



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale  
Biologia molecolare e applicata**

---

**Ciliary Neurotrophic factor ed il suo recettore  $\alpha$  nella  
prostata normale e patologica**

**Ciliary Neurotrophic Factor and its receptor  $\alpha$  in normal  
and pathologic prostate**

Tesi di Laurea Magistrale

di: Andrea Diploma

Relatore:

Chiar.ma Prof. Daniela  
Marzioni

Correlatore:

Dr.ssa Roberta  
Mazzucchelli

Sessione Ottobre 2019

Anno Accademico 2018/2019

# Sommario

|  |    |
|--|----|
| <b>Capitolo 1: Introduzione</b> .....                | 3  |
| 1.1 <i>Prostata normale</i> .....                    | 3  |
| 1.2 <i>Prostata patologica</i> .....                 | 5  |
| 1.3 <i>Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)</i> .....  | 7  |
| 1.4 <i>Proprietà del CNTF</i> .....                  | 9  |
| 1.5 <i>CNTF e cancro</i> .....                       | 10 |
| <b>Capitolo 2: Materiali e metodi</b> .....          | 13 |
| 2.1 <i>Campioni tissutali</i> .....                  | 13 |
| 2.1.1 <i>Immunoistochimica</i> .....                 | 13 |
| 2.2 <i>Colture cellulari</i> .....                   | 14 |
| 2.2.1 <i>Immunofluorescenza</i> .....                | 15 |
| 2.2.2 <i>Trattamenti delle linee cellulari</i> ..... | 16 |
| 2.2.3 <i>Western Blotting</i> .....                  | 16 |
| 2.3 <i>Tabella anticorpi utilizzati</i> .....        | 18 |
| <b>Capitolo 3: Risultati</b> .....                   | 19 |
| 3.1 <i>Immunoistochimica</i> .....                   | 19 |
| 3.1.1 <i>CNTF</i> .....                              | 19 |
| 3.3 <i>Western blotting</i> .....                    | 27 |
| <b>Capitolo 4: Discussione</b> .....                 | 30 |
| <b>Bibliografia</b> .....                            | 33 |

# Capitolo 1: Introduzione

## 1.1 Prostata normale

La prostata è una ghiandola impari del sistema riproduttivo maschile che circonda l'uretra nella cavità pelvica. Si trova in posizione inferiore alla vescica, posteriore alla sinfisi pubica e anteriore al retto. L'organo ha la forma di un cono con base superiore in continuità con il collo della vescica e apice posto sotto il pavimento pelvico (Figura 1).

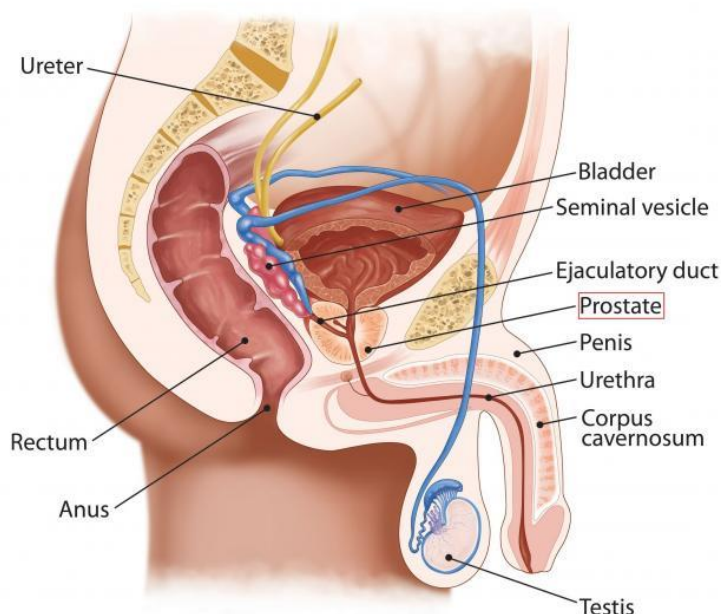


Figura 1

L'organo si mostra, all'esame istologico, costituito da ghiandole alveolari composte (Figura, 2, alv) il cui epitelio è costituito da tre tipi cellulare: le cellule luminari secernenti, le cellule basali che rappresentano il comparto staminale (colorate in marrone nella figura 2) e le cellule neuroendocrine che si possono evidenziare tramite specifici markers.

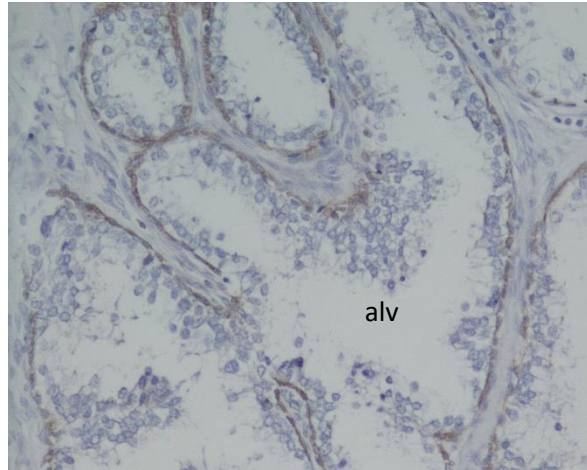


Figura 2

Le ghiandole sono circondate da uno stroma fibromuscolare (Figure 3 e 4, fmS), i dotti confluiscono nell'uretra prostatica. È possibile osservare, anche a basso ingrandimento, una caratteristica peculiare dell'organo ovvero la presenza di corpi amilacei (o concrezioni prostatiche) nel lume degli adenomeri (Figura 4, pc). Questi sono infiltrati sferici, omogenei ed eosinofili, costituiti da glicoproteine legate a sali di calcio. La presenza dei corpi amilacei è utile per il riconoscimento dell'organo nei preparati istologici, tuttavia non ne è nota la funzione fisiologica.

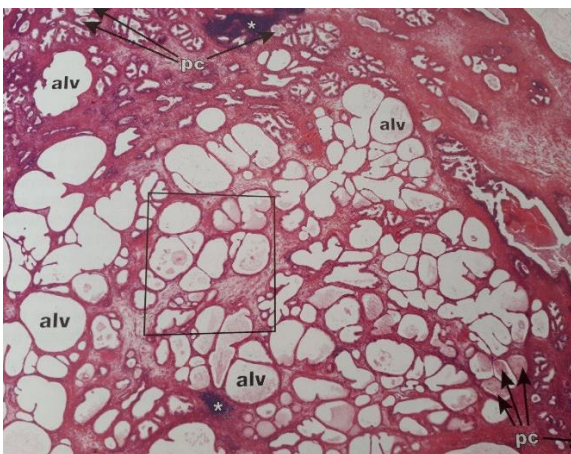


Figura 3

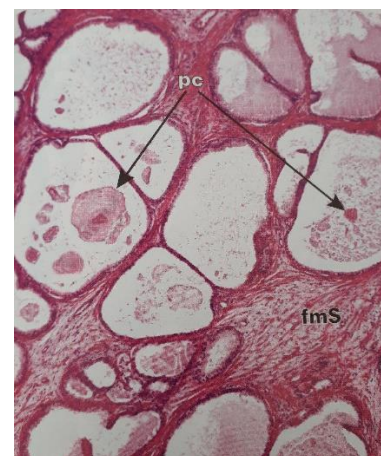


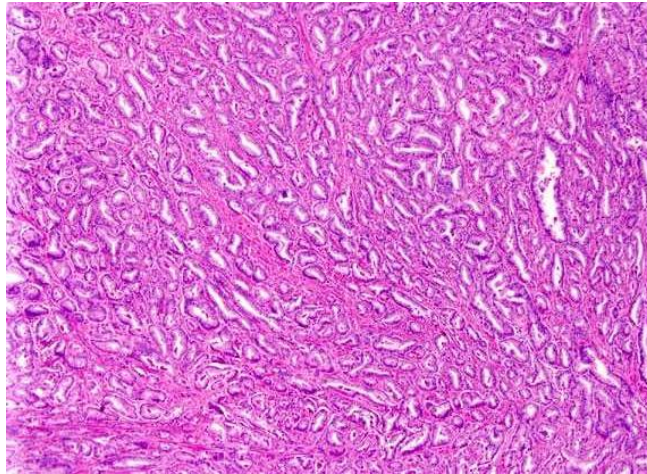
Figura 4

La funzione principale delle ghiandole è la secrezione del liquido prostatico, uno dei costituenti dello sperma, che contiene gli elementi necessari a nutrire e veicolare gli spermatozoi. La ghiandola secerne inoltre basse quantità di fosfatasi acida, amilasi, acido citrico, fibrolisina e antigene specifico della prostata (PSA).

## *1.2 Prostata patologica*

Il cancro alla prostata (PCa) è il tipo di cancro più comune negli uomini e una delle principali cause di morte per cancro, soprattutto nei paesi più sviluppati (Zhang et al. 2018) Il più comune (> 95%) è l'adenocarcinoma (Kench et al. 2019) (Figura 5). Oltre all'adenocarcinoma, nella prostata si possono trovare in rari casi anche sarcomi, carcinomi a piccole cellule e carcinomi a cellule di transizione. Ad oggi ci si riferisce alla classificazione dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) del 2016 e, se presente, devono essere indicate combinazioni di diversi tipi di carcinoma. Il dibattito sull'origine dell'adenocarcinoma acinoso alla prostata è ancora aperto nella comunità scientifica (Maitland et al. 2008) (Sanders et al. 2013) (Leao et al. 2017). È parere comune che le cellule staminali basali abbiano il ruolo di mantenere il giusto equilibrio tra le cellule basali e le cellule luminari secretorie. La teoria più accreditata sull'origine dell'adenocarcinoma della prostata sembra essere quella che la tumorigenesi sia dovuta all'alterazione delle cellule staminali basali.

