante l'embriogenesi

Hedgehog esercita la sua azione biologica attraverso una cascata di segnali che culmina in una alterazione del bilancio tra le forme attivatrici e repressorie della famiglia Gli, una famiglia di fattori di trascrizione *zinc-finger*, denominate Gli^A e Gli^R.

Il sistema recettoriale di Hedgehog consiste in *Patched* (Ptc), una proteina costituita da 12 domini transmembrana che funge da recettore, e da *Smoothed* (Smo), una proteina anch'essa transmembrana ma formata da soli 7 domini, che ha il ruolo di trasduttore obbligato attraverso la membrana plasmatica.

In assenza di Hh, Ptc blocca l'attività di Smo provocando di conseguenza il processamento proteolitico delle proteine Gli, il quale genera una forma di Gli^R troncata all'estremità C-terminale che reprime attivamente un insieme di geni *target* di Hh.

Il legame di Hh a Ptc libera Smo e gli permette di svolgere il suo ruolo, bloccando la produzione di Gli^R e promuovendo l'attivazione di Gli^A. Mentre in *Drosophila* sono presenti un solo gene *hh* e un solo omologo di Gli, denominato *Cubitus interruptus* (Ci), la trasduzione del segnale di Hh nei vertebrati coinvolge sia tre ligandi (*Sonic hedgehog*, *Indian hedgehog* e *Desert hedgehog*), sia molteplici fattori di trascrizione Gli (Gli1, Gli2 e Gli3) [157]. La funzione repressoria di Gli nei vertebrati è principalmente svolta da Gli3, mentre la primaria attività di Gli^A è operata in larga parte da Gli2. Gli1 è un *target* trascrizionale di Hh e agisce come attivatore trascrizionale per rinforzare la funzione di Gli^A.

Mediante l'analisi di topi mutanti per Gli2 e Gli3 sono stati scoperti un inaspettato complesso e un utilizzo differenziale delle funzioni di Gli^A e Gli^R in vari processi dipendenti da Hh durante l'embriogenesi. Ad esempio Shh agisce come mitogeno e promuove la differenziazione cellulare in molti tessuti embrionali ed adulti. Nell'epidermide embrionale la funzione di Gli^A è essenziale per la proliferazione cellulare dipendente da Shh e l'overespressione di Gli1 o Gli2 può indurre tumorigenesi spontanea nella pelle [158-160], mentre la perdita di funzione di Gli3 ha effetti minimi sullo sviluppo del follicolo pilifero e non è in grado di ripristinare la proliferazione cellulare nella pelle di animali Shh^{-/-} [161]. In molti altri tessuti la funzione di Gli^A non è essenziale per la proliferazione Shh-dipendente e Shh sembra funzionare principalmente attraverso la prevenzione dell'azione di Gli3/ Gli^R. Vi è inoltre l'evidenza che Gli^{3R} può bloccare il segnale di Wnt, un'altra via di segnalazione basilare nell'embriogenesi e nel mantenimento dei tessuti adulti, nonché implicata in processi tumorigenici, legandosi a β -catenina e inibendo la sua attività di attivatore trascrizionale [162]. Questo meccanismo può valere per molti contesti, quali il tubo neurale nei vertebrati, in Hh e Wnt promuovono la proliferazione cellulare in maniera cooperativa o interdipendente. Uno studio in silico sul genoma ha inoltre predetto un alto numero di *enhancer* nei mammiferi con siti di legame sia per Gli che per Tcf [163], suggerendo che la condivisione di elementi

enhancer può rappresentare un meccanismo comune integrante i segnali della via di Hh e di Wnt. dipendentemente dal contesto, quindi, Shh regola la proliferazione cellulare attraverso una varietà di meccanismi che coinvolgono l'attività di Gli^A o la repressione di Gli^B.

Il segnale innescato da Shh utilizza diversamente Gli^A o Gli^B per controllare l'espressione di distinti gruppi di proteine a omeodominio, capaci di legarsi quindi al DNA, in differenti progenitori di popolazioni cellulari [164]. Similmente, Gli^A e Gli^R influiscono su diversi insiemi di *target* durante lo sviluppo dello sclerotomo indotto da Shh [165], ma come comunque Gli^A e Gli^R regolino l'espressione di differenti *set* di geni *target* non è ancora conosciuto, poiché esse si legano a sequenze consenso e regioni genomiche simili [163, 166, 167]. È molto probabile che altre vie di segnalazione o fattori di trascrizione influenzino l'espressione dei geni *target* di Gli. Inoltre proteine Gli come Gli3 possono anche legarsi a promotori *target* attraverso altre proteine che legano il DNA [167].

9.3 Via di segnalazione di Hedgehog nell'omeostasi dei tessuti e nella tumorigenesi

Il *pathway* di Hh è implicato nel mantenimento di cellule staminali o progenitrici in molti tessuti adulti, inclusi gli epitelii di molti organi interni e il cervello [168]. In accordo con ciò, Hh promuove una via di segnalazione che è critica per la rigenerazione dell'epitelio di prostata [169], polmoni [170] e pancreas esocrino [171]. Un aspetto importante è che, in molti di questi tessuti, una attivazione anomala della via è spesso associata a tumorigenesi. Mutazioni di componenti di questo *pathway* come Ptc e Smo, portano all'attivazione della via e sono state ritrovate nel carcinoma a cellule basali e nel medulloblastoma [172], caratterizzati da un'attivazione costitutiva della via in assenza del ligando Hh. L'attivazione dipende dal ligando però è importante per la crescita, la sopravvivenza o entrambe in una vasta quantità di tumori, inclusi quelli gastrointestinali, il cancro della prostata, tumori ematologici maligni e gliomi [168, 173, 174]. Questi tumori generalmente non generano mutazioni delle componenti della via di Hh e la loro crescita può essere soppressa con efficacia da diversi inibitori della via, come anticorpi Hedgehog-neutralizzanti e antagonisti di Smo. Queste scoperte portano al modello per cui i ligandi Hh prodotti da questi tumori, dal loro ambiente stromale o da entrambi mantengono le cellule staminali in uno stato indifferenziato e proliferativo nel tumore. È stata data piuttosto recentemente una interpretazione alternativa di queste osservazioni, sottolineando l'importanza del segnale di Hh nel promuovere il microambiente tumorale [175]. In modelli *xenograft* murini è stato dimostrato come l'attivazione della via di

Hh sia richiesta nelle cellule stromali per supportare la crescita del tumore, i ligandi Hh secreti dal tumore agiscono in maniera paracrina invece che agire sul tumore in sé, e promuovono la crescita tumorale attraverso meccanismi ancora da determinare. Si può quindi concludere che Hh influenzi la formazione del tumore, o la sua crescita o entrambe attraverso meccanismi cellulari autonomi e non autonomi.

9.4 Gradienti morfogeni di Hh e gradienti di attività di Ci/Gli

Le proteine Hh sono localmente prodotte da molti organi organizzatori, incluso il compartimento posteriore di cellule del *wing disc* di drosofila, la notocorda e la *floor plate* nei vertebrati e la ZPA (*Zone of Polarizing Activity*) degli arti in sviluppo nei vertebrati. Queste proteine secrete possono muoversi di molti diametri cellulari dalla fonte di produzione e spesso controllano l'esito dello sviluppo in una maniera dipendente dalla concentrazione [157]. Un esempio di questo funzionamento si ritrova durante la definizione del *patterning* della spina dorsale ventrale, Shh forma un gradiente che dalla parte ventrale si dirige verso la dorsale con differenti concentrazioni specificanti distinte popolazioni di progenitori neurali, e vi è l'evidenza che Shh esercita la sua influenza attraverso gradienti di attività di Gli [176].

Nello sviluppo delle ali in drosofila, i gradi di risposta al morfogeno Hh sono mediati da una differente regolazione di Ci^A e Ci^R . Quest'ultimo blocca l'espressione di un sottoinsieme di geni target di Hh come *dpp*, che codifica per una famiglia di proteine secrete TGF- β /BMP, essenziali per la crescita e la definizione degli assi dell'intera ala, mentre l'espressione degli altri geni target *ptc* e *en* è mediata da Ci^A [177]. In risposta a bassi gradienti di Shh vi è l'accumulazione di una forma intera di Ci e l'espressione di *dpp*, e ciò è stato osservato maggiormente nelle cellule anteriori che nelle posteriori; a loro volta *ptc* e *en* richiedono un più alto livello di segnale, perciò perdite parziali di Shh colpiscono l'espressione di *ptc* e *en* ma non quella di *dpp* e l'accumulazione di Ci nella forma ad intera lunghezza e non processata [178], suggerendo che è necessaria una minore quantità di Hh per bloccare il processamento di Ci rispetto a quella richiesta per la stimolazione di Ci^A . È comunque poco probabile che la regolazione tra Ci^A e Ci^R sia simile ad un interruttore "accento/spento", quanto piuttosto che avvenga un sistema a gradienti e di ciò vi è evidenza in molti passaggi della via di segnalazione, inclusi Smo e Ci [179, 180]. Prima di venire secrete, esse vanno incontro a una reazione di autoprocessazione che ne facilita il rilascio da parte della cellula

secernente e l'azione a lungo raggio, essendo queste proteine in grado di fungere da morfogeno e di agire in base a gradienti di segnalazione [181].

9.5 La via di segnalazione Hh

La via di segnalazione di Hh è attivata dal legame, nelle cellule rispondenti, del ligando Hh alla proteina transmembrana *Patched1* (Ptch1) e *Patched2* (Ptch2), promuovendo l'internalizzazione e il rilascio dell'inibizione che Ptch esercita costitutivamente su un'altra proteina transmembrana denominata *Smoothed* (Smo). Smo viene quindi fosforilata e subisce una traslocazione dagli endosomi nei quale usualmente risiede alla membrana plasmatica (figura 9.1).

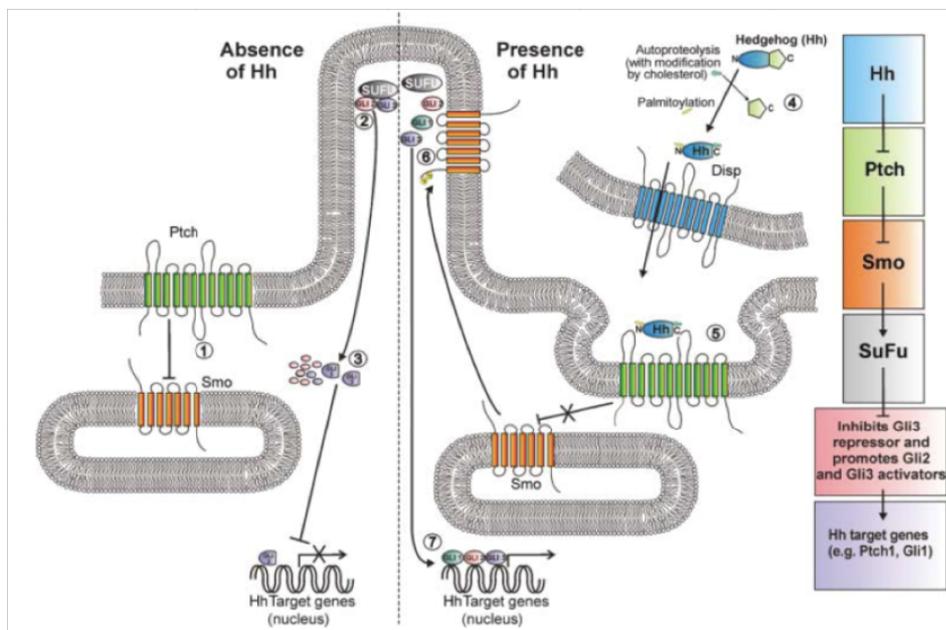


Figura 9.1 Schema della via di segnalazione di Hh in assenza o presenza del ligando [182].

Smo e Ptch agiscono attraverso un segnale di trasduzione a cascata che culmina nella modulazione dei fattori di trascrizione di tipo *zinc finger* della famiglia Gli. Nei mammiferi essa è composta da tre geni che hanno in parte funzioni ridondanti: Gli1, Gli2 e Gli3. In assenza di Hh, Gli2 e Gli3 sono espresse a livelli significativi, mentre in cellule non indotte questi fattori sono fosforilati da tre differenti chinasi e successivamente ubiquitinati. In questo modo la maggior parte di Gli2 viene degradata via proteasoma alla base del *cilium*, mentre una limitata proteolisi di Gli3 e di Gli2 porta alla rimozione di un dominio di attivazione con la conseguente produzione di due forme proteiche troncate che reprimono i geni *target* di Hh.

L'attivazione di Smo, come già accennato precedentemente, inibisce questo processo e promuove la produzione di proteine intere che fungono da attivatori trascrizionali che, una volta nel nucleo, possono quindi attivare la trascrizione dei geni *target*.

Gli1 è trascritto esclusivamente in risposta al segnale proveniente da Hh ed è dotato unicamente di funzione attivatrice per aumentare e/o prolungare l'espressione dei geni bersaglio di Hh. Gli1 agisce così insieme a Gli2 e Gli3, sebbene sia stato osservato che la perdita di Gli1 non causa difetti nella segnalazione di Hh [183].

Due sindromi cliniche hanno fatto luce sull'importanza di SHH nel corretto sviluppo surrenalico. Nella sindrome di Pallister-Hall è spesso stata riportata ipoplasia (o aplasia) surrenalica dovuta a mutazioni di Gli3 [184, 185], mentre nella sindrome di Smith-Lemli-Opitz ciò è dovuto a difetti nella sintesi del colesterolo che hanno come conseguenza una alterata segnalazione di Hedgehog [186]. Inoltre l'aplasia surrenalica che consegue all'introduzione di mutazioni di Gli3 in topi supporta l'idea dell'importanza del ruolo di Shh durante lo sviluppo surrenalico [187].

L'espressione spazialmente ristretta di Shh nelle cellule subcapsulari della corteccia surrenalica che coincide temporalmente con la formazione della capsula surrenalica [188], e la presenza di difetti nello sviluppo della corteccia surrenalica in topi *knock-out* per il gene Shh proprio durante l'inizio della formazione della capsula, portano a credere a un ruolo di Shh nella progressione della definizione del *lineage* cellulare della corteccia surrenalica determinato dall'interazione capsula-subcapsula [182].