Il trattamento per adenocarcinoma prostatico ad oggi prevede principalmente la prostatectomia radicale, raramente si ricorre ad un approccio farmacologico. Lo stesso tipo di intervento chirurgico può essere effettuato in caso di carcinoma vescicale muscolo-infiltrante.



*Figura 5*

Di rilevanza clinica è anche l'iperplasia prostatica benigna o adenoma. Dati recenti mostrano come questa condizione patologica sia assente in maschi sotto i 30 anni di età mentre il 50% degli uomini tra i 50 e i 60 anni manifestano questa patologia (Berry et al.1987) e, dopo gli 80 anni l'incidenza sale al 90% (Homma et al. 2001).

L'iperplasia prostatica benigna consiste in una proliferazione delle cellule prostatiche situate nella cosiddetta zona di transizione, ovvero la zona dell'organo in cui le cellule stromali ed epiteliali interagiscono. L'aumento del numero di cellule in questa zona porta ad un aumento del volume dell'organo che può causare ostruzione uretrale e altri sintomi a carico del basso tratto urinario.

I fattori di rischio per l'adenoma prostatico sono, oltre all'età, obesità, diabete, sindromi metaboliche e disfunzioni testicolari (Sarma et al. 2012). Ci sono inoltre evidenze che le citochine possano contribuire allo sviluppo della patologia promuovendo uno stato infiammatorio e stimolando la produzione di fattori di crescita (Skinder et al. 2016). Ad oggi il trattamento previsto per l'adenoma prostatico è di tipo farmacologico nella maggior parte dei casi ma, in base alla gravità della condizione, può essere effettuato una prostatectomia per migliorare la qualità di vita del paziente.

### 1.3 Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)

Ciliary Neurotrophic factor (CNTF) è un fattore neurotrofico pluripotente appartenente alla famiglia delle interleuchine di tipo 6 (IL-6).

CNTF è codificato da un gene localizzato, nell'uomo, in posizione 11q12.1. Il gene è lungo 3096 bp e presenta due esoni (Figura 6):

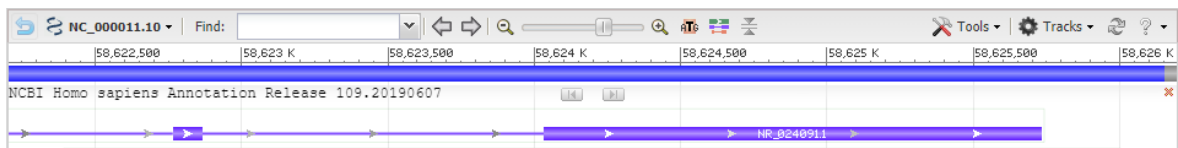


Figura 6

La proteina è costituita da 187 amminoacidi che formano 4 catene polipeptidiche con struttura secondaria ad alfa elica antiparallela (Figura 7) e ha peso molecolare pari a 22.7 KDa.

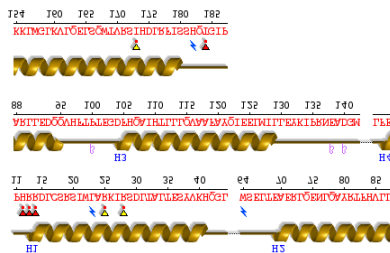


Figura 7

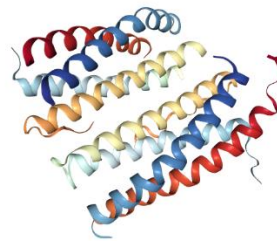


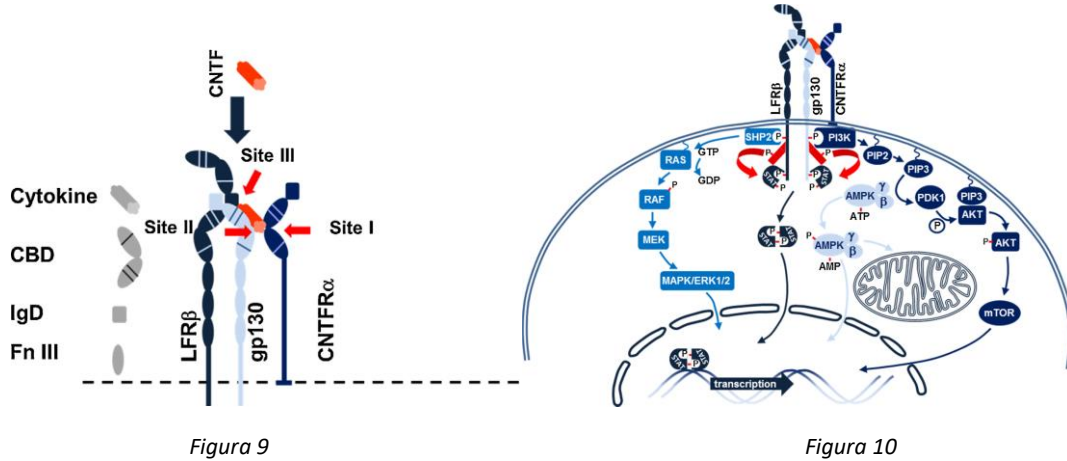
Figura 8

La struttura terziaria (Figura 8) presenta tre siti che permettono il legame con il suo recettore CNTF receptor (CNTF-R), un recettore eterotrimerico.

Il recettore per Ciliary Neurotrophic factor (CNTF-R) è costituito da 3 componenti: CNTFR $\alpha$ , una subunità *non-signaling* ancorata tramite glicosilfosfatidilinositolo, e le subunità gp130 e LIFR $\beta$  con funzione di *signaling*.

CNTF si lega al recettore gradualmente: inizialmente si lega alla catena ancorata a glicosilfosfatidilinositolo del CNTF-R $\alpha$ , seguendo una stechiometria

1:1, a questo punto il complesso CNTF-CNTFR $\alpha$  interagisce prima con gp130 e, infine, forma un legame con LIFR $\beta$  (Figura 9).



L'eterotrimerizzazione di queste componenti permette l'eventuale attivazione dei seguenti signaling:

1. JAK-STAT signaling pathway (mediante la fosforilazione di STAT3, pSTAT3)
2. MAPK/ERK signaling pathway (mediante la fosforilazione di ERK, pERK)
3. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway (mediante la fosforilazione di AKT, pAKT).

Per esempio, una volta avvenuta la fosforilazione di STAT3, pSTAT3 forma un dimero che trasloca nel nucleo dove attiva la trascrizione del gene target (Figura 10) (Boulton 1994).

La proteina è espressa in grandi quantità nelle cellule del tessuto nervoso, nel midollo osseo e nel fegato.

La proteina è espressa in grandi quantità nelle cellule del tessuto nervoso, nel midollo osseo e nel fegato.



## 1.4 Proprietà del CNTF

CNTF ha un effetto pleiotropico su diversi tessuti, principalmente tessuto nervoso e tessuto osseo, inoltre sono stati osservati e dimostrati effetti regolatori sul metabolismo e sul bilancio energetico (Ding et al. 2013)

Sul tessuto nervoso il CNTF ha effetti di tipo protettivo, in quanto promuove e regola lo sviluppo cellulare, e modula la risposta infiammatoria (Ernsberger et al. 1989).

Gli effetti neurogenici sono stati osservati prima in modelli cellulari, poi in modelli animali. La proteina promuove lo sviluppo di cellule del sistema nervoso centrale e permette la sopravvivenza di cellule del sistema nervoso periferico (Sendtner et al. 1991). Queste peculiarità del CNTF hanno portato a indagini precliniche che hanno utilizzato il CNTF come trattamento per le malattie neurodegenerative come la malattia di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (de Almeida et al. 2001). Questi studi, effettuati su modelli animali, hanno dato ottimi risultati per efficienza e tollerabilità della terapia.

Per quanto riguarda la modulazione della risposta infiammatoria, è stato osservato che, in topi knockout per il gene CNTF, comparivano sintomi analoghi a quelli della sclerosi multipla. La sclerosi multipla è una malattia autoimmune demielinizzante, causata da infiltrazione di cellule immunitarie. Somministrazioni intraperitoneali giornaliere di CNTF causavano una diminuzione dell'infiltrato infiammatorio e un aumento del numero di neuroni e oligodendrociti, con conseguente riduzione dei sintomi (Kuhlmann et al 2006).

Tramite indagini immunoistochimiche, è stata rilevata la presenza di CNTF in osteoblasti, osteoclasti, osteociti e condrociti, suggerendo un possibile ruolo della citochina nel metabolismo osseo. Studi *in vitro* sembrano dimostrare che il CNTF sia in grado di inibire la mineralizzazione ossea effettuata dagli osteoblasti. In altri studi, *in vivo*, effettuati su topi, è stato osservato che la carenza di CNTF è correlata ad un aumento del numero di osteoblasti. Inoltre, il knockout genico in modelli murini causa una differenza di caratteristiche ossee tra i due generi, suggerendo una possibile interazione di CNTF con gli ormoni sessuali steroidei (McGregor et al. 2010).

Gli effetti del CNTF sul metabolismo e sulla regolazione energetica sono stati osservati sia in modelli animali che in trials clinici. La somministrazione della

proteina, nei topi, causa una sostanziale perdita di peso perché si suppone che sia in grado di modificare il senso di sazietà, modulare il metabolismo energetico a livello cellulare e superare i meccanismi di resistenza alla leptina (Gloaguen et al. 1997). Questa scoperta, supportata da altre indagini che sembrano confermare questi dati, suggeriscono che il CNTF possa essere un potenziale bersaglio per il trattamento di disturbi metabolici (Pasquin et al. 2015).

### *1.5 CNTF e cancro*

L'espressione deregolata delle interleuchine di tipo 6 è frequente nei processi tumorali (Taniguchi et al. 2014). L'attività pro-tumorigenica delle IL-6 è causata da effetti diretti sull'attività delle cellule tumorali (ad esempio proliferazione cellulare, sopravvivenza o migrazione) ed effetti indiretti (ad esempio modulazione dell'infiammazione, immunosoppressione o angiogenesi), tutti questi processi modellano un microambiente favorevole allo sviluppo e al mantenimento di cellule tumorali (Figura 11) (Ernst et al. 2008). Inoltre, le interleuchine di tipo 6 sono state riconosciute come importanti regolatori del metabolismo energetico, fondamentale nei processi di inizio della crescita di massa tumorale (Petruzzelli et al. 2014).

Soffermandoci sugli effetti diretti delle IL-6 sulle cellule tumorali, è stato osservato che queste citochine potenziano la trascrizione di numerosi fattori essenziali per la sopravvivenza cellulare (ad esempio MYC e BCL X<sub>L</sub>), per l'inibizione dell'apoptosi (ad esempio BIRC5), aumento dell'angiogenesi tissutale e produzione di metastasi (ad esempio HIF-1 $\alpha$ ). In questo modo IL-6 contribuisce sia all'insorgenza che alla progressione dei processi tumorigenici. Durante la fase avanzata della malattia, IL-6 è coinvolta nella diffusione delle cellule metastatiche inducendo gli attivatori della trascrizione SNAIL e twist related protein (TWIST) (Sullivan et al. 2009). È inoltre rilevante il fatto che l'aumento della proliferazione cellulare dato da IL-6 si estenda anche sul compartimento staminale delle cellule cancerose, questa peculiarità è alla base dello sviluppo di tumori ematologici ed epiteliali *multidrug resistant* (Gawlik-Rzemieniewska et al. 2016)

Gli effetti indiretti di questa famiglia di proteine sulle cellule tumorali riguardano principalmente la formazione di un microambiente congeniale per la proliferazione delle cellule neoplasiche. È stato osservato che il microambiente tumorale è ricco di cellule immunitarie e immunosoppressive

sotto il controllo delle IL-6. Questa peculiarità ha fatto sì che si ponesse particolare attenzione sulla comprensione della modalità con cui queste citochine influenzano il rimodellamento di tessuto nel sito tumorale e circostante: IL-6 promuove processi infiammatori cronici, supporta l'angiogenesi dei tessuti tumorali e reprime la produzione di linfociti T<sub>H</sub>-1 responsabili dell'immunità antitumorale (Tsukamoto et al. 2018). IL-6, inoltre, causa la produzione di cellule pro-tumorigeniche T<sub>H</sub>-17 e myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). Oltre agli effetti sulle cellule della linea immunitaria, l'attività delle IL-6 ha effetto anche sui *cancer-associated fibroblast* (CAF) e sugli adipociti, e si ritiene che queste cellule possano avere un ruolo importante nelle fasi di insorgenza di cancro (Jenkins et al. 2018).

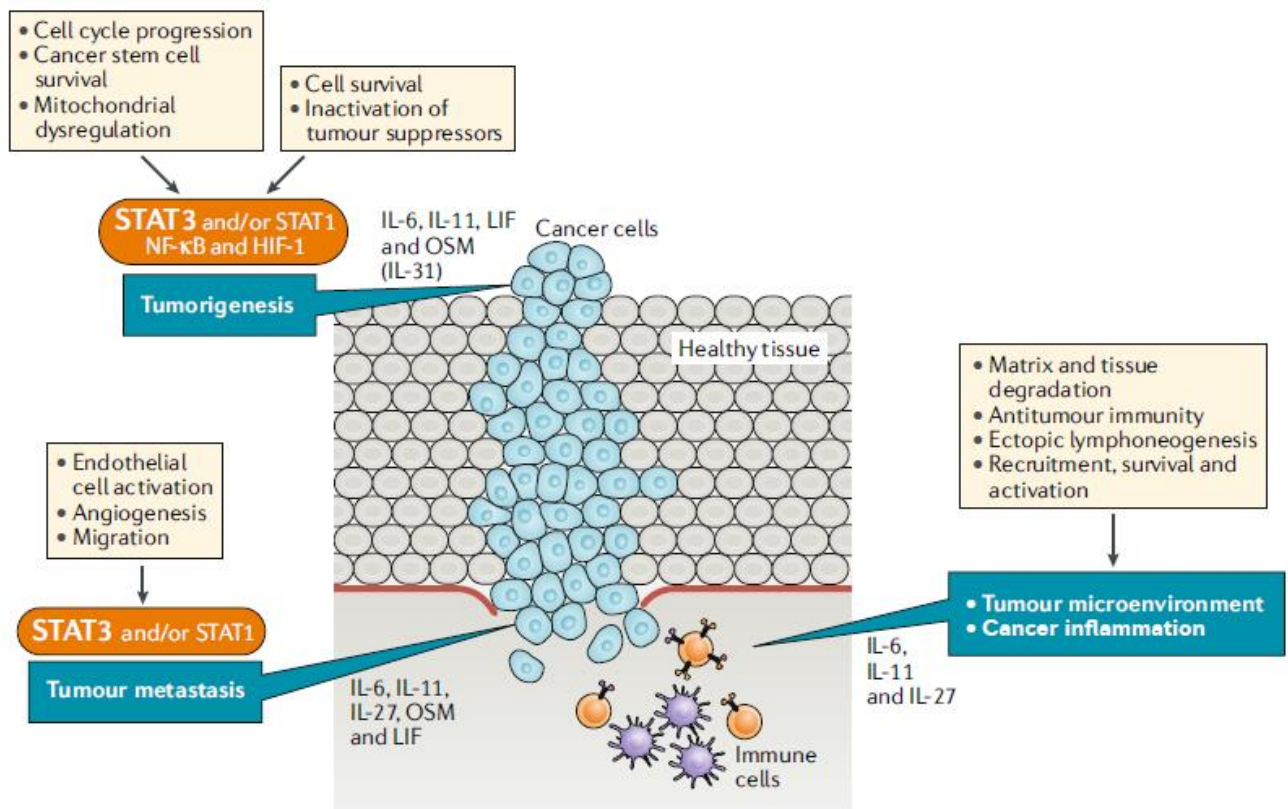


Figura 11

Gli studi menzionati hanno portato a cercare di chiarire il ruolo delle IL-6 nel cancro alla prostata. In uno studio (Kroon et al. 2013) è stato dimostrato che le cellule tumorali prostatiche secernono IL-6 ed hanno un'attivazione costitutiva attraverso STAT-3.

È stato in seguito dimostrato che uno dei target delle IL-6 nelle cellule di cancro alla prostata è il fattore VEGF, in questo studio infatti è stato osservato che le cellule LNCaP trattate con IL-6 secernevano alti livelli di VEGF (Pallares et al. 2006). L'iper stimolazione di questo fattore potrebbe essere coinvolta nell'angiogenesi dei tessuti cancerosi, un processo fondamentale che conferisce al tumore potenzialità invasiva e capacità di crescere rapidamente.

Oltre a facilitare la crescita e il potenziale metastatico, le IL-6 potrebbero essere coinvolte nella regolazione dei recettori per gli androgeni (AR). È stato osservato tramite esperimenti *in vitro* che le IL-6 possono subire una transizione funzionale, passando da inibitori paracrini della crescita nei tessuti sani, a stimolatori autocrini della crescita nei tessuti tumorali (Chung et al. 1999). Tra le alterazioni cellulari in casi di *Castration Resistant Prostate Cancer* (CRPC) sono state osservate l'amplificazione dell'espressione dei recettori per gli androgeni, mutazioni o deregolazioni delle proteine coregolatrici degli AR e iper-espressione di fattori di crescita che possono attivare gli AR in modo ligando indipendente (Zhu 2008). È stato provato che l'utilizzo di bicaltumide (un antiandrogeno) fosse in grado di inibire l'attivazione degli AR causata dalle IL-6 (Hobisch, et al. 1998), e che le IL-6 fossero in grado di "upregolare" l'espressione nucleare degli AR (So et al. 2003).

L'ipotesi che le interleuchine di tipo 6 abbiano un ruolo maggioritario nella transizione da cancro alla prostata ormone-dipendente ad ormone-indipendente è sostenuta dal fatto che IL-6 è in grado di promuovere la crescita di cellule di cancro alla prostata ormone-dipendenti in condizioni in cui sono presenti bassi livelli di androgeni (So et al. 2003). Appare quindi plausibile che lo stato di tumore ormone-indipendente possa spiegare l'aumento dei livelli di IL-6, le quali attivano i recettori per gli androgeni e sostengano la crescita del cancro alla prostata ormone indipendente.