10. Obiettivo dello studio (I)

I meccanismi di sviluppo del surrene e del suo mantenimento non sono ad oggi ancora ben definiti. Un ruolo di prima importanza in questi due processi sembra giocarlo la capsula surrenalica.

Al momento dell'inizio di questo studio non vi erano dati in letteratura riguardanti il ruolo della via segnalazione di *Hedgehog* nel surrene, ma recentemente tre gruppi hanno pubblicato tre lavori che coprono parzialmente l'argomento.

Lo scopo di questo studio, tuttora in corso e svolto da me nel laboratorio del prof. Hammer presso l'University of Michigan, è stato quello di:

- Studiare l'espressione, mediante *Real Time* PCR (qPCR), dei geni implicati nella via di segnalazione della famiglia di ligandi *Hedgehog* (Hh) in ghiandole surrenaliche di topo e nella linea cellulare di tumore corticosurrenalico murino Y1.
- Analizzare l'espressione in vivo di alcuni dei geni coinvolti nel *pathway* di Hh.
- Valutare *in vivo* l'espressione del gene *Gli1* durante i differenti stadi dello sviluppo del surrene murino.
- Valutare *in vivo* l'effetto dell'overespressione condizionale del gene *Smoothed* sulla ghiandola surrenalica murina.

11. Materiali e metodi (I)

11.1 Colture cellulari

La linea cellulare Y1, derivante da un tumore della corteccia surrenalica murina, è stata ottenuta dall' "American Type Culture Collection" (CCL79, ATCC, Rockville, MD).

Le cellule sono state cresciute in terreno DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) supplementato con siero bovino fetale (FBS, Fetal Bovine Serum) al 2,5%, siero equino al 7,5%, e antibiotico (penicillina/streptomina 100µg/ml). Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C con 5% CO₂.

11.2 Linee murine

Tutti gli esperimenti svolti implicanti topi sono stati svolti in accordo con le linee guida istituzionali e dell' *University of Michigan*.

I topi qui di seguito menzionati sono stati acquistati dal Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA).

Per uno studio preliminare, atto all'individuazione dell'eventuale espressione dei fattori della via di segnalazione di sonic hedgehog e ai relativi siti di espressione, svolto in collaborazione con il Dr. A. Dlugosz, sono state utilizzate le seguenti linee di topo: Gli1LacZ, Ptch1LacZ, ShhLacZ e R26Cre.

Questo tipo di studio sfrutta il sistema della Cre-ricombinasi, un enzima che riconosce delle particolari sequenze, dette "loxP", del batteriofago P1 e, in presenza di queste, esegue un taglio del DNA. Questo sistema trova diversi impieghi, tra cui il *knock-out* condizionale di un gene: mettendo l'espressione di Cre sotto un particolare promotore è possibile ottenere un'espressione sito-specifica e non ubiquitaria nell'organismo dell'animale, permettendo così l'indagine di tutte quelle proteine la cui assenza totale risulta letale nei primi stadi della vita. Per quanto riguarda l'obiettivo di questi esperimenti, l'espressione della Cre-ricombinasi è mirata nel *locus* ubiquitario ROSA26 (linea che chiameremo per comodità R26Cre), mentre il gene per la β-galattosidasi è inserito nei geni di interesse, ossia:

- *gli1* (topi 129S6/SvEvTac portanti il gene β-galattosidasi inserito all'interno del primo esone codificante, l'esone 2) nella linea che d'ora in poi verrà qui nominata come "Gli1LacZ";

- *patched* (topi derivanti dalla prima generazione dell'incrocio dei ceppi 129X1/SvJ e 129S1/Sv, contenenti il gene di fusione privo di promotore LacZ-neo nel codone di inizio, e con deleti una porzione dell'esone 1 e tutto l'esone 2 che codificano per il primo dominio transmembrana) nella linea che menzioneremo come "PtchLacZ";
- *sonic hedgehog* (topi derivati dalla *targetizzazione* di un costrutto IRES-lacZ nucleare nelle regioni non tradotte in 3' di *shh*, ciò permette di lasciare intatta la sequenza codificante per la proteina) nella linea che chiameremo "ShhLacZ".

I topi di queste linee sono stati incrociati con topi della linea R26Cre [189]. È quindi possibile rilevare l'attività di LacZ solo nelle cellule in cui vi è sia stata ricombinazione, ovvero dove è espresso il gene oggetto di studio.

Considerati i positivi risultati preliminari, è stato approfondito lo studio utilizzando nuove linee murine.

11.2.1 Gli1CreERT2

Una particolare modificazione del sistema "Cre-loxP" consente l'attivazione della Cre-ricombinasi non solo in maniera tessuto-specifica, ma anche temporalmente controllata. Quello da me impiegato, denominato CreERT2, si fonda sull'attivazione della ricombinasi mediante la somministrazione di un ligando sintetico, Tamoxifen (Sigma), per via orale o intraperitoneale. Questo tipo di costrutto è frutto dell'osservazione che l'attività di un numero di proteine può essere controllata da un ligando quando queste sono fuse a un dominio di legame del ligando (*Ligand-Binding Domain*, LBD) di un recettore di ormone steroideo [190]. Sono stati perciò sviluppati differenti tipi di ricombinasi, tra cui quella fusa al recettore per gli estrogeni ER (*Estrogen Receptor*), che viene attivata dai ligandi di questo recettore. Successivamente sono state introdotte delle mutazioni all'interno del dominio di legame per rendere le ricombinasi responsive solo a ligandi sintetici e non a quelli endogeni. La CreERT ricombinasi è insensibile al β -estradiolo endogeno ma è attivata dall'antagonista sintetico 4-idrossitamoxifen (OHT). Topi transgenici esprimenti l'originale CreERT ricombinasi (contenente il dominio di legame ER con la mutazione G521R) [191] o la ricombinasi CreERTM (caratterizzata da il dominio di legame ER con la mutazione G525R)[192] hanno la limitazione che per indurre ricombinazione sono necessarie dosi di tamoxifen, convertito nel fegato nell'induttore attivo OHT, relativamente alte, e ciò può portare ad effetti collaterali indesiderati. Sono state quindi create nuove ricombinasi attivate da tamoxifen, dotate di

maggior sensibilità ed efficienza di ricombinazione inducibile in topi [193]. Una di queste, CreERT2 (contenente il dominio di legame ER con la tripla mutazione G400V/M543A/L544A) è circa dieci volte più sensibile all'attivazione da parte di OHT rispetto a CreERT [193, 194]. Il meccanismo di funzionamento del costrutto prevede che, in assenza di tamoxifen, la ricombinasi chimerica CreER rimanga confinata nel citoplasma cellulare, mentre, in seguito a somministrazione del farmaco, il legame del ligando al recettore ER provoca la traslocazione di CreER nel nucleo, dove può ricombinare il DNA substrato fiancheggiato dai siti loxP.

La linea Gli1CreERT2 sfrutta il sistema CreERT2 e l'espressione della Cre-ricombinasi è posta sotto il controllo degli elementi regolatori del gene *gli1* poiché il cDNA codificante per la Cre-ricombinasi è stato inserito nel 5' UTR del primo esone codificante del locus Gli1 [195].

11.2.2 R26R

Questa linea *reporter* murina è caratterizzata dall'inserzione del gene LacZ all'interno del locus ROSA26, locus, come già accennato precedentemente, ubiquitario [189].

11.2.3 SmoM2EYFP

La linea murina SmoM2EYFP è caratterizzata dall'inserzione nel locus Rosa26 del DNA per la produzione di una proteina di fusione costituita da un'attivazione costitutiva del gene Smo (ottenuta dalla mutazione puntiforme W539L dell'omologo del gene murino Smo in *Drosophila*) e dalla proteina EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), proteina geneticamente modificata e potenziata da GFP (*Green Fluorescent Protein*). Essa è caratterizzata da un picco di eccitazione a 514nm e di emissione a 527nm, funge così da *reporter* ed è visibile tramite microscopia a fluorescenza utilizzando l'opportuno filtro.

11.2.4 Incroci murini

Per individuare l'espressione spaziale nel surrene di Shh, come già accennato precedentemente topi eterozigoti della linea ShhLacZ sono stati incrociati con topi eterozigoti della linea R26Cre, mentre per lo studio dell'espressione di Ptch e Gli1, topi portanti in eterozigosi il costrutto R26Cre sono stati incrociati con topi eterozigoti della linea PtchLacZ e

con topi eterozigoti della linea Gli1LacZ rispettivamente. Topi eterozigoti sono stati sacrificati a 4 mesi d'età.

Per quanto concerne gli esperimenti volti alla caratterizzazione dell'espressione del gene Gli1 nel surrene durante differenti stadi dello sviluppo murino, topi eterozigoti maschi della linea Gli1CreER sono stati fatti accoppiare con femmine eterozigoti della linea R26R. Per studiare gli effetti di una aumentata espressione del gene Smo in cellule capsulari positive per l'espressione di Gli1, topi eterozigoti della linea Gli1CreER sono stati incrociati con topi eterozigoti della linea SmoM2EYFP.

11.2.5 Attivazione della Cre ricombinasi ERT2

L'attivazione dell'espressione del costrutto CreERT2 è stata ottenuta tramite iniezione intraperitoneale (IP) di 100 mg/kg di tamoxifen (Sigma Aldrich), risospeso in olio di mais sterile alla concentrazione finale di 20mg/ml.

Per attivare l'attività ricombinasica durante lo stadio embrionale, femmine di topo sono state fatte accoppiare per ottenere l'incrocio voluto. La mattina seguente è stata controllata la presenza del *plug* vaginale, indice che l'accoppiamento era avvenuto, e il mezzogiorno dello stesso giorno è stato considerato il giorno 0,5dpc (day post coitum), ovvero il giorno embrionale 0,5 (e0,5). Nel giorno 13,5dpc è stata effettuata una singola iniezione IP. Per tutti gli studi embrionali, la madre è stata sacrificata nei giorni 16,5dpc, 18,5 dpc. I cuccioli di topo invece al giorno P1, un giorno dopo la nascita.

Per l'attivazione della Cre ricombinasi dopo lo svezzamento, topi di 21 giorni d'età (P21) sono stati iniettati intraperitonealmente per 14 giorni con tamoxifen. Per questo tipo di attivazione, è stato incluso nel disegno dell'esperimento un controllo negativo costituito sia da topi transgenici iniettati in parallelo con olio di mais sterile, sia da topi wt provenienti dalla stessa figliata trattati con tamoxifen.

Per gli studi nell'adulto, i time point stabiliti per i topi Gli1CreERT2R26R erano a 9, 25 e 57 settimane d'età degli animali.

I time point per i topi dell'incrocio SmoM2EYFPGli1CreERT2 erano 35 giorni d'età (P35), 10 settimane e 28 settimane d'età.

11.3 Caratterizzazione del genotipo delle progenie murine

La caratterizzazione del genotipo delle progenie murine è stata effettuata in cuccioli di topo di 14 giorni d'età tramite il taglio di circa 1,5-2 mm dell'estremità della coda con un rasoio. Le porzioni di tessuto sono poi state incubate in 100 µl di buffer di lisi alcalina (25mM NaOH, 0,2mM EDTA) a 95°C per un'ora. La reazione di digestione è stata poi completata con l'aggiunta di 100 µl di buffer di neutralizzazione (40mM Tris-HCl).

Con il DNA estratto si sono eseguite le PCR di genotipizzazione con seguendo specifici protocolli forniti dal Jackson Laboratory. Per le reazioni è stato utilizzato 1 µl di DNA, che è stato amplificato con il kit GoTaq Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) tramite i primer riportati nella tabella 11.1. Per la genotipizzazione del gene EYFP è stata impiegata il kit Hot Start GoTaq Polymerase ((Promega, Madison, Wisconsin, USA), in quanto necessaria una polimerasi in grado di attivarsi ad alte temperature, minimizzando la formazione di amplificazioni aspecifiche e la formazione di dimeri di primer.

I prodotti di reazione sono stati successivamente amplificati su gel d'agarosio 1%.

11.4 Analisi istologiche, immunoistochimiche e di immunofluorescenza

Una volta prelevati i tessuti oggetto di studio ai diversi *time point*, questi sono stati fissati per 4 ore in paraformaldeide al 4% disciolta in buffer salino fosfato (PBS), quindi disidratati in soluzioni di etanolo (50% e 70% per 2 ore rispettivamente) e successivamente inclusi in paraffina. Mediante microtomo sono state tagliate sezioni di 6 µm e processate secondo le procedure *standard* del laboratorio.

11.4.1 Colorazione ematossilina-eosina

La colorazione ematossilina-eosina è stata svolta deparaffinando le sezioni di tessuto in xilene, seguendo un percorso di reidratazione in etanolo 100%, 95% e infine acqua deionizzata, ed immergendo brevemente i tessuti in una soluzioni di ematossilina (Sigma Aldrich), sostanza che colora in blu violaceo le componenti cellulari cariche negativamente (basofile) come gli acidi nucleici, le proteine di membrana, le membrane cellulari e l'elastina. I vetrini sono stati quindi lavati in acqua e poi immersi in eosina (Sigma Aldrich), sostanza che conferisce un colore rosato ai componenti carichi positivamente come molte proteine cellulari, le proteine mitocondriali e le fibre collagene, che sono quindi detti eosinofili o acidofili. Terminata la colorazione, i vetrini sono stati nuovamente disidratati in etanolo 95% e

100% e posti in xilene prima di procedere all'applicazione del montante e del coprivetrino.

11.4.2 Analisi immunoistochimiche

Per le analisi di immunoistochimica, le sezioni ottenute sono state lavate in Tris-buffer salino/ 0,1% Tween-20 (TBS-T, pH 7.5), bollite per 20 minuti in sodio citrato 10 mM (pH 6.0), seguito da un lavaggio in acqua deionizzata e due in TBS-T a temperatura ambiente. Lo *staining* dell'anticorpo è stato condotto usando il kit VECTASTAIN ABC in accordo con il protocollo fornito dal produttore.

11.4.3 Immunofluorescenza

Per analisi di immunofluorescenza, dopo deparaffinazione, le sezioni sono state lavate in PBS, poi sottoposte a smascheramento dell'antigene con acido citrico pH2 per 10 minuti, successivamente lavate in PBS e incubate in latte scremato 2%/PBS per 40 minuti. Dopo tre ulteriori lavaggi da 5 minuti l'uno in PBS, i vetrini sono stati incubati *overnight* a 4°C con gli anticorpi, diluiti alle opportune concentrazioni in una camera umida. Il giorno seguente, dopo tre lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate con *Alexa 488 goat anti-mouse antibody* o *Alexa 546 goat anti-rabbit antibody* (Invitrogen) da 1 a 2 ore e poi lavate nuovamente in PBS per tre volte. Si sono marcati i nuclei mediante DAPI (1:1000 in PBS) incubando le sezioni con questa sostanza per circa 10 minuti e infine, dopo tre lavaggi, si sono montati i coprivetrini con il montante Fluoro-Gel (Electron Microscopy Science).

I vetrini sono stati guardati al microscopio a fluorescenza Nikon optiphot-2 e fotografati con la fotocamera Olympus dp70.

Gli anticorpi impiegati e le relative concentrazioni d'utilizzo sono state le seguenti: anti-Sf1 anti rabbit IgG 1:1000 (Invitrogen); anti- β -catenina anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000; anti- β catenina anti-mouse IgG (BD transduction Laboratories) 1:500, anti-couptf2/nr2f2 anti-mouse (R&D Systems) 1:500; anti-Tirosina Idrossilasi (TH) anti-mouse (Millipore) 1:1000; anti-PCNA anti-mouse 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) e GFP in concentrazione 1:200 (Invitrogen).

11.4.4 Rivelazione dell'attività β -galattosidasi

Per la rivelazione dell'attività della β -galattosidasi (*X-gal staining*), i tessuti sono stati fissati

in una speciale soluzione (2,7% formaldeide; 0,20%glutaraldehyde, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 0,02% NP-40, PBS) per 10 minuti, lavati per tre volte in PBS e processati secondo quanto indicato nel protocollo del kit “ β -Gal Staining Set” (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). La presenza dell’enzima β -galattosidasi permette la conversione del substrato X-gal in un prodotto colorato, consentendo la localizzazione dell’espressione del gene.

I campioni sono stati visualizzati con il microscopio SMZ800 e fotografati con la fotocamera Olympus DP212.

11.5 Estrazione di RNA e trascrizione inversa

Gli animali sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale dopo sedazione con isofluorano, dissezionati sotto microscopio SMZ800 Camera Olympus DP212. I tessuti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

Successivamente è stato estratto l’RNA mediante Trizol utilizzando il protocollo indicato dal produttore. La concentrazione dell’RNA è stata misurata mediante Nanodrop; eventuali residui di DNA genomico sono stati eliminati con il trattamento RQ1 RNase free- DNase (Promega) e la qualità dell’RNA è stata confermata tramite gel di agarosio all’1%.

L’RNA destinato all’analisi mediante Real Time PCR è stato retrotrascritto con il kit iScript (Invitrogen) in accordo con il protocollo fornito dal produttore.

Per verificare se i geni della via di segnalazione di Hh (SHH, DHH, IHH, PTCH1 e 2, GLI1, GLI2, GLI3, SMO) e i diversi ligandi Wnt (Wnt1, -2, -2a, -3, -3a, -4, -5a, -5b, -6,-7a, -7b, -8, -8b, -10, -10b, -11, -14, -15, -16) sono espressi nei tessuti e nei modelli cellulari oggetto di studio, è stata eseguita la retrotrascrizione usando il sistema iScript (Invitrogen) con i *primer* per i geni sopraccitati (tabella 11.1) disegnati tramite il programma Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Come gene *housekeeping* è stato utilizzato GAPDH. L’analisi del trascritto è stata svolta su gel d’agarosio all’1%.

11.6 Real Time PCR quantitativa (qPCR)

La qPCR è stata utilizzata per eseguire la quantificazione dell’mRNA oggetto di studio. La metodica impiegata è quella della SYBR green PCR, che utilizza una molecola fluorescente che si lega al solco minore del DNA, usando il sistema ABI7300 (Applied Biosystems).

I *primer* dei geni SHH, DHH, IHH, PTCH, GLI1, GLI2, GLI3, SMO sono stati disegnati con il programma Universal Probe Library Assay Design Center (Roche Applied Science). Il gene *housekeeping* adottato come riferimento è stato quello della GAPDH, i cui *primer* sono stati disegnati col medesimo programma (tabella 11.2).

I prodotti delle RT-PCR sono stati separati con corsa elettroforetica su gel d'agarosio 2% per controllare la riuscita della reazione.

I dati sono stati ottenuti come valori di Ct (ossia il numero del ciclo a cui il *plot* logaritmico della PCR interseca una linea soglia prestabilita) e sono stati usati per determinare il ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ del gene *target* - Ct del gene *housekeeping*). Per calcolare di quante volte cambia l'espressione genica tra due categorie di campioni è stata utilizzata la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Le misure sono state condotte in triplicato.

Gene	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
GLI1	tgccagatatgcttcagcca	tgtagcgaatagacagaggt
GLI2	ttcatggagtcccagcagaa	ctggccatagtagtatagcg
GLI3	aagtgacctgtcaggtgtag	tgaagcatctgtggagatgg
SHH	gaagatcacaagaaactccgaacg	tggattcatagtagaccagtcgaa
IHH	ccagagtggagacaccattg	gctagctgggtcttacggtc
DHH	ggagagccagtgaggacaag	ggggtgtagttgggtacga
SMO	gactccgtgagtgcatctg	gtggcagctgaaggtgatga
PTCH1	gcattctggcctagcaata	gtctcagggtagctctcata
PTCH2	tgctctctggagggcttc'	cagttcctcctgccagtgca
Wnt1	tggtggggcatcgtgaacatagc	cgccgccggtagtcgaggtg
Wnt2	ggtaatatgaacgtccctctcggt	tccttggtacaggccctgggtg
Wnt2b	ccgggagggcagcgttcgtcta	agcccatcatatcgccctcctcag
Wnt3	agtggactttgtccaac	ccccggaactgatgctgg
Wnt3a	gcggtgggtgggaggggagag	ccaggcacggggtttgtaggtc
Wnt4	tgagccccctgctgcctg	caccggcacgtgtgcatctc
Wnt5a	tcaaggaatgccagtaccagttccgg	ctgtgacctgcaccagctt
Wnt5b	gcggtgagaagaactttgccaag	atactggtccacaacctcggtg
Wnt6	acaagcggggccgtggagat	taggggagcagaagtcgggtgaat
Wnt7a	gcgagcatcatctgtaacaag	agccacagtcgctcaggttg
Wnt7b	gctgcccggcggctacaacac	cccagggccggcaggaaacagc
Wnt8	cgcgctgaaaattgagatggaca	ccccggggcctggcactaccta
Wnt8b	aaataccagttgcttggg	tctgttctccaggcagtag
Wnt10	gagagcctcacagagacatc	acagaagtcgggagatttc

Gene	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
Wnt10b	tggtgtaaccacgacatggactt	ctgacgttccatggcatttgact
Wnt11	ggcgggctacaaccctacac	acccatccctgccctgacttctg
Wnt14	tggcggcagctagcacccttc	gcctcggccacaacaatactctc
Wnt15	cacctggggctgctggaatgca	cgtaggtgtgtggcgctcagc
Wnt16	gaccgaatgttctctgtgac	cgtagcagcaccagataaac
β-actina	ggtgacgaggccagagcaagaga	gtcccggccagccagggtccag

Figura 11.21 Primer per RT-PCR.

Gene	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
GLI1	caggggaagagagcagactgac	cgctgctgcaagaggact
GLI2	gcagactgcaccaaggagta	cgtaggtgtgtcattgttga
GLI3	tgatccatctcctattcctcca	tctggatacgtcgggctact
SHH	ccaattacaaccccgacatc	gcatttaactgtctttgcacct
IHH	tgcattgctctgtcaagtctg	gctccccgttctctaggc
DHH	cacgtatcgggtcaaagctga	tagttccctcagccccttc
SMO	gactccgtgagtgcatctg	gtggcagctgaaggatga
β-Catenina	gaagcgcatcacatggt	ccatgccgagagtgatcc
EYFP	gcagcagcagtttggtga	tgtggagagctccagtacacc
GAPDH	tgtccgtcgtggatctgac	cctgctcaccaccttctg

Tabella 11.2 Primer per qPCR con la metodica SYBR green.

12. Risultati

12.1 Espressione di mRNA dei geni della via di segnalazione di Hh in surrene

Nella parte preliminare di questo studio riguardante il ruolo di Shh nella biologia del surrene siamo andati a controllare, mediante retrotrascrizione (RT-PCR), la presenza di trascritto dei geni Sonic hedgehog (Shh), Indian (Ihh), Desert hedgehog (Dhh), Gli1, Gli2, Gli3, Patched1 (Ptch1), Patched2 (Ptch2) e Smoothened (Smo) in mRNA della linea cellulare murina di tumore del surrene Y1 e li abbiamo confrontati con l'MRNA estratto da un insieme di surreni di topi *wild type* (*w.t.*).

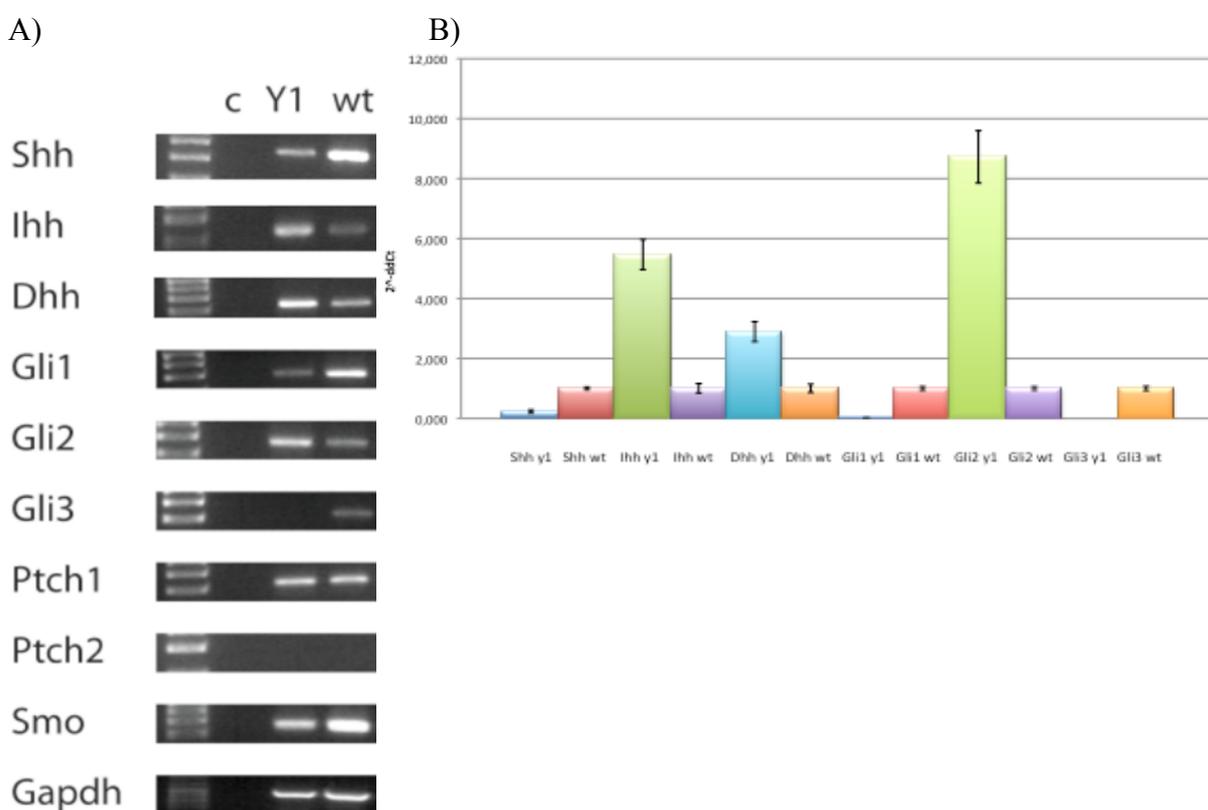


Figura 12.1 A) Pannello raffigurante l'analisi su gel d'agarosio 1% della retrotrascrizione dei geni Shh, Dhh, Ihh, Ptch, Ptch2, Gli1, Gli2, Gli3, Smoothened. c= controllo negativo (acqua) B) Rappresentazione grafica dei valori di $2^{\Delta\Delta Ct}$ ottenuti dopo elaborazione dei dati di qPCR e normalizzazione di questi per il valore di ΔCt del gene in surrene normale.

Nel surrene *w.t* troviamo espressi tutti i ligandi Hh (figura 12.1 A), e in particolare Shh, mentre Dhh e Ihh sono i più espressi nel modello tumorale. All'interno della famiglia Gli, Gli1 è chiaramente presente nel surrene *w.t.*, mentre Gli2 è il membro della famiglia Gli prevalente nelle cellule Y1, le quali, è interessante notare, sono prive dell'espressione di Gli3, che ha funzioni di repressione della trascrizione dei geni target della via di segnalazione di

Hh. Smo e il repressore Ptch1 sono espressi in entrambe le tipologie di cellule, al contrario Ptch2 è assente.

I dati di RT-PCR sono stati confermati tramite real time PCR quantitativa (qPCR) eseguita sul cDNA proveniente dagli stessi campioni. I valori relativi al messaggero delle cellule Y1 sono stati normalizzati rispetto a quelli relativi al surrene w.t. (che risulteranno quindi pari a 1) per ottenere un quadro di come un cellule tumorali surrenali potessero discostarsi da cellule normali. Sebbene l'istogramma indichi un'espressione relativa dei geni di Y1 rispetto ai surreni normali, il ΔCt medio calcolato è perfettamente coerente con l'intensità delle bande dei gel relativi alla retrotrascrizione, confermando quindi quanto precedentemente osservato.