I dati appena descritti suggeriscono che le citochine appartenenti alla famiglia delle interleuchine di tipo 6, tra cui CNTF, siano dei mediatori fondamentali in molti step chiave per la patogenesi di cancro alla prostata. Per questi motivi è stato ritenuto interessante approfondire il ruolo di CNTF nei casi di cancro alla prostata.

# Capitolo 2: Materiali e metodi

## 2.1 Campioni tissutali

Sono stati analizzati 10 casi di adenoma, 10 casi di prostata da cistoprostatectomia e 10 casi di prostatectomia radicale dove si è presa in considerazione la parte normale dei campioni. Inoltre, sono stati analizzati 20 casi di adenocarcinoma prostatico da prostatectomie radicali. I campioni provengono dalla Clinica di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria-Ospedali Riuniti di Ancona (Dr. Roberta Mazzucchelli). I campioni fissati in formalina tamponata al 10% sono stati inclusi in paraffina ed una volta ottenuti i blocchetti, da questi sono state tagliate sezioni di 4  $\mu\text{m}$ . Le sezioni poste su vetrini portaoggetto sono state fatte in seguito asciugare su piastra riscaldata a 37°C. Queste ultime sono state conservate in box a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

### 2.1.1 Immunoistochimica

La colorazione immunoistochimica è stata effettuata sulle sezioni di campioni di prostata inclusi in paraffina, utilizzando il metodo che prevede l'utilizzo del complesso streptavidina-biotina-perossidasi.

Ai campioni è stata prima rimossa la paraffina tramite lavaggi in xylolo per 30 minuti, poi le sezioni sono state reidratate in soluzioni a concentrazioni scalari di alcol etilico (dal 100% al 50%). A questo punto sono state incubate per 30 minuti in acqua distillata con perossido di idrogeno al 3% per bloccare l'attività delle perossidasi endogene. Al termine dei 30 minuti sono stati effettuati 3 lavaggi da 10 minuti in Tris-HCl pH 7,2.

Le sezioni di prostata hanno subito poi un processo di *smascheramento*: la formaldeide usata nella fissazione del campione lega tra loro le proteine con ponti metilenici (-CH<sub>2</sub>-) tra gruppi con un H attivo portando alla formazione di legami aspecifici tra le catene laterali impedendo il riconoscimento dell'epitopo da parte dell'anticorpo primario, perciò lo smascheramento è servito a rimuovere questi legami. Questo passaggio è stato effettuato

utilizzando una soluzione contenente proteinasi K diluita 1:2000 in TBE buffer per 3 minuti a 37 °C.

I possibili legami aspecifici dell'anticorpo sono stati bloccati utilizzando siero normale di cavallo diluito 1:75 per 30 minuti a temperatura ambiente.

A questo punto le sezioni sono state incubate *over night* a 4 °C con i seguenti anticorpi primari diluiti in Tris-HCl: CNTF (1:500) e CNTFR $\alpha$  (1:50). Dopo l'incubazione le sezioni sono state lavate per 3 volte in tampone Tris-HCl pH 7,2 ed in seguito incubate per 30 minuti con lo specifico anticorpo secondario biotinilato diluito 1:200 in Tris-HCl (Vector laboratories, Burlingame, CA).

Le sezioni poi sono state fatte reagire per un'ora con una soluzione ABC (Vector, Burlingame, CA), contenente il complesso avidina-biotina-perossidasi, diluito 1:100 in Tris-HCl. Questo complesso andrà a legarsi all'anticorpo secondario. A questo punto è stato utilizzato un substrato cromogeno per la perossidasi, la 3',3'-diamminobenzidina cloridrato (DAB). La reazione tra enzima e substrato ha comportato la comparsa di aggregati insolubili di colore marrone osservabili al microscopio ottico.

Le sezioni sono state infine contrastate con ematossilina per 10 secondi, disidratate in soluzioni di alcol a concentrazioni crescenti (da 50% a 100%) e xylolo, e montate con balsamo Eukitt.

## 2.2 Colture cellulari

Le linee cellulari utilizzate nello studio sono le seguenti:

- **PWR-1E:** cellule epiteliali di prostata umana normale. Per queste cellule è stato utilizzato il terreno Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM). A questo vengono aggiunti 0.05 mg/mL di Bovine pituitary extract (BPE) e 5 ng/mL di Epidermal Growth Factor (EGF). Le condizioni ottimali di coltura prevedono una temperatura di 37 °C e 5% di CO<sub>2</sub>.
- **LNCaP:** cellule epiteliali da carcinoma prostatico (castration sensitive) di *Homo sapiens*, sensibili alla terapia ormonale. Le cellule sono tenute in coltura in terreno RPMI-1640 al quale viene aggiunto il 10% di FBS (Fetal Bovine Serum). Le condizioni di coltura prevedono un optimum di temperatura a 37 °C e 5% di CO<sub>2</sub>.
- **22Rv1:** cellule epiteliali da carcinoma prostatico (castration resistant) di *Homo sapiens*, insensibili alla terapia ormonale. Coltivabili in terreno

RPMI-1640 con 10% di FBS. Le condizioni di coltura sono analoghe a quelle delle LNCaP.

### 2.2.1 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica di microscopia che prevede l'utilizzo di un anticorpo primario che si lega all'antigene di nostro interesse, e di un anticorpo secondario marcato con un fluorocromo che si legherà all'anticorpo primario. Il campione così trattato viene osservato tramite un particolare tipo di microscopio ottico, il microscopio a fluorescenza.

La tecnica è stata effettuata sulle seguenti linee cellulari al fine di evidenziare la localizzazione del CNTF e CNTFR $\alpha$ . Alle cellule è stato inizialmente eliminato il terreno di coltura ed in seguito sono stati effettuati 3 lavaggi da 5 minuti con tampone PBS 0.1 M. A questo punto le cellule sono state fissate in una soluzione al 4 % di paraformaldeide per 10 minuti, al termine dei quali sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS da 5 minuti ciascuno.

Le cellule sono state trattate con *Triton X-100* concentrato allo 0.2% per 5 minuti al fine di permeabilizzare la membrana cellulare e rendere possibile l'ingresso dell'anticorpo nel citoplasma. Dopo aver completato 3 lavaggi da 5 minuti in PBS, è stato effettuato il blocco dei legami aspecifici dell'anticorpo utilizzando una soluzione contenente il 3% di siero normale (proveniente dall'animale in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario) per un'ora. Le cellule sono poi state incubate over night a 4 °C con opportuno anticorpo primario: CNTF (1:150) e CNTFR $\alpha$  (1:100) (Abcam, Cambridge, UK).

Il giorno seguente sono stati effettuati 3 lavaggi da 5 minuti in PBS e, in seguito, le sezioni sono state incubate con gli specifici anticorpi secondari coniugati con il fluoroforo Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 555 al fine di discriminare i due antigeni CNTF e CNTFR $\alpha$  (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) diluiti 1:200 per un'ora a temperatura ambiente. A questo punto le cellule sono state colorate con TOTO3, un fluoroforo utilizzato per la rivelazione di acidi nucleici, per 10 minuti a temperatura ambiente. I vetrini sono stati successivamente montati con propilgallato ed

osservati al microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope (Nikon, Düsseldorf, Germany).

### 2.2.2 Trattamenti delle linee cellulari

I trattamenti delle tre linee cellulari sono stati effettuati piastrando le cellule ad una confluenza di  $1.5 \cdot 10^4/\text{cm}^2$  e trattandole con CNTF ricombinate umano (rhCNTF, cat. #257-NT-010, R&D Systems, Minneapolis, MN) a diverse concentrazioni (2, 10 e 20 ng/ml) per 15 minuti. Le cellule non trattate sono state incubate con il terreno appropriato ed usate come controllo. Alla fine del trattamento, le cellule sono state staccate e lisate utilizzando un tampone di lisi contenente aprotinina, PSMF, PBS, SDS, NONIDET-P40, sodio ortovanadato e sodio deossicolato. I lisati sono stati successivamente centrifugati a 15000 g per 5 minuti a 4 °C e i surnatanti sono stati congelati a -80 °C.

### 2.2.3 Western Blotting

Le proteine presenti nei surnatanti dei lisati cellulari sono state successivamente quantificate tramite il metodo di Bradford. È stata utilizzata una retta standard ottenuta utilizzando albumina bovina sierica (ABS) che permette la rilevazione di un intervallo di concentrazioni tra 2 µg/mL e 10 µg/mL. L'assorbanza è stata misurata a lunghezza d'onda pari a 595 nm.

Ciascun campione è stato preparato diluendo il campione in acqua e *sample buffer* (un tampone costituito dal 4% SDS, 10% β-mercaptoetanololo, 20% glicerolo, 0.004% bromofenolo). Una volta pronti, i campioni sono stati riscaldati a 95 °C. Il calore denatura le proteine, il *sample buffer* ha il duplice effetto di impedire il *refolding* proteico e conferire alle proteine carica negativa.

I campioni sono stati caricati su un gel di poliacrilammide e sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE). Le proteine, cariche negativamente tramite *sample buffer*, migrano dal polo negativo al polo positivo del gel mosse da una differenza di potenziale di 110 V.



Terminata la corsa elettroforetica le proteine presenti sul gel sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa tramite *TransBlot*.