12.2 Espressione *in vivo* dei componenti della via di segnalazione Hh

Ottenuta la conferma dell'espressione dei geni del *pathway* di Hh nel surrene, abbiamo voluto poi individuarne l'espressione *in vivo* in modelli murini. A questo fine, con collaborazione del dr. A. Dlugosz, sono stati raccolti surreni di topo di 30 giorni d'età, portanti in eterozigosi i costrutti caratteristici delle 2 linee d'appartenenza parentali descritti nella sezione "materiali e metodi", che per semplificazione chiameremo Gli1LacZ, PtchLacZ e ShhLacZ, e processati secondo protocollo. Le sezioni ottenute sono state sottoposte a *X-gal staining* per la determinazione dell'attività β -galattosidasi e osservate mediante microscopia ottica.

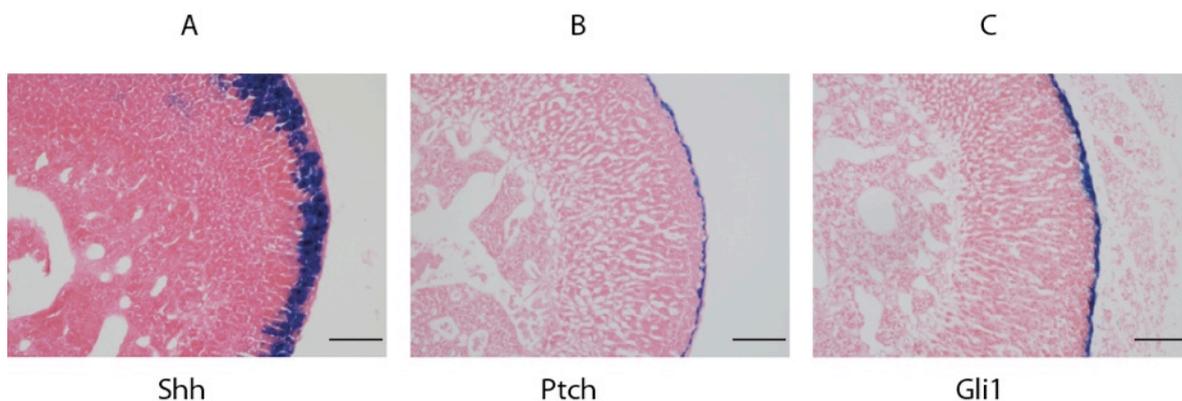


Figura 12.2 A) Sezione di surrene di topo ShhLacZ. La colorazione blu denota un'espressione del gene Shh in zona subcapsulare. B) Sezione di surrene di topo PtchLacZ. Il repressore del *pathway* di Hh risulta essere espresso in zona capsulare. C) Sezione di surrene di topo Gli1LacZ. Il gene è espresso nella capsula surrenalica.

L'espressione del gene Shh nel surrene murino (figura 12.2A), visibile grazie alla colorazione blu risultato dell'attivazione dell'operone LacZ in seguito a ricombinazione operata dalla cre-ricombinasi, è stata riscontrata essere marcata e concentrata nella zona subcapsulare. Per

quanto riguarda il gene *Ptch* (figura 12.2 B), la sua espressione, non molto forte, è stata osservata in zona capsulare, così come per il gene *Gli1*, seppure in una maniera lievemente più consistente (figura 12.2 C).

12.3 Determinazione *in vivo* dell'espressione di *Gli1*

Il topo transgenico ottenuto incrociando i topi della linea *Gli1CreERT2* con la linea *reporter Rosa26LacZ* (*Gli1CreERT2-R26LacZ*, che qui di seguito verranno nominati come *Gli1CreER-R26R*) permette lo studio dell'espressione del gene *Gli1* controllata nel tempo. In seguito all'amministrazione di appropriate concentrazioni del farmaco tamoxifen, vi è attivazione dell'attività ricombinante effettuata dall'enzima cre-ricombinasi, la cui trascrizione è controllata dal promotore del gene *Gli1*.

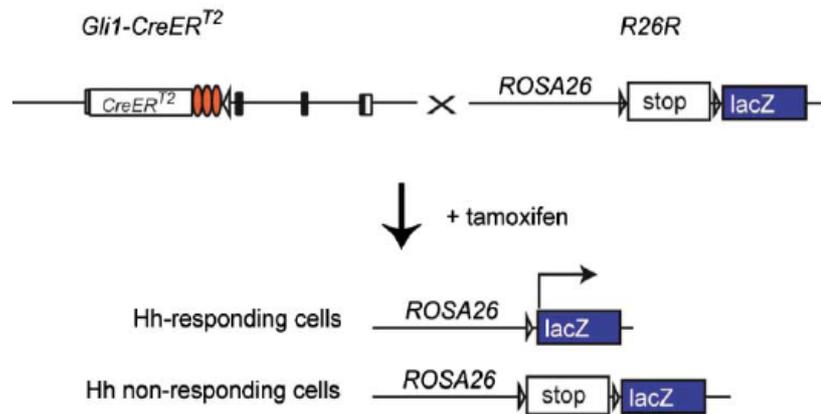


Figura 12.3 Schematizzazione dei costrutti genici prima e dopo ricombinazione in seguito a somministrazione di tamoxifen [195].

Per determinare se l'espressione di *Gli1* si verifica durante la genesi del surrene, topi femmina al 13,5dpc sono stati iniettati con tamoxifen e sacrificati nei giorni e16,5, e18,5 e P1.

Nella figura 12.4 A e B possiamo vedere i surreni di due embrioni *in situ*, uno transgenico dalla caratteristica colorazione blu(A) e uno w.t (B) risultato negativo dopo X-gal staining, provando sia il funzionamento del costrutto transgenico, sia l'efficacia del trattamento e del protocollo di rivelazione dell'attività β -galattosidasi.

Analizzando più approfonditamente le ghiandole surrenaliche, da sezioni relative a ciascun time point (figura 12.4 C) possiamo evincere l'espressione di *Gli1* nella zona capsulare dal giorno e16.5, dove ritroviamo dei *cluster* di cellule positive per *Gli1*. A cinque giorni dal trattamento con tamoxifen (e18,5), possiamo notare come vi sia un'espansione della

popolazione di cellule esprimenti il gene Gli1 denotata da una più marcata colorazione blu, la quale non interessa solo la capsula ma anche porzioni subcapsulari, segno di una migrazione delle cellule verso le zone della corteccia. Questa migrazione, che avviene in cluster, è più evidente a 9 giorni dalla somministrazione di tamoxifen (P1). Dopo la nascita, infatti, le cellule Gli1-positive sono disposti in gruppi lungo la capsula, con un'organizzazione più simile a quella ritrovata nel giorno e16,5, mentre vi sono più gruppi di cellule discendenti verso la corteccia rispetto a questo time point.

Le sezioni provenienti da surreni di embrioni e cuccioli di topo wt, appartenenti alle stesse figlie degli animali transgenici analizzati, sono sempre risultate negative per lo staining di X-gal.

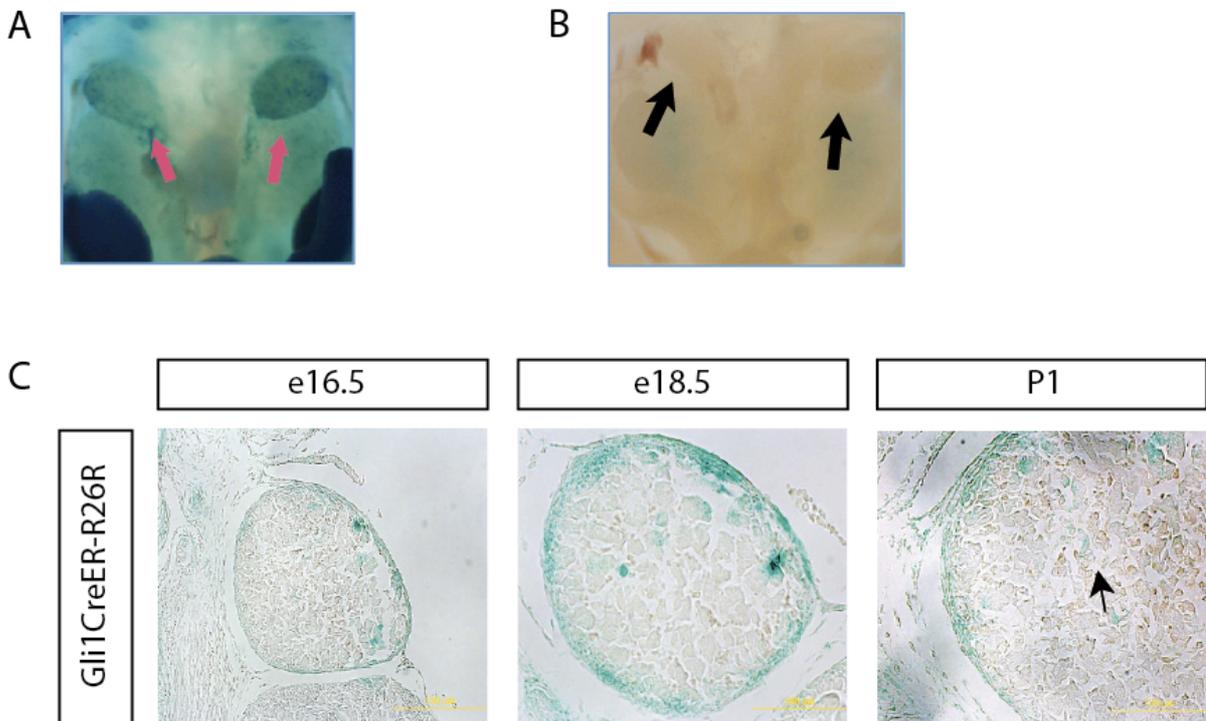


Figura 12.4 A) Ghiandole surrenali *in situ* di embrione Gli1CreER-R26R di 16,5 giorni (e16.5) dopo *X-gal staining*, le frecce rosse indicano i surreni. B) Embrione wild type controllo dopo *X-gal staining*. C) Sezioni di surrene di embrioni Gli1CreER-R26R dopo *X-gal staining* di 16,5 e 18,5 giorni di vita embrionale . Ingrandimento 10X. Ingrandimento 10X.

L'espressione del gene Gli1 dopo l'organogenesi, ossia quando la via di segnalazione di Hh è normalmente implicata nei processi di mantenimento e rinnovamento dell'organo ma non di sviluppo, è stata valutata in topi di 21 giorni d'età (P21) in seguito a iniezione intraperitoneale

di 100mg/kg/die di tamoxifen per 14 giorni consecutivi ed analizzata un mese dopo aver concluso il trattamento, 4 mesi dopo e un anno dopo (rispettivamente a 9, 25 e 57 settimane d'età del topo); la pelle costituiva il controllo positivo per la riuscita della reazione [195].

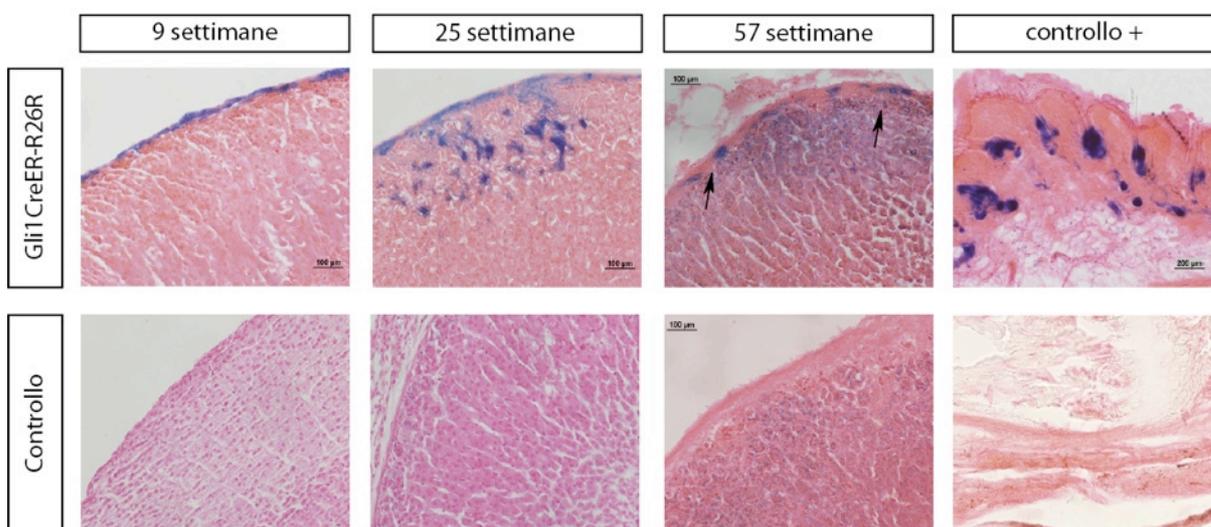


Fig. 12.5 Espressione di Gli1CreER-R26R. Sezioni di ghiandole surrenali di topo adulto di 9, 25 e 57 settimane (prima riga) presentano colorazione blu dove è espresso Gli1, mentre i relativi controlli ne sono privi. Il controllo positivo (pelle) non presenta colorazione per Gli1 nel topo controllo.

Nel topo adulto di 9 settimane si osservano cellule esprimenti Gli1 (figura 12.5) confinate nella capsula surrenalica, e i cluster di cellule Gli1-positive migranti nella corteccia surrenalica non sono molto evidenti come nel topo di 25 e 57 settimane. Inoltre a tutti i time point si può notare ancora una volta come queste cellule esprimenti Gli1 siano disposti in gruppi non continuativi lungo la capsula e non uniformemente. A 57 settimane, inoltre, questi cluster cellulare diventano più radi, sebbene lo spessore della capsula appaia aumentato. La colorazione in parallelo di tessuti in cui l'espressione di Gli1 è certa, come la pelle di cui è mostrato un esempio in figura 12.5, ci ha permesso di verificare l'efficacia dello staining e di escludere che la bassa espressione di Gli1 negli animali di 57 settimane fosse dovuta a problemi nello svolgimento dello staining stesso; inoltre tutti gli animali controllo erano negativi allo staining.