Al termine del trasferimento la membrana è stata posta in immersione per un'ora, a temperatura ambiente, in soluzione contenente latte al 5% (latte liofilizzato disciolto in tampone TBS-T) per bloccare la formazione di legami aspecifici tra le proteine. Dopo questo passaggio la membrana è stata incubata over night a 4 °C con l'anticorpo primario, CNTF (1:300), CNTFR $\alpha$  (1:500). Il giorno seguente la membrana è stata lavata per tre volte in TBS-T e incubata con anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con perossidasi di rafano (HRP).

Il rilevamento delle bande è stato effettuato tramite *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad).

### 2.3 Tabella anticorpi utilizzati

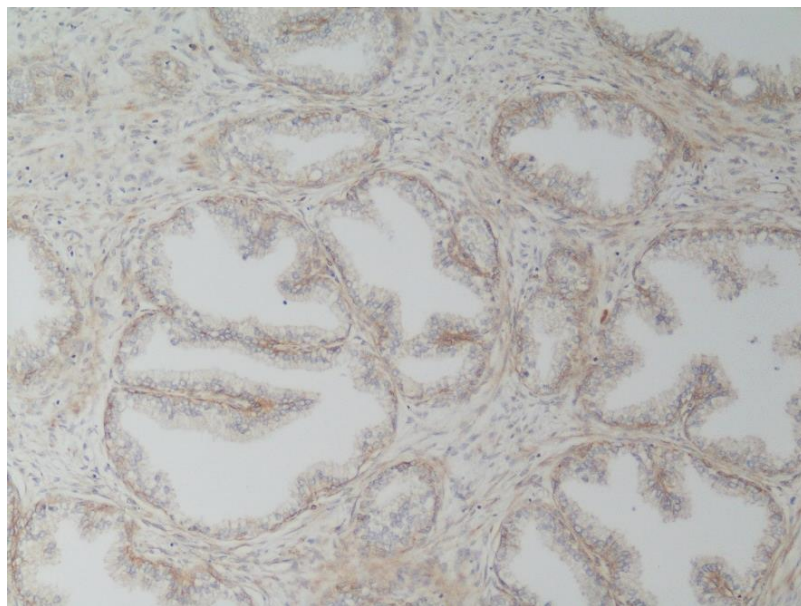
| <b>Anticorpo</b> | <b>IHC</b> | <b>WB</b> | <b>IHF</b> | <b>AZIENDA<br/>PRODUTTRICE</b>         |
|------------------|------------|-----------|------------|--|
| CNTF             | //         | 1:400     | //         | Thermo Fisher Scientific, Waltham, US  |
| CNTF             | 1:100      | //        | 1:150      | Abcam, Cambridge, UK                   |
| CNTFR $\alpha$   | //         | 1:400     | //         | Thermo Fisher Scientific, Waltham, US  |
| CNTFR $\alpha$   | 1:150      | //        | 1:100      | Abcam, Cambridge, UK                   |
| pAKT             | //         | 1:1000    | //         | Cell signaling technology, Danvers, US |
| AKT              | //         | 1:1000    | //         | Cell signaling technology, Danvers, US |
| pERK             | //         | 1:800     | //         | Cell signaling technology, Danvers, US |
| ERK              | //         | 1:1000    | //         | Cell signaling technology, Danvers, US |
| pSTAT3           | //         | 1:800     | //         | Cell signaling technology, Danvers, US |
| STAT3            | //         | 1:1000    | //         | Cell signaling technology, Danvers, US |
| ACTIN            | //         | 1:1000    | //         | Santa Cruz Biotechnology, Inc.         |

# Capitolo 3: Risultati

## 3.1 *Immunoistochimica*

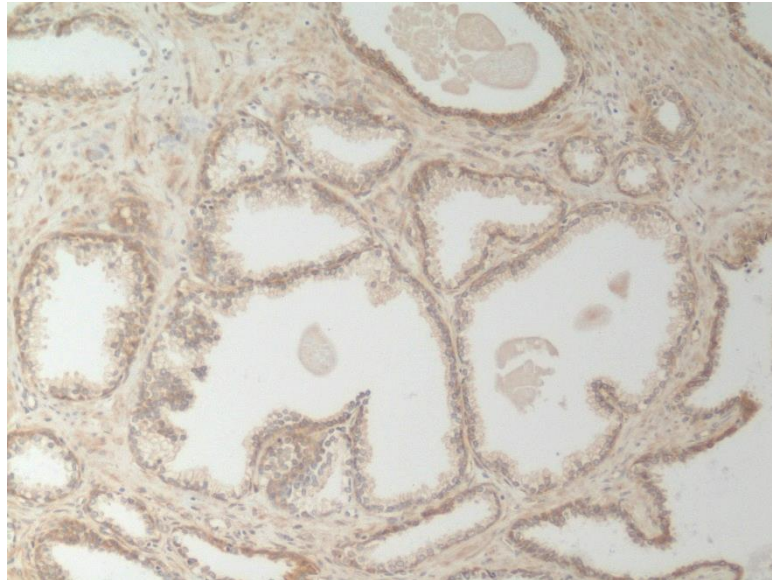
### 3.1.1 CNTF

Il CNTF nell'adenoma prostatico era localizzato nelle cellule basali delle ghiandole, la componente cellulare secernente delle ghiandole appariva per la maggior parte negativa. Una debole colorazione per il CNTF era presente nello stroma prostatico. La positività dello stroma è giustificata dal fatto che il CNTF è una citochina di secrezione (Figura 12).



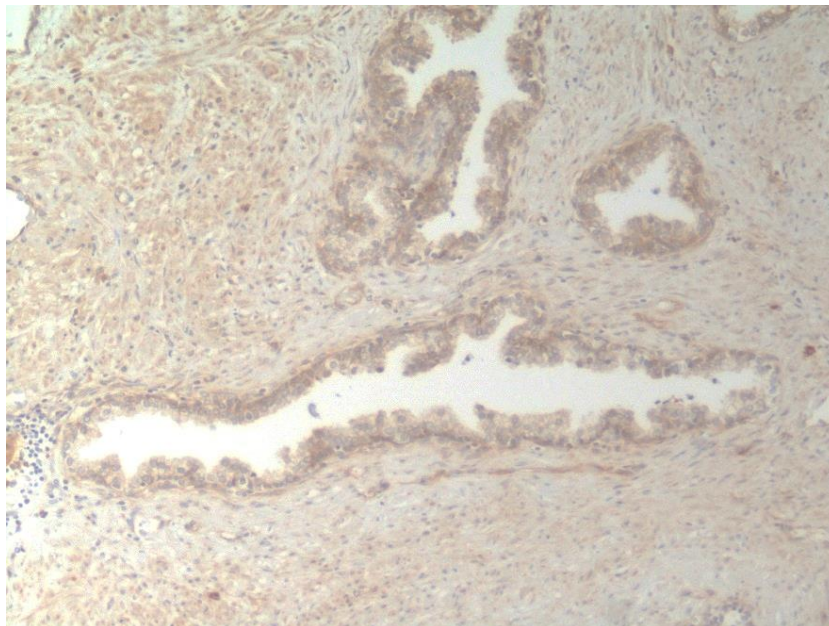
*Figura 12*

Nelle prostate derivanti da cistoprostatectomia per cancro vescicale il CNTF era evidentemente presente nelle cellule basali della componente ghiandolare prostatica, la componente secernente della ghiandola era lievemente marcata per il CNTF in alcune ghiandole. La componente stromale della ghiandola era evidentemente positiva per il CNTF nei campioni prostatici da cistoprostatectomia (Figura 13).



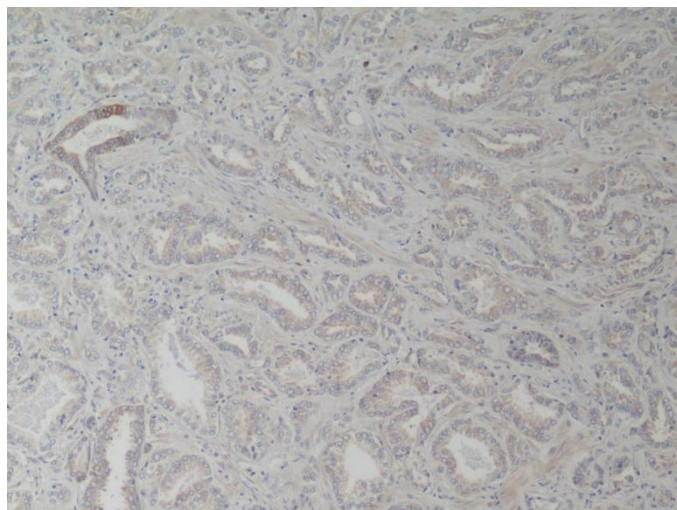
*Figura 13*

Nella componente “normal looking” della prostata derivante da prostatectomia radicale il CNTF era localizzato principalmente nelle cellule basali della componente ghiandolare, alcune ghiandole presentavano una chiara colorazione per il CNTF anche nella componente secernente. Lo stroma ghiandolare era chiaramente marcato per il CNTF (Figura 14).

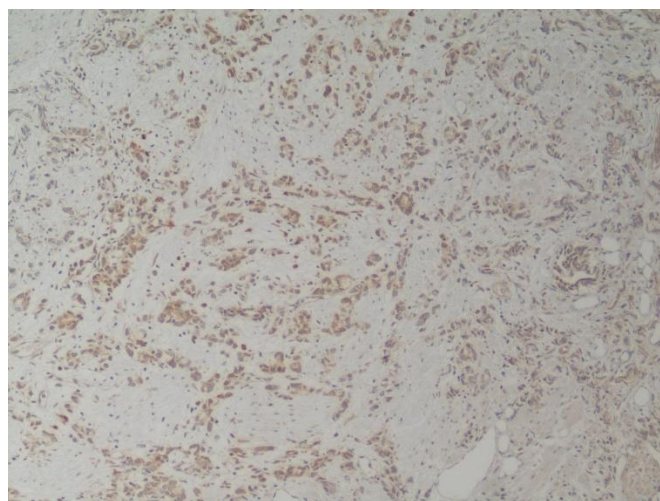


*Figura 14*

Il CNTF nel carcinoma prostatico era espresso sia nella componente cellulare che stromale nel carcinoma sensibile al trattamento ormonale (Figura 15a) mentre il carcinoma resistente alla terapia ormonale mostrava lo stroma prevalentemente negativo per il CNTF (Figura 15b).



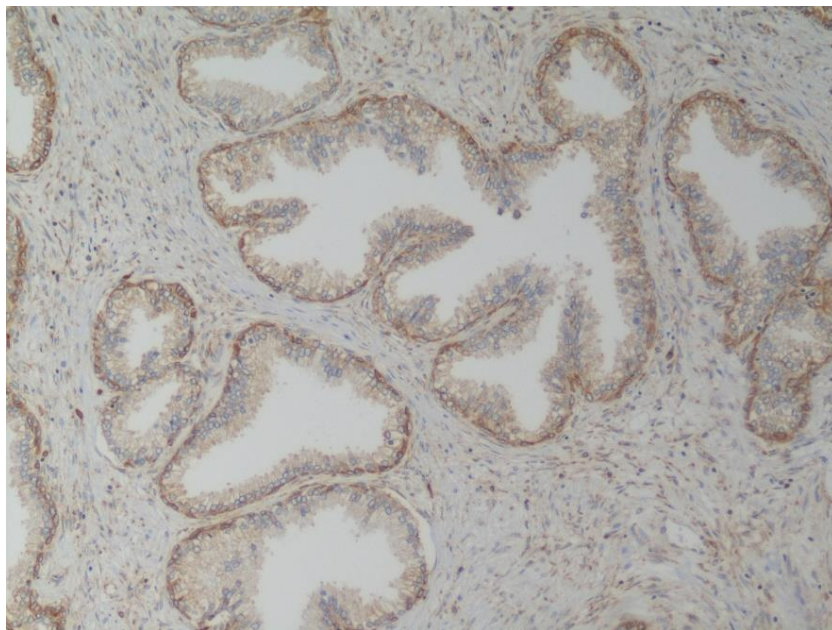
*Figura 15a*



*Figura 15b*

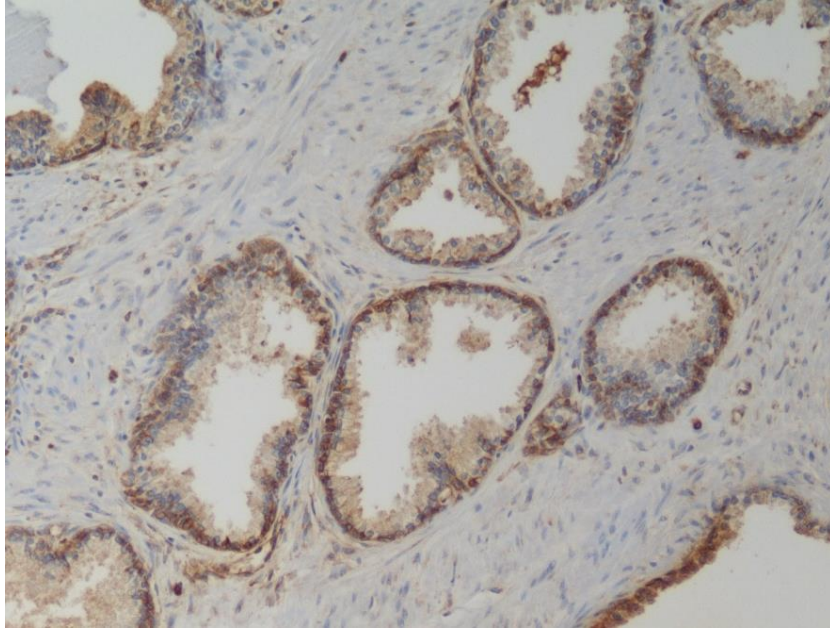
### 3.1.2 *CNTFR $\alpha$*

Il *CNTFR $\alpha$*  nell'adenoma prostatico è stato localizzato nelle cellule basali delle ghiandole prostatiche mentre la componente secernente appare debolmente colorata o negativa. La componente stromale della prostata è nella maggior parte dei casi analizzati negativa o molto debolmente marcata per il *CNTFR $\alpha$*  (Figura 16).



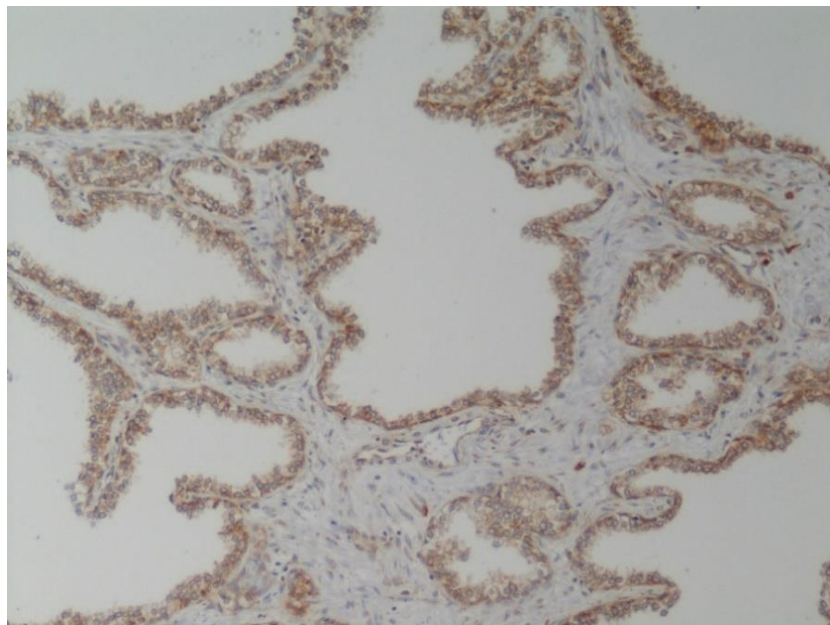
*Figura 16*

Nei campioni di prostata da cistoprostatectomia per cancro vescicale il *CNTFR $\alpha$*  era prevalentemente presente nelle cellule basali delle ghiandole prostatiche mentre le cellule secernenti presentavano un'immunocolorazione da moderata a forte (Figura 17).



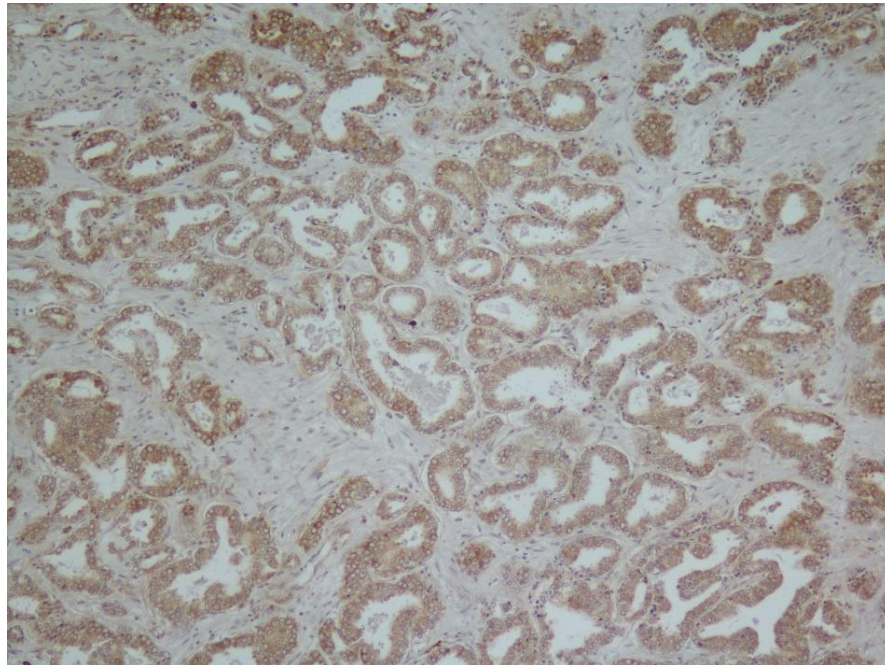
*Figura 17*

Nei campioni “normal looking” di prostata da prostatectomia radicale i CNTFR $\alpha$  era localizzato sia nelle cellule basali che in quelle secernenti della ghiandola mentre lo stroma era prevalentemente negativo (Figura 18).