12.3 Studio dell'overespressione del gene Smoothened (Smo)

Dopo aver caratterizzato l'espressione di Gli1, abbiamo voluto studiare l'effetto di un'overespressione del pathway di Shh mediata da Smo su queste cellule, andando ad attivare

costitutamente il gene Smo. Per questo fine abbiamo incrociato topi Gli1CreER con topi SmoM2EYFP, ed è stato effettuato il trattamento con tamoxifen per attivare le ricombinasi nelle cellule Gli1-positive. Una semplificazione del costrutto caratterizzante questi topi è raffigurato in figura 12.6.

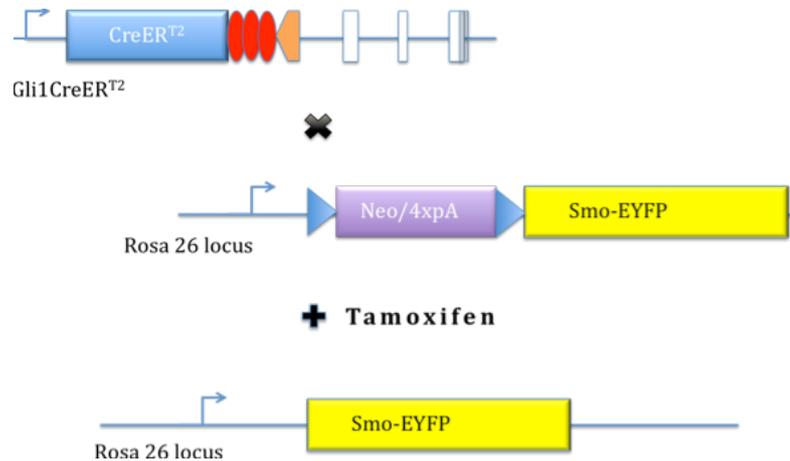


Figura 12.6 Schematizzazione della reazione di ricombinazione mediata dalla cre-ricombinasi nelle cellule positive a Gli1 in seguito a somministrazione di tamoxifen. Il farmaco attiva la traslocazione della ricombinasi nel nucleo dove, eliminando la cassetta di post fiancheggiata da siti loxP, permette la trascrizione del gene di fusione SmoM2-EYFP posto nel locus ubiquitario Rosa26.

Lo studio è stato svolto sia durante la vita embrionale che nell'età adulta del topo.

12.3.1 Overespressione di Smo nell'embrione di topo

Femmine di topo eterozigoti SmoM2Gli1CreER sono state fatte accoppiare con maschi eterozigoti dello stesso incrocio e iniettate intraperitonealmente con tamoxifen nel 13,5 dpc.

Nei giorni di vita embrionale 16,5; 18,5 e un giorno dopo la nascita si sono raccolti i tessuti, sezionati e analizzati prima con colorazione ematossilina-eosina e poi mediante immunofluorescenza. Con la prima non siamo riusciti a cogliere differenze tra embrione o cucciolo transgenico e wt, mentre la seconda ci ha permesso di approfondire lo studio.

Gli anticorpi anti-TH per la midollare, -Sf1 per la corticale e COUPTFII usato come marker capsulare, ci hanno permesso di controllare che il processo di zonazione del surrene avveniva

nel surrene normale come nel transgenico senza variazioni e non era presente nessun fenomeno di disorganizzazione tissutale.

Abbiamo potuto constatare che negli embrioni e nei cuccioli di topo transgenici non vi sono differenze riguardanti lo sviluppo surrenalico, piuttosto sembra esservi una maggiore proliferazione e, inoltre, un lieve aumento delle dimensioni dell'organo.

12.3.2 Overespressione di Smo nel topo adulto

Topi eterozigoti SmoM2Gli1CreER di 21 giorni d'età e topi wt sono stati trattati con tamoxifen per 14 giorni, mentre topi eterozigoti destinati al gruppo "controlli" sono stati trattati con olio di mais come previsto da protocollo. I tessuti sono stati raccolti ai time point prestabiliti e processati come descritto in precedenza. La presenza di proteina EYFP è stata rivelata tramite immunofluorescenza utilizzando un anticorpo anti-GFP (Green Fluorescence Protein) (dati non mostrati). Per confermare l'avvenuta o la mancata ricombinazione, dai surreni controlaterali degli animali oggetto di studio è stato estratto l'RNA ed è stata svolta una qPCR con i primer specifici per EYFP. Negli animali transgenici trattati con tamoxifen i valori di ΔCt , ottenuti sottraendo dal valore del Ct di EYFP quello del gene housekeeping GAPDH, indicano la presenza di mRNA del gene (figura 12.7), mentre entrambi i controlli negativi si sono rivelati tali non essendo avvenuta la reazione di qPCR, indicando quindi sia la loro equipollenza, sia la specificità della ricombinazione indotta da tamoxifen.

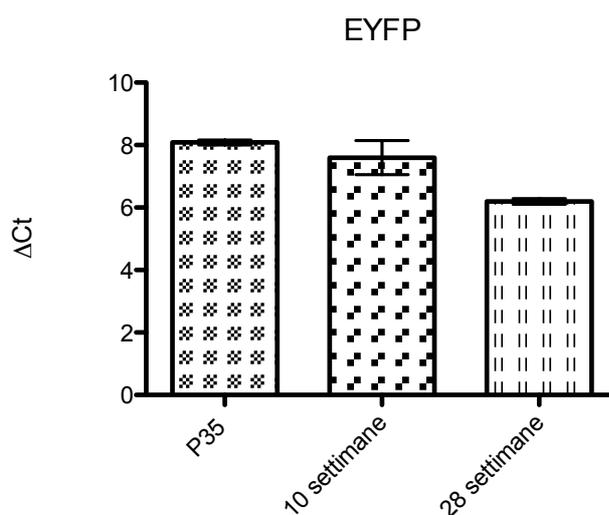


Figura 12.7 Espressione del gene EYFP mediante qPCR di topi SmoM2-Gli1CreER. A confronto il ΔCt ottenuto a diversi time point, si può notare un lieve aumento della presenza di mRNA (ΔCt inferiore) a maggior distanza dal trattamento con tamoxifen.

Le sezioni di tessuto raccolte sono state sottoposte a colorazione ematossilina-eosina per permettere un'osservazione della struttura e dell'organizzazione del tessuto. Il fenotipo transgenico che abbiamo ottenuto non presentava palesi differenze rispetto al controllo (figura 12.8) a nessuno dei time point osservati. Siamo andati perciò ad analizzare più a fondo il fenotipo utilizzando determinati anticorpi come marker delle differenti organizzazioni cellulari. Abbiamo utilizzato gli anticorpi anti-COUPTFII come marker delle cellule capsulari, anti-TH per la zona midollare e anti-Sf1 per la corteccia surrenalica; inoltre abbiamo utilizzato l'anticorpo anti-PCNA come marcatore della proliferazione cellulare e abbiamo indagato la presenza del principale effettore della via di segnalazione canonica di Wnt con l'anticorpo anti- β -catenina.

L'immunofluorescenza ci ha permesso di portare alla luce differenze fenotipiche più sottili. Come si può notare dalla figura 12.9, in topo adulto transgenico di 10 settimane trattato con tamoxifen le cellule della capsula surrenalica, immunoreattive per COUPTFII, un marker delle cellule endoteliali, risultano essere di un numero inferiore rispetto al controllo e disposte inoltre più compattamente. Sempre al medesimo time point, le cellule proliferanti, indicate dal legame con l'anticorpo anti-PCNA, risultano essere più presenti nel transgenico rispetto al controllo e localizzate in zona subcapsulare.

Lo staining per TH, marker della zona midollare surrenalica, non ha invece evidenziato differenze tra i due gruppi di topi analizzati.

Queste caratteristiche sono state notate sia nei topi transgenici di 35 giorni che in quelli di 28 settimane (dato non mostrato).

Abbiamo voluto infine verificare l'espressione di β -catenina come marker dell'attivazione del pathway canonico di Wnt. Anche in questo caso abbiamo riscontrato delle differenze tra topo transgenico trattato con tamoxifen e topo controllo, che sono più marcate a distanza maggiore dal ricevimento del trattamento (figura 12.10). La tipica espressione subcapsulare appare essere più marcata e diffusa a 10 settimane, per poi quasi raddoppiare a 28 settimane.

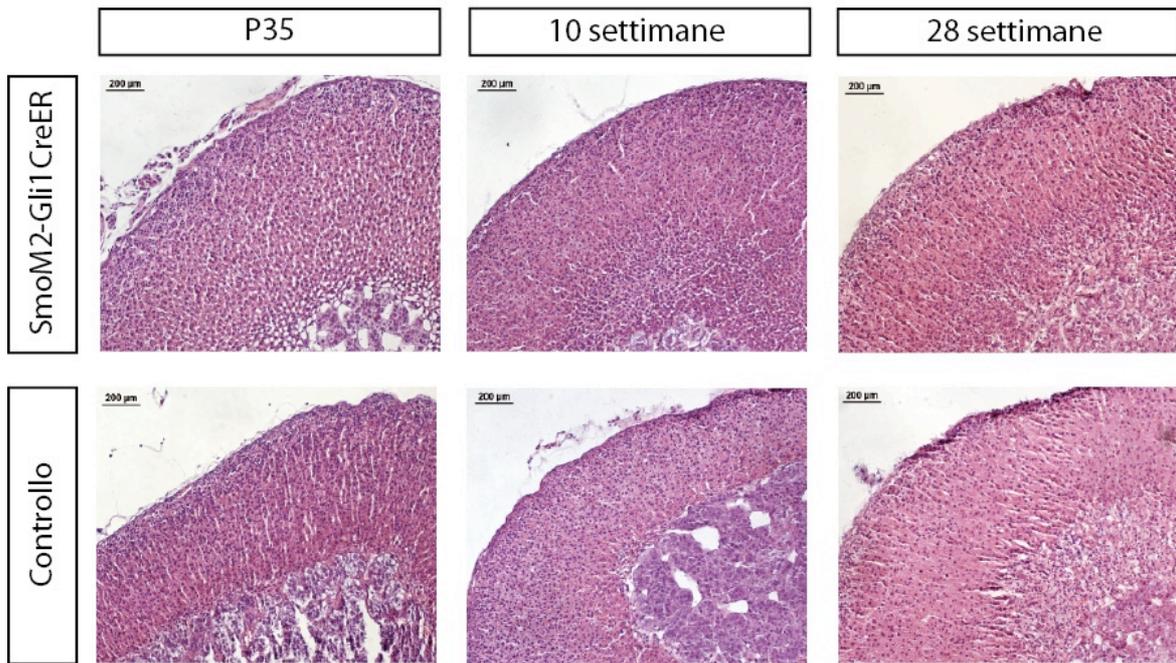


Figura 12.8 Colorazione ematossilina-eosina.

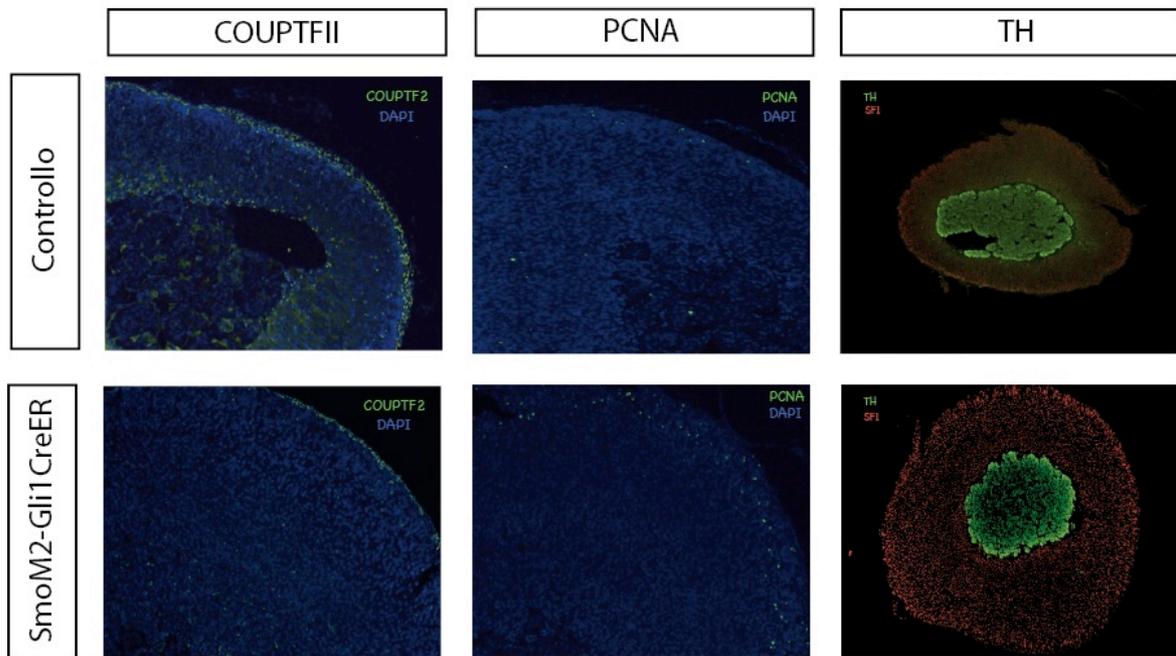


Figura 12.9 Immunofluorescenza su sezioni di serrone murino di 10 settimane d'età. L'anticorpo anti COUPTFII è stato usato come marker capsulare, l'anticorpo anti-PCNA come marker di proliferazione e l'anticorpo anti-TH come marker della midollare del surrene.