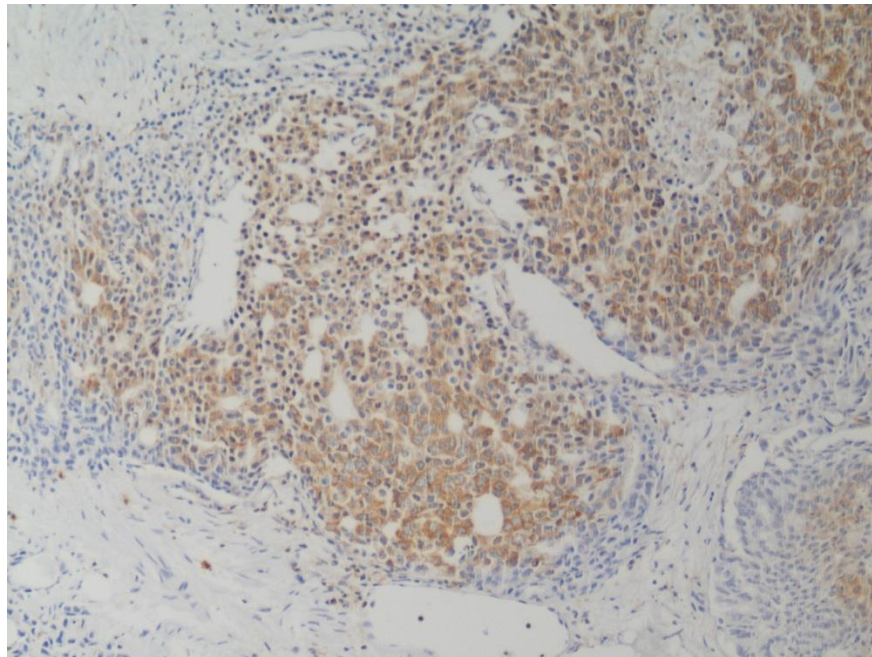


*Figura 18*

Il CNTFR $\alpha$  era espresso nelle cellule cancerogene mentre lo stroma risultava prevalentemente negativo sia nel carcinoma prostatico sensibile a terapia ormonale (Figura 19a) che nel carcinoma resistente a terapia ormonale (Figura 19b).



*Figura 29a*



*Figura 19b*



### 3.2 Immunofluorescenza

Successivamente alla localizzazione del CNTF e CNTFR $\alpha$  nei tessuti tumorali e normali, è stata studiata la loro espressione in tre linee cellulari normalmente utilizzate come modelli di prostata normale: PWR-1E (Figura 20) e patologica: LNCaP sensibile al trattamento ormonale (Figura 21) e 22Rv1 resistente al trattamento ormonale (Figura 22).

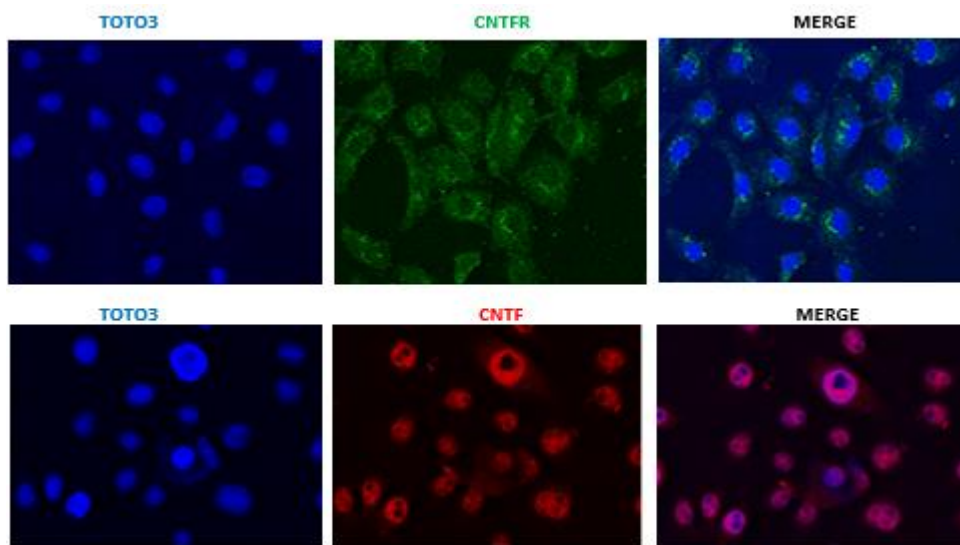


Figura 20

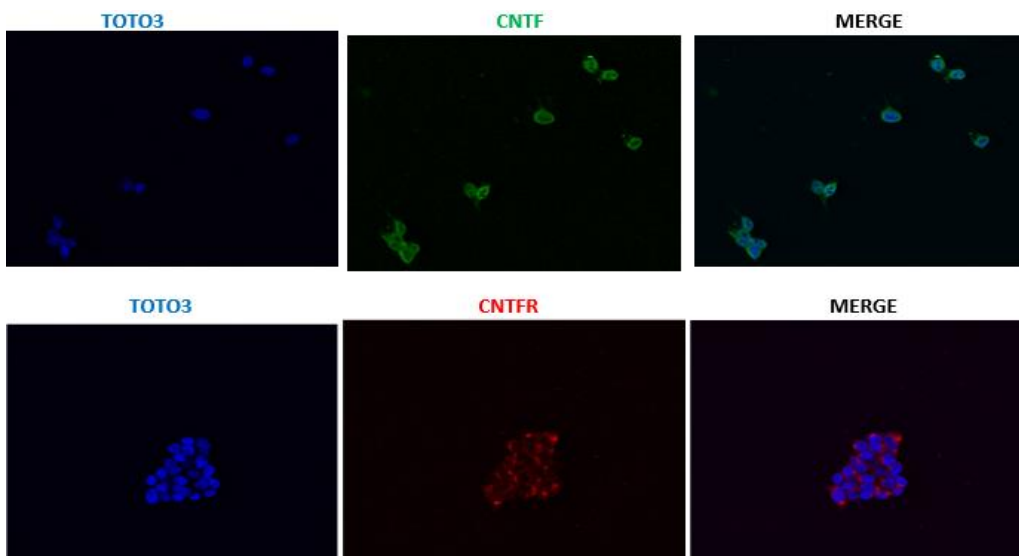


Figura 21

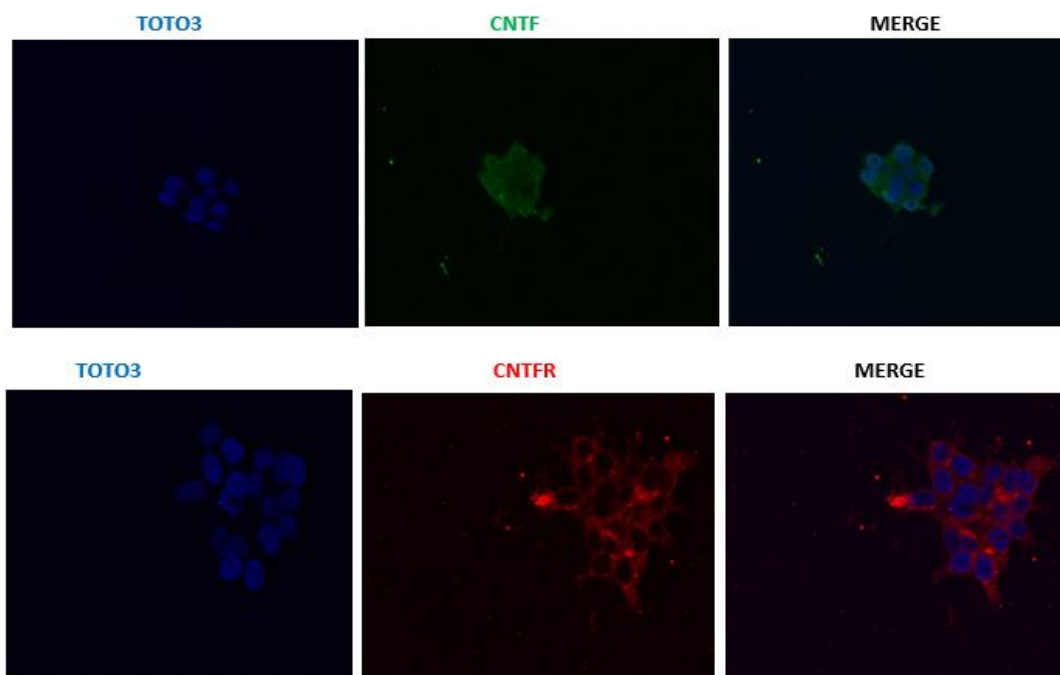


Figura 22

Nelle Figure 20, 21 e 22 sono mostrati i risultati dell'analisi di immunofluorescenza per CNTF e CNTFR $\alpha$  nelle tre linee cellulari. Come si può notare il CNTF e CNTFR $\alpha$  erano entrambi espressi in tutte e tre le linee cellulari. In particolare, il CNTF (verde in LNCap e 22Rv1, rosso in PWR-1E) era espresso nel citoplasma e nel nucleoplasma delle tre linee cellulari, mentre il CNTFR $\alpha$  (rosso in LNCap e 22Rv1, verde in PWR-1E) era espresso nel citoplasma e sulla membrana cellulare di tutte e tre le linee cellulari. Questi dati, insieme a quelli ottenuti dall'analisi immunoistochimica dei tessuti, confermano l'espressione del CNTF e CNTFR $\alpha$  nel tessuto prostatico normale e tumorale suggerendo un possibile ruolo funzionale di questa citochina e del suo recettore nello sviluppo normale e patologico della prostata.