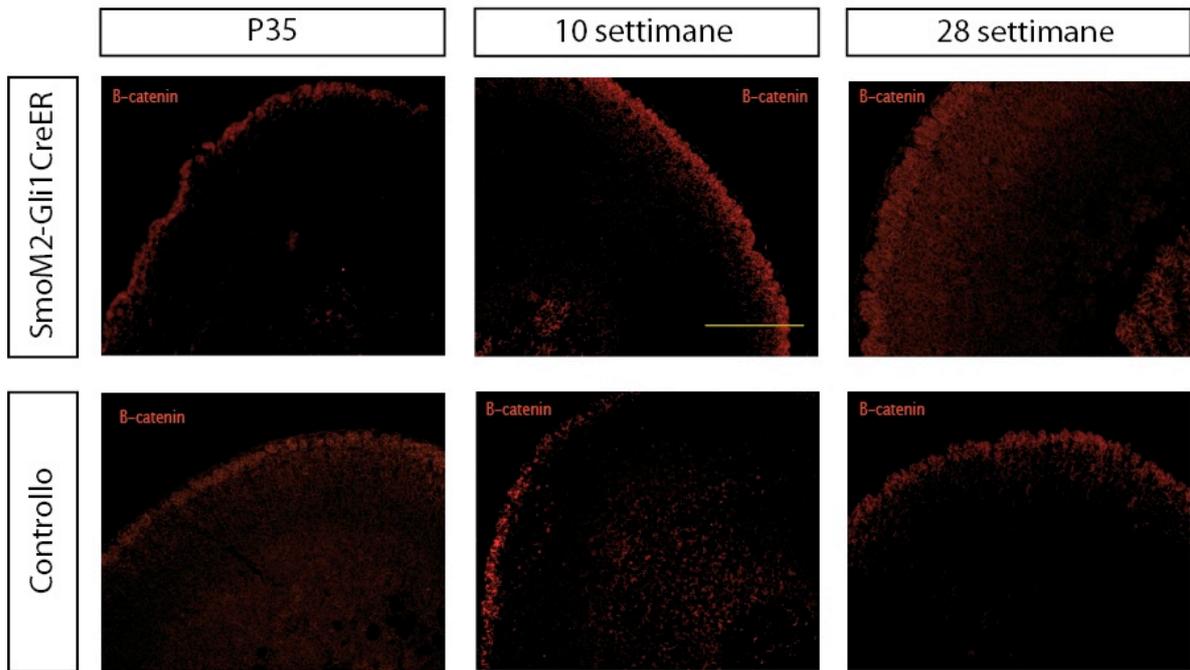
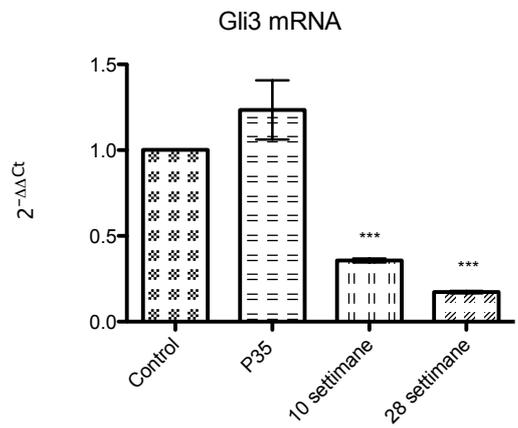
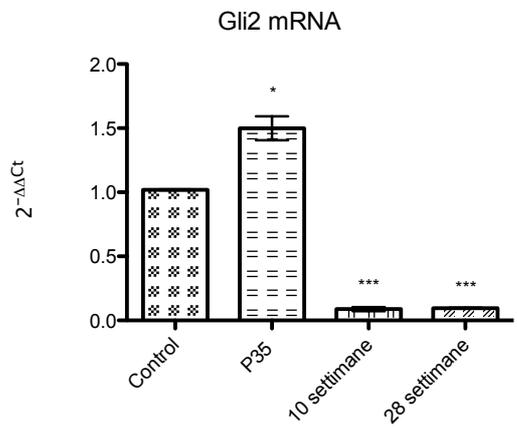
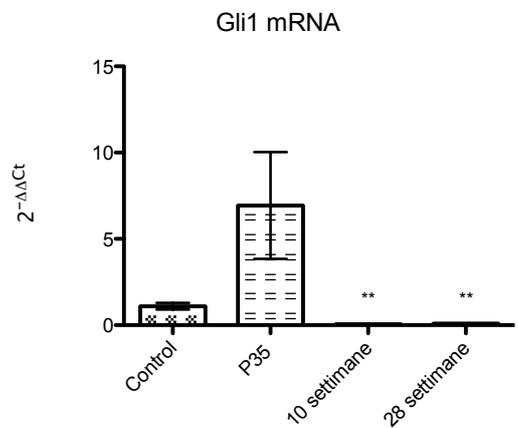
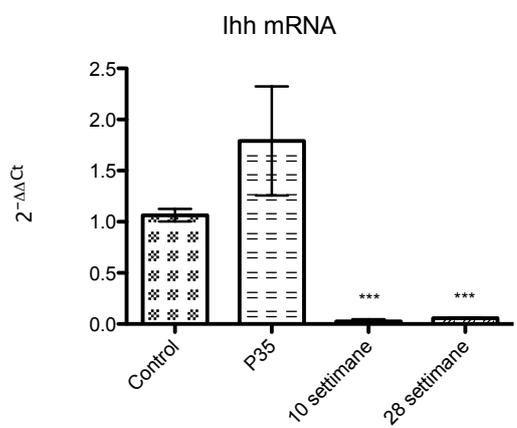
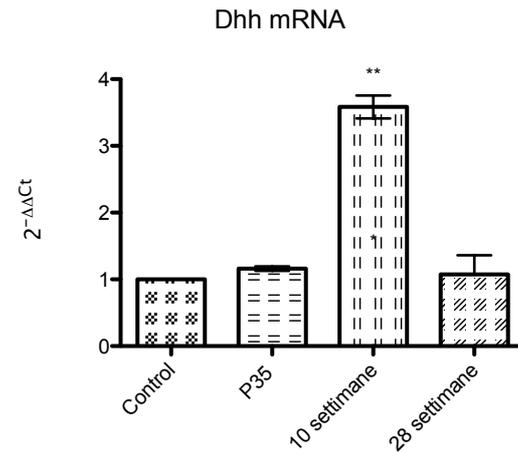
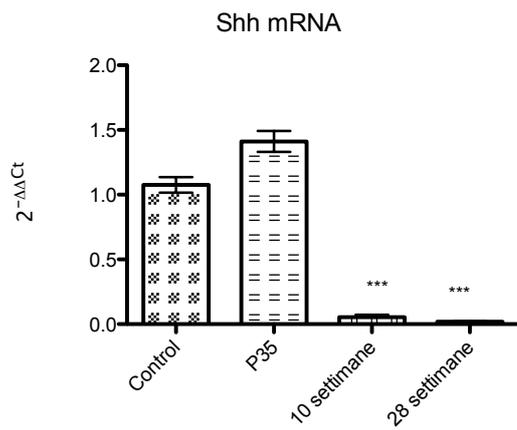


Figura 12.10 Espressione di β -catenina in immunofluorescenza. La tipica espressione subcapsulare appare è indicata da uno staining più marcato nel transgenico di 10 settimane rispetto al controllo, mentre in quello di 28 settimane le cellule immunoreattive occupano una porzione subcapsulare più ampia.

12.4 Analisi molecolare dell'espressione dei geni coinvolti nella via di segnalazione di Shh nei topi adulti

I surreni controlaterali degli animali studiati sono stati destinati ad analisi molecolari, più precisamente da essi abbiamo estratto l'RNA, retrotrascritto e utilizzato per eseguire analisi di qPCR. I valori di Δ Ct relativi ai surreni transgenici sono stati normalizzati rispetto ai valori di Δ Ct dei topi controllo.



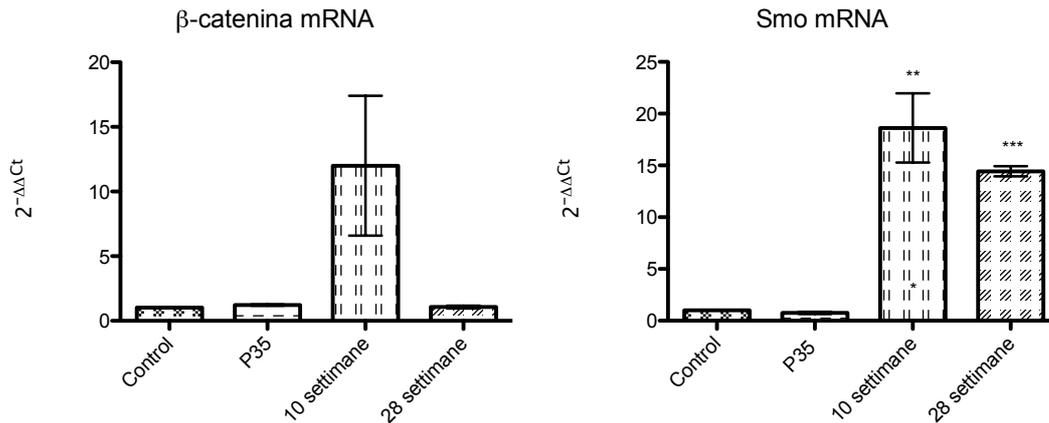


Figura 12.11 Istogrammi relativi all'espressione ai vari time point dei geni della via di segnalazione di Shh e di β -catenina. I dati sono qui riportati come valore di $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e sono stati normalizzati per i valori ottenuti nei topi controllo (i quali risultano essere uguali a 1).

Il profilo d'espressione dei vari geni coinvolti nella via di segnalazione di Hh, ottenuto mediante la normalizzazione del ΔCt ottenuto dalla reazione di qPCR condotta su cDNA di topi transgenici ai diversi time point rispetto a quello dei rispettivi controlli (rappresentati negli istogrammi in figura 12.11 con un'unica barra rappresentativa uguale a 1), mostra come i geni dei ligandi Hh risultino significativamente meno espressi rispetto ai controlli, con l'eccezione di P35 che ha dimostrato un profilo piuttosto simile a quello del suo controllo, e del time point a 10 settimane che presenta livelli di Dhh di circa 3 volte maggiori rispetto al proprio controllo.

La famiglia delle Gli è significativamente meno espressa nei topi transgenici di 10 e 28 settimane, al contrario P35 rivela un lieve aumento dell'mRNA dei tre geni, ma in particolare di Gli2.

Il quadro relativo al gene Smoothened mostra un andamento diverso, trattandosi di topi con un'attivazione costitutiva del gene, possiamo notare come in P35 i livelli di mRNA non sono ancora aumentati, ma l'incremento è di 18 e quindi volte maggiore negli animali di 10 e 28 settimane rispettivamente.

Curioso è notare il grafico relativo all'espressione di β -catenina. Troviamo livelli di espressione maggiore al time point di 10 settimane, dato concorde con quanto osservato nell'analisi di immunofluorescenza, ma i livelli a 28 settimane sono paragonabili al controllo, facendoci quindi supporre che non vi sia un incremento dell'espressione, quanto una espansione spaziale in zona subcapsulare delle cellule esprimenti β -catenina.

12.4 Analisi dell'espressione dei geni della famiglia Wnt

Sulla base dei ritrovamenti riguardanti β -catenina, abbiamo cercato di individuare quali possibili geni della famiglia Wnt sono coinvolti nella differente espressione di β -catenina rispetto ai controlli. Mediante la metodica di retrotrascrizione (RT-PCR) abbiamo quindi svolto questo studio preliminare volto all'individuazione della presenza dell'mRNA di Wnt1, -2, -2a, -3, -3a, -4, -5a, -5b, -6, -7a, -7b, -8, -8b, -10, -10b, -11, -14, -15, -16.

Il pannello mostrato in figura 12.12 dà un quadro dell'espressione di ciascun gene Wnt in topi SmoM2Gli1CreER trattati con tamoxifen e sacrificati ai time point prestabiliti.

Notiamo differenze nell'espressione, che andremo ad approfondire in studi successivi, a livello di intensità di banda nei geni Wnt2a, Wnt4, Wnt5a e 5b, Wnt11 e Wnt15.

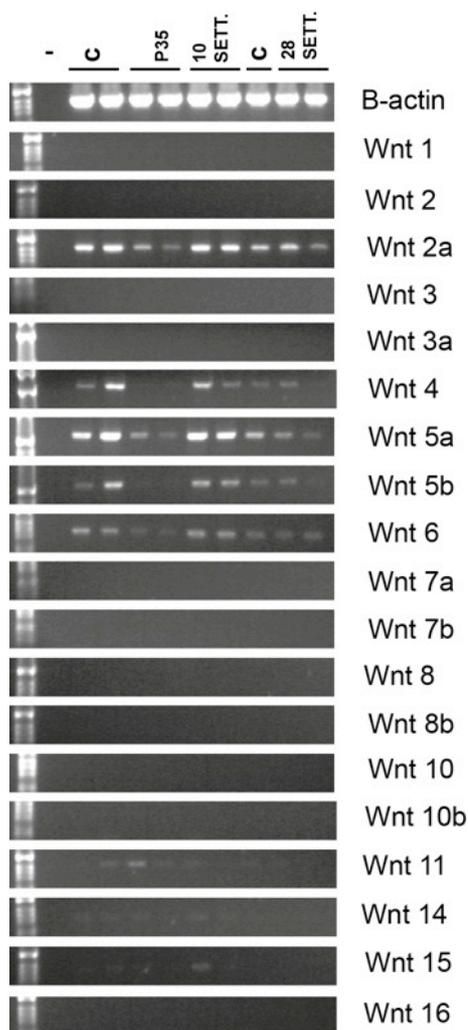


Figura 12.12. Pannello relativo alle reazioni di RT-PCR per i geni della famiglia Wnt.

13. Discussione

La via di segnalazione di Sonic Hedgehog è una via molto importante sia durante lo sviluppo embrionale che nell'adulto. In particolare essa è coinvolta nello sviluppo e nel mantenimento della ghiandola surrenalica e alterazioni del pathway sono state correlate a fenotipi patologici. Tuttavia ancora poco è conosciuto al ruolo di Shh in questo organo.