### 3.3 Western blotting

I western blotting delle linee cellulari trattati con concentrazioni crescenti di rhCNTF hanno mostrato uno spegnimento del pERK ad una concentrazione di 10ng/ml nelle linee cellulari PWR-1E mentre sia pAKT che pSTAT3 non hanno subito variazioni significative (Figure 23).

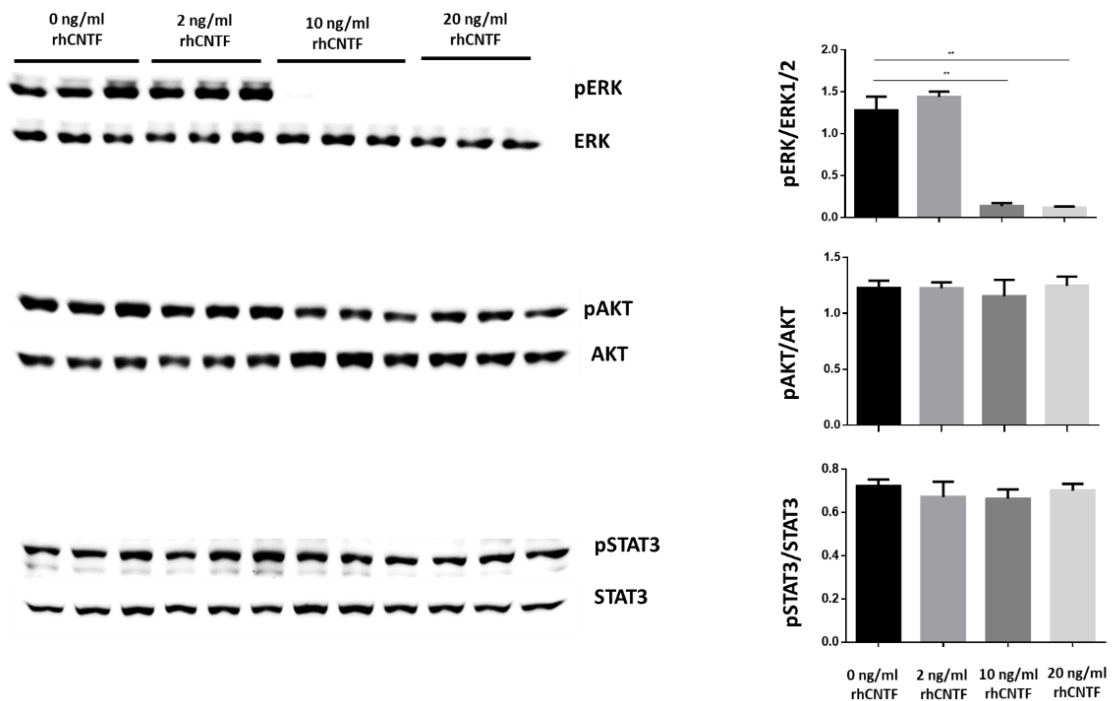


Figura 23

Per quanto riguarda le due linee cellulari di cancro, LNCaP (Figura 24) e 22Rv1(Figura 25) i western blotting hanno mostrato un aumento dell'espressione di pSTAT3 e una riduzione di pERK e pAKT (\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$ ).

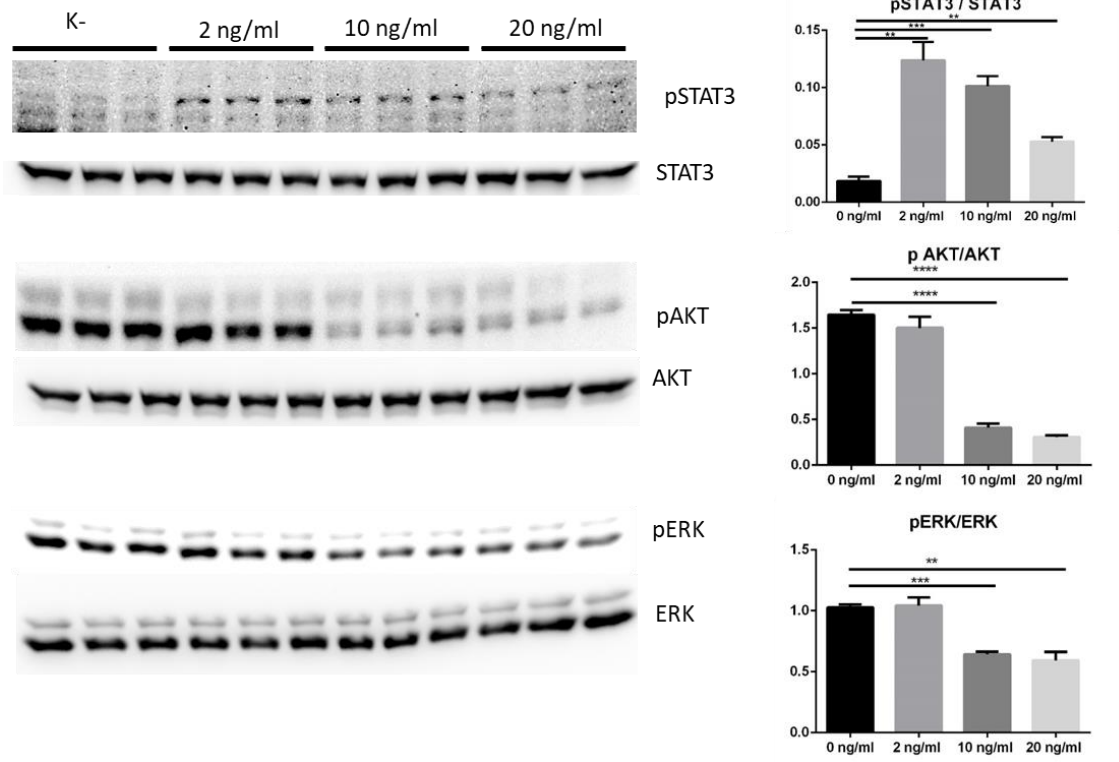


Figura 24

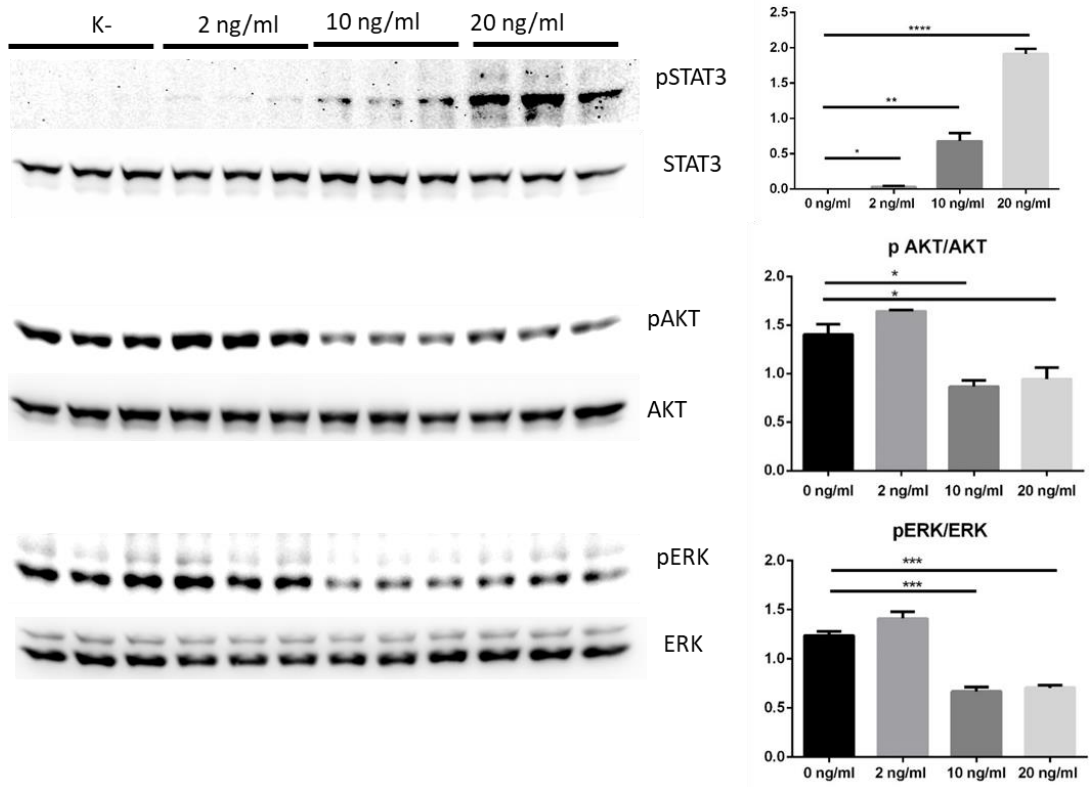


Figura 25

## Capitolo 4: Discussione

Durante l'inflammatione, le citochine della famiglia IL-6 regolano l'immunità innata attraverso effetti diretti sulle cellule immunitarie o indirettamente tramite attivazione delle cellule stromali residenti nel sito di inflammatione. Queste attività influenzano i cambiamenti nel reclutamento dei leucociti, la loro attivazione funzionale e la produzione di interleuchine da parte dei linfociti attivati che influenzano la crescita, proliferazione e sopravvivenza delle cellule tissutali vicine.

IL CNTF come tutte le interleuchine di tipo 6 è coinvolto nello sviluppo di processi