Le recenti pubblicazioni in materia hanno dimostrato come in mutanti per Shh hanno una sottile capsula e una corteccia piccola [196, 197].

Lo scopo di questo studio è indagare, partendo da modelli murini, la variazione di espressione di questo pathway durante la vita embrionale e adulta.

Abbiamo verificato, tramite analisi molecolare di retrotrascrizione e real time PCR quantitativa la presenza dell'espressione dei geni coinvolti nella via di segnalazione di Hh sia nel surrene murino normale, che nella linea cellulare di carcinoma surrenalico Y1, notando come quest'ultima presenti variazioni nell'espressione dei ligandi di Hh e, inoltre, manchi completamente del fattore Gli3, caratteristica che può essere coinvolta nella biologia del tumore stesso.

Abbiamo svolto degli esperimenti *in vivo* di “*lineage tracing*”, ovvero l'inseguimento di un particolare tipo cellulare (Gli1 positivo, visibile grazie alla colorazione blu) per comprendere come cambi il segnale di Shh in funzione del tempo. Gli1 infatti è l'unico membro della famiglia Gli che può essere attivato solo dal segnale proveniente da Shh. Abbiamo quindi analizzato sia l'espressione di Gli1 durante lo stadio embrionale, che in età adulta. Ciò ci è stato possibile grazie all'attivazione del transgene non solo spazialmente, nelle cellule Gli1-positive, ma anche temporalmente.

Sia nell'embrione che nell'adulto l'espressione di Gli1 è presente lungo la capsula surrenalica, dove vi risiedono cellule organizzate in cluster contigui, le quali migrano a piccoli gruppi verso la corteccia. Nell'embrione questa espressione appare più intensa nel giorno 16,5, lasciando supporre che vi sia un incremento del segnale proveniente dalle cellule esprimenti Shh.

Nell'adulto l'espressione di Gli1 appare meno intensa, ma sempre principalmente nella zona capsulare; vi sono inoltre, anche in questo caso, cluster di cellule che migrano verso la corteccia, sebbene questi siano meno marcati nel topo di oltre un anno di vita e che quindi si affaccia alla senescenza, dovuto al fatto che in questa fase della vita i processi di

mantenimento e rigenerativi lentamente diminuiscono. Questi dati coincidono con gli esperimenti svolti da altri due gruppi [196, 197]), e ci fanno supporre che le cellule positive a Gli1 siano quelle dalle quali si creano le altre progenie cellulari che popolano il tessuto surrenalico, o almeno siano parte di queste cellule progenitrici.

Considerata la potenziale importanza di queste cellule Gli1-positive, abbiamo voluto indagare gli effetti di una overespressione costitutiva del segnale di Shh via Smo. Un'alterazione di Smo in altri modelli di studio ha portato alla formazione di fenotipi iperplastici[198], ma informazioni su come questa modificazione influisca sul surrene non sono ancora presenti in letteratura. Abbiamo quindi analizzato in embrioni e topi adulti l'effetto di una attivazione del transgene risultante nell'overespressione di Smo.

Negli embrioni l'organizzazione cellulare del surrene è risultata mantenuta, mentre abbiamo osservato un aumento della proliferazione cellulare, comunque sempre elevata nel corso della vita embrionale, e un aumento delle dimensioni delle ghiandole surrenaliche che, attraverso speciali *software* di analisi dell'immagine, verranno prossimamente quantificate. È infatti da determinare se il tessuto è diventato ipertrofico o iperplastico, e questo sarà il passo successivo che andremo a fare.

L'analisi sul fenotipo adulto ci ha fatto riscontrare un assottigliamento delle cellule endoteliali COUPTFII-positive e un aumento della proliferazione in tutti e tre i time point analizzati, ma in particolare negli animali di 28 settimane. Prossimamente cercheremo di analizzare la natura di questo assottigliamento della capsula, andando a determinare se si è verificata una diminuzione di cellule esprimenti Gli1 e un aumento delle cellule differenziate subcapsulari, o se le cellule affette sono di altra natura.

Non abbiamo inoltre osservato alcuna disorganizzazione istologica nei nostri transgenici trattati, indice che una perturbazione della via attraverso Smo non interferisce drasticamente con il normale sviluppo della ghiandola. Si potrebbe ipotizzare, a questo proposito, che vi siano meccanismi o segnali di *feedback* che subentrano per regolare o inibire i fattori a valle attivati dalla via di segnalazione di Hh.

A riguardo, un altro importante argomento che sarà approfondito riguarda l'interazione del *pathway* di Hh con altre vie di segnalazione, in quanto è ormai conoscenza comune che tutte le vie di segnalazione non agiscono necessariamente in maniera disgiunta e sono inoltre

implicate, a volte in modalità ridondante, in molti processi in cui possono cooperare tra loro [199-201].

Questa complessità molecolare è alla base, oltre del normale sviluppo corporeo e del suo mantenimento, anche della genesi e della progressione di molte patologie. Capire come un segnale trasformi, o contribuisca a trasformare, uno stato “normale” in uno stato “alterato” può dare un significativo contributo allo studio della malattia e alla ricerca di una cura per essa.

La differenza nell'espressione della β -catenina riscontrata sia molecularmente che istologicamente fa pensare a una relazione nel surrene della via di segnalazione di Wnt con quella di Shh. L'analisi, effettuata mediante retrotrascrizione, sulla presenza o assenza di eventuali membri della famiglia Wnt per individuare quale di questi può essere coinvolto nella relazione con Shh, ci ha permesso di osservare che alcuni ligandi Wnt sono differenzialmente espressi negli animali transgenici rispetto agli animali controllo. Diventa quindi fondamentale approfondire l'entità di queste differenze mediante studi semi-quantitativi.

Gli studi compiuti fino ad ora sono coerenti con le poche informazioni riguardanti il ruolo nella biologia del surrene e, inoltre, hanno posto le basi per futuri studi nel campo che andranno ad analizzare più dettagliatamente i meccanismi di sviluppo, rigenerazione e mantenimento nel surrene in cui è implicata la via di segnalazione di Hh.

14. Bibliografia

1. D. Andreani, G.M., D. Andreani, *Trattato di diagnostica funzionale endocrinologica*. 1984: PICCIN.
2. Else, T. and G.D. Hammer, *Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(10): p. 458-68.
3. Wrobel, K.H. and F. Suss, *On the origin and prenatal development of the bovine adrenal gland*. Anat Embryol (Berl), 1999. **199**(4): p. 301-18.
4. Sidhu, S., et al., *Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumourigenesis*. ANZ J Surg, 2003. **73**(9): p. 727-38.
5. de Fraipont, F., et al., *Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1819-29.
6. Krulich, L., A.P. Dhariwal, and S.M. McCann, *Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro*. Endocrinology, 1968. **83**(4): p. 783-90.
7. Hellman, B. and A. Lernmark, *Evidence for an inhibitor of insulin release in the pancreatic islets*. Diabetologia, 1969. **5**(1): p. 22-4.
8. Burgus, R., et al., *Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(3): p. 684-8.
9. Siler, T.M., et al., *Inhibition of growth hormone release in humans by somatostatin*. J Clin Endocrinol Metab, 1973. **37**(4): p. 632-4.
10. Patel, Y.C., *Somatostatin and its receptor family*. Front Neuroendocrinol, 1999. **20**(3): p. 157-98.
11. Grimberg, A., *Somatostatin and cancer: applying endocrinology to oncology*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(8): p. 731-3.
12. Goodman, R.H., et al., *Nucleotide sequence of a cloned structural gene coding for a precursor of pancreatic somatostatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(10): p. 5869-73.
13. Goodman, R.H., et al., *Pre-prosomatostatins. Products of cell-free translations of messenger RNAs from anglerfish islets*. J Biol Chem, 1980. **255**(14): p. 6549-52.
14. Patel, Y.C. and W. O'Neil, *Peptides derived from cleavage of prosomatostatin at carboxyl- and amino-terminal segments. Characterization of tissue and secreted forms in the rat*. J Biol Chem, 1988. **263**(2): p. 745-51.
15. Kumar, U. and M. Grant, *Somatostatin and somatostatin receptors*. Results Probl Cell Differ, 2010. **50**: p. 137-84.
16. Susini, C. and L. Buscail, *Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents*. Ann Oncol, 2006. **17**(12): p. 1733-42.
17. Bruno, J.F., et al., *Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(23): p. 11151-5.
18. Meyerhof, W., et al., *Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and comparison of its expression pattern with that of a somatostatin-14 receptor in rat brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10267-71.
19. O'Carroll, A.M., et al., *Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28*. Mol Pharmacol, 1992. **42**(6): p. 939-46.

20. Yamada, Y., et al., *Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(12): p. 2136-42.
21. Baumeister, H. and W. Meyerhof, *Gene regulation of somatostatin receptors in rats*. J Physiol Paris, 2000. **94**(3-4): p. 167-77.
22. Kreienkamp, H.J., et al., *Functional annotation of two orphan G-protein-coupled receptors, Drostar1 and -2, from Drosophila melanogaster and their ligands by reverse pharmacology*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39937-43.
23. Weckbecker, G., et al., *Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(12): p. 999-1017.
24. Guillermet-Guibert, J., et al., *Physiology of somatostatin receptors*. J Endocrinol Invest, 2005. **28**(11 Suppl International): p. 5-9.
25. Ueberberg, B., et al., *Differential expression of the human somatostatin receptor subtypes sst1 to sst5 in various adrenal tumors and normal adrenal gland*. Horm Metab Res, 2005. **37**(12): p. 722-8.
26. Ricci, S., et al., *Octreotide acetate long-acting release in patients with metastatic neuroendocrine tumors pretreated with lanreotide*. Ann Oncol, 2000. **11**(9): p. 1127-30.
27. Bousquet, C., et al., *Antiproliferative effect of somatostatin and analogs*. Chemotherapy, 2001. **47 Suppl 2**: p. 30-9.
28. Vale, W., et al., *Biologic and immunologic activities and applications of somatostatin analogs*. Metabolism, 1978. **27**(9 Suppl 1): p. 1391-401.
29. Bauer, W., et al., *SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action*. Life Sci, 1982. **31**(11): p. 1133-40.
30. Patel, Y.C., *Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes*. J Endocrinol Invest, 1997. **20**(6): p. 348-67.
31. Bruns, C., et al., *SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile*. Eur J Endocrinol, 2002. **146**(5): p. 707-16.
32. Ferrante, E., et al., *Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(3): p. 955-62.
33. Hofland, L.J., et al., *The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(4): p. 1577-85.
34. Ma, P., et al., *Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of a novel multiligand somatostatin analog, SOM230, with octreotide in patients with acromegaly*. Clin Pharmacol Ther, 2005. **78**(1): p. 69-80.
35. Schmid, H.A., *Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **286**(1-2): p. 69-74.
36. Bocci, G., et al., *In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists*. Eur J Clin Invest, 2007. **37**(9): p. 700-8.
37. Folkman, J., et al., *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. J Exp Med, 1971. **133**(2): p. 275-88.
38. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
39. Brem, H. and J. Folkman, *Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage*. J Exp Med, 1975. **141**(2): p. 427-39.

40. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
41. Shing, Y., et al., *Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor*. Science, 1984. **223**(4642): p. 1296-9.
42. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): p. 851-8.
43. Leung, D.W., et al., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1306-9.
44. White, C.W., et al., *Treatment of pulmonary hemangiomas with recombinant interferon alfa-2a*. N Engl J Med, 1989. **320**(18): p. 1197-200.
45. Keck, P.J., et al., *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-12.
46. Klagsbrun, M. and S. Soker, *VEGF/VPF: the angiogenesis factor found?* Curr Biol, 1993. **3**(10): p. 699-702.
47. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994. **59**: p. 471-82.
48. Nyberg, P., L. Xie, and R. Kalluri, *Endogenous inhibitors of angiogenesis*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 3967-79.
49. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*. Cell, 1994. **79**(2): p. 315-28.
50. Relf, M., et al., *Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 963-9.
51. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(14): p. 2413-22.
52. Chua, R.A. and J.L. Arbiser, *The role of angiogenesis in the pathogenesis of psoriasis*. Autoimmunity, 2009. **42**(7): p. 574-9.
53. Szekanecz, Z., et al., *Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2010. **22**(3): p. 299-306.
54. Arroyo, A.G. and M.L. Iruela-Arispe, *Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 226-35.
55. Glaser, S.S., E. Gaudio, and G. Alpini, *Vascular factors, angiogenesis and biliary tract disease*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(3): p. 246-50.
56. Fernandez, M., et al., *Angiogenesis in liver disease*. J Hepatol, 2009. **50**(3): p. 604-20.
57. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: role in regulation of tumor growth*. Symp Soc Dev Biol, 1974. **30**(0): p. 43-52.
58. Folkman, J. and R. Cotran, *Relation of vascular proliferation to tumor growth*. Int Rev Exp Pathol, 1976. **16**: p. 207-48.
59. Ferrara, N., *Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications*. Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 10-4.
60. Gillies, R.J., et al., *Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors*. Neoplasia, 1999. **1**(3): p. 197-207.
61. Raghunand, N., R.A. Gatenby, and R.J. Gillies, *Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours*. Br J Radiol, 2003. **76 Spec No 1**: p. S11-22.

62. Dvorak, H.F., *Angiogenesis: update 2005*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1835-42.
63. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
64. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
65. Roskoski, R., Jr., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **62**(3): p. 179-213.
66. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 581-611.
67. Fantl, W.J., D.E. Johnson, and L.T. Williams, *Signalling by receptor tyrosine kinases*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 453-81.
68. Berra, E., A. Ginouves, and J. Pouyssegur, *The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling*. EMBO Rep, 2006. **7**(1): p. 41-5.
69. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
70. Gaillard, I., et al., *ACTH-regulated expression of vascular endothelial growth factor in the adult bovine adrenal cortex: a possible role in the maintenance of the microvasculature*. J Cell Physiol, 2000. **185**(2): p. 226-34.
71. Thomas, M., et al., *Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature*. Microsc Res Tech, 2003. **61**(3): p. 247-51.
72. Cherradi, N., et al., *Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(4): p. 916-30.
73. Gospodarowicz, D., J.A. Abraham, and J. Schilling, *Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7311-5.
74. Connolly, D.T., et al., *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis*. J Clin Invest, 1989. **84**(5): p. 1470-8.
75. Hoeben, A., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(4): p. 549-80.
76. Ng, Y.S., et al., *Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult*. Dev Dyn, 2001. **220**(2): p. 112-21.
77. Berse, B., et al., *Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(2): p. 211-20.
78. de Fraipont, F., et al., *Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4734-41.
79. Bernini, G.P., et al., *Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 4961-5.
80. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 853-65.

81. Muller, Y.A., et al., *Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7192-7.
82. Iyer, S., et al., *Crystal structure of human vascular endothelial growth factor-B: identification of amino acids important for receptor binding*. J Mol Biol, 2006. **359**(1): p. 76-85.
83. Salven, P., et al., *Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors*. Am J Pathol, 1998. **153**(1): p. 103-8.
84. Joukov, V., et al., *A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases*. EMBO J, 1996. **15**(2): p. 290-98.
85. Joukov, V., et al., *Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C*. EMBO J, 1997. **16**(13): p. 3898-911.
86. Siegfried, G., et al., *The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis*. J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1723-32.
87. Zhou, A., et al., *Proteolytic processing in the secretory pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 20745-8.
88. Lymboussaki, A., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping binding sites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia*. Circ Res, 1999. **85**(11): p. 992-9.
89. Shida, A., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma*. Int J Clin Oncol, 2006. **11**(1): p. 38-43.
90. Su, J.L., et al., *The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 209-23.
91. Karpanen, T., et al., *Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1462-72.
92. Stacker, S.A., et al., *Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32127-36.
93. Rocchigiani, M., et al., *Human FIGF: cloning, gene structure, and mapping to chromosome Xp22.1 between the PIGA and the GRPR genes*. Genomics, 1998. **47**(2): p. 207-16.
94. Karkkainen, M.J., et al., *Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 74-80.
95. Baldwin, M.E., et al., *Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): p. 2441-9.
96. Achen, M.G., et al., *Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 548-53.
97. Thiele, W. and J.P. Sleeman, *Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy?* J Biotechnol, 2006. **124**(1): p. 224-41.
98. Iyer, S., et al., *The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12153-61.
99. Maglione, D., et al., *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9267-71.

100. Grunewald, F.S., et al., *Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1804**(3): p. 567-80.
101. Parr, C., et al., *Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(18): p. 2819-27.
102. Chen, C.N., et al., *The significance of placenta growth factor in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer*. *Cancer Lett*, 2004. **213**(1): p. 73-82.
103. Zhang, L., et al., *Expression of Placenta growth factor (PlGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance*. *World J Surg Oncol*, 2005. **3**: p. 68.
104. Matsumoto, K., et al., *Placental growth factor gene expression in human prostate cancer and benign prostate hyperplasia*. *Anticancer Res*, 2003. **23**(5A): p. 3767-73.
105. Feeney, S.A., et al., *Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factors during retinal vascular development and hyaloid regression*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. **44**(2): p. 839-47.
106. Persico, M.G., V. Vincenti, and T. DiPalma, *Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF)*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999. **237**: p. 31-40.
107. Odorisio, T., et al., *The placenta growth factor in skin angiogenesis*. *J Dermatol Sci*, 2006. **41**(1): p. 11-9.
108. Carmeliet, P., et al., *Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions*. *Nat Med*, 2001. **7**(5): p. 575-83.
109. Meyer, M., et al., *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. *EMBO J*, 1999. **18**(2): p. 363-74.
110. de Vries, C., et al., *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. *Science*, 1992. **255**(5047): p. 989-91.
111. Waltenberger, J., et al., *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(43): p. 26988-95.
112. Olofsson, B., et al., *Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(20): p. 11709-14.
113. Barleon, B., et al., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. *Blood*, 1996. **87**(8): p. 3336-43.
114. Kendall, R.L. and K.A. Thomas, *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(22): p. 10705-9.
115. Park, J.E., et al., *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(41): p. 25646-54.
116. Sawano, A., et al., *The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **238**(2): p. 487-91.

117. Ito, N., et al., *Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23410-8.
118. Takahashi, T., et al., *A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells*. EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2768-78.
119. Kendall, R.L., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6453-60.
120. Autiero, M., et al., *Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 936-43.
121. Ebos, J.M., et al., *A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(6): p. 315-26.
122. Gerber, H.P., et al., *Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23659-67.
123. Kaipainen, A., et al., *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3566-70.
124. Pajusola, K., et al., *FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines*. Cancer Res, 1992. **52**(20): p. 5738-43.
125. Nilsson, I., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-3 in hypoxia-induced vascular development*. FASEB J, 2004. **18**(13): p. 1507-15.
126. Dixelius, J., et al., *Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40973-9.
127. Alam, A., et al., *Heterodimerization with vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) is necessary for VEGFR-3 activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(2): p. 909-15.
128. Olsson, A.K., et al., *VEGF receptor signalling - in control of vascular function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 359-71.
129. LeCouter, J., et al., *Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium*. Nature, 2001. **412**(6850): p. 877-84.
130. Joubert, F.J. and D.J. Strydom, *Snake venom. The amino acid sequence of protein A from Dendroaspis polylepis polylepis (black mamba) venom*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1980. **361**(12): p. 1787-94.
131. Cheng, M.Y., et al., *Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus*. Nature, 2002. **417**(6887): p. 405-10.
132. Melchiorri, D., et al., *The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(9): p. 1694-702.
133. Wechselberger, C., et al., *The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes*. FEBS Lett, 1999. **462**(1-2): p. 177-81.

134. LeCouter, J., et al., *Mouse endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: a distinct expression pattern from its human ortholog suggests different roles as a regulator of organ-specific angiogenesis*. *Endocrinology*, 2003. **144**(6): p. 2606-16.
135. LeCouter, J., et al., *The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2685-90.
136. LeCouter, J. and N. Ferrara, *EG-VEGF and the concept of tissue-specific angiogenic growth factors*. *Semin Cell Dev Biol*, 2002. **13**(1): p. 3-8.
137. Morales, A., et al., *Expression and localization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) in human pancreas and pancreatic adenocarcinoma*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. **107**(1-2): p. 37-41.
138. Abad, J.D., et al., *T-cell receptor gene therapy of established tumors in a murine melanoma model*. *J Immunother*, 2008. **31**(1): p. 1-6.
139. Lin, D.C., et al., *Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(22): p. 19276-80.
140. Keramidas, M., et al., *Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombina variegata 8 on steroidogenic adrenocortical cells*. *J Endocrinol*, 2008. **196**(3): p. 473-82.
141. Weiss, L.M., L.J. Medeiros, and A.L. Vickery, Jr., *Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 1989. **13**(3): p. 202-6.
142. Macfarlane, D.A., *Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases*. *Ann R Coll Surg Engl*, 1958. **23**(3): p. 155-86.
143. Sullivan, M., M. Boileau, and C.V. Hodges, *Adrenal cortical carcinoma*. *J Urol*, 1978. **120**(6): p. 660-5.
144. Unger, N., et al., *Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes in benign and malignant adrenal tumours*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008. **68**(6): p. 850-7.
145. Unger, N., et al., *Immunohistochemical determination of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, 4, and 5 in various adrenal tumors*. *Endocr Res*, 2004. **30**(4): p. 931-4.
146. Pisarek, H., et al., *Somatostatin receptors in human adrenal gland tumors--immunohistochemical study*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008. **46**(3): p. 345-51.
147. Sharma, K., Y.C. Patel, and C.B. Srikant, *Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3*. *Mol Endocrinol*, 1996. **10**(12): p. 1688-96.
148. Florio, T., *Molecular mechanisms of the antiproliferative activity of somatostatin receptors (SSTRs) in neuroendocrine tumors*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 822-40.
149. Florio, T., et al., *Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities*. *Endocrinology*, 2003. **144**(4): p. 1574-84.
150. Hofland, L.J., *Somatostatin and somatostatin receptors in Cushing's disease*. *Mol Cell Endocrinol*, 2008. **286**(1-2): p. 199-205.
151. de Bruin, C., et al., *Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2009. **10**(2): p. 91-102.
152. McDermott, J.H., et al., *ACTH-secreting bronchial carcinoid: a diagnostic and therapeutic challenge*. *Ir J Med Sci*, 2008. **177**(3): p. 269-72.
153. Heikkila, P., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in human adrenals*. *Endocr Res*, 2000. **26**(4): p. 867-71.

154. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. *Nature*, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
155. McMahon, A.P., P.W. Ingham, and C.J. Tabin, *Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling*. *Curr Top Dev Biol*, 2003. **53**: p. 1-114.
156. Nieuwenhuis, E. and C.C. Hui, *Hedgehog signaling and congenital malformations*. *Clin Genet*, 2005. **67**(3): p. 193-208.
157. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. *Genes Dev*, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
158. Mill, P., et al., *Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development*. *Genes Dev*, 2003. **17**(2): p. 282-94.
159. Grachtchouk, M., et al., *Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin*. *Nat Genet*, 2000. **24**(3): p. 216-7.
160. Nilsson, M., et al., *Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3438-43.
161. Mill, P., et al., *Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-Myc*. *Dev Cell*, 2005. **9**(2): p. 293-303.
162. Ulloa, F., N. Itasaki, and J. Briscoe, *Inhibitory Gli3 activity negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling*. *Curr Biol*, 2007. **17**(6): p. 545-50.
163. Hallikas, O., et al., *Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity*. *Cell*, 2006. **124**(1): p. 47-59.
164. Wijgerde, M., et al., *A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord*. *Genes Dev*, 2002. **16**(22): p. 2849-64.
165. Buttitta, L., et al., *Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction*. *Development*, 2003. **130**(25): p. 6233-43.
166. Vokes, S.A., et al., *Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning*. *Development*, 2007. **134**(10): p. 1977-89.
167. Vokes, S.A., et al., *A genome-scale analysis of the cis-regulatory circuitry underlying sonic hedgehog-mediated patterning of the mammalian limb*. *Genes Dev*, 2008. **22**(19): p. 2651-63.
168. Beachy, P.A., S.S. Karhadkar, and D.M. Berman, *Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 324-31.
169. Karhadkar, S.S., et al., *Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis*. *Nature*, 2004. **431**(7009): p. 707-12.
170. Watkins, D.N., et al., *Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer*. *Nature*, 2003. **422**(6929): p. 313-7.
171. Fendrich, V., et al., *Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(2): p. 621-31.
172. Wicking, C., I. Smyth, and A. Bale, *The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development*. *Oncogene*, 1999. **18**(55): p. 7844-51.
173. Lindemann, R.K., *Stroma-initiated hedgehog signaling takes center stage in B-cell lymphoma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(4): p. 961-4.
174. Ruiz i Altaba, A., C. Mas, and B. Stecca, *The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer*. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(9): p. 438-47.
175. Yauch, R.L., et al., *A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer*. *Nature*, 2008. **455**(7211): p. 406-10.

176. Stamatakis, D., et al., *A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube*. Genes Dev, 2005. **19**(5): p. 626-41.
177. Methot, N. and K. Basler, *Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus*. Cell, 1999. **96**(6): p. 819-31.
178. Strigini, M. and S.M. Cohen, *A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the Drosophila wing*. Development, 1997. **124**(22): p. 4697-705.
179. Jia, J., et al., *Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I*. Nature, 2004. **432**(7020): p. 1045-50.
180. Smelkinson, M.G., Q. Zhou, and D. Kalderon, *Regulation of Ci-SCFSlimb binding, Ci proteolysis, and hedgehog pathway activity by Ci phosphorylation*. Dev Cell, 2007. **13**(4): p. 481-95.
181. Cohen, M.M., Jr., *The hedgehog signaling network*. Am J Med Genet A, 2003. **123A**(1): p. 5-28.
182. King, P.J., L. Guasti, and E. Laufer, *Hedgehog signalling in endocrine development and disease*. J Endocrinol, 2008. **198**(3): p. 439-50.
183. Bai, C.B., et al., *Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway*. Development, 2002. **129**(20): p. 4753-61.
184. Kang, S., et al., *GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 266-8.
185. Chemaitilly, W., et al., *Adrenal insufficiency and abnormal genitalia in a 46XX female with Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Horm Res, 2003. **59**(5): p. 254-6.
186. Andersson, H.C., et al., *Adrenal insufficiency in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Am J Med Genet, 1999. **82**(5): p. 382-4.
187. Bose, J., L. Grotewold, and U. Ruther, *Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(9): p. 1129-35.
188. Bitgood, M.J. and A.P. McMahon, *Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo*. Dev Biol, 1995. **172**(1): p. 126-38.
189. Soriano, P., *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 70-1.
190. Picard, D., *Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins*. Curr Opin Biotechnol, 1994. **5**(5): p. 511-5.
191. Feil, R., et al., *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10887-90.
192. Danielian, P.S., et al., *Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase*. Curr Biol, 1998. **8**(24): p. 1323-6.
193. Feil, R., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 752-7.
194. Indra, A.K., et al., *Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(22): p. 4324-7.
195. Ahn, S. and A.L. Joyner, *Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning*. Cell, 2004. **118**(4): p. 505-16.
196. King, P., A. Paul, and E. Laufer, *Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21185-90.

197. Huang, C.C., et al., *Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog*. *Endocrinology*, 2010. **151**(3): p. 1119-28.
198. Han, Y.G., et al., *Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development*. *Nat Med*, 2009. **15**(9): p. 1062-5.
199. Tang, M., et al., *Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons*. *J Neurosci*, 2010. **30**(27): p. 9280-91.
200. Miyagawa, S., et al., *Dosage-dependent hedgehog signals integrated with Wnt/beta-catenin signaling regulate external genitalia formation as an appendicular program*. *Development*, 2009. **136**(23): p. 3969-78.
201. Ulloa, F. and E. Marti, *Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube*. *Dev Dyn*, 2010. **239**(1): p. 69-76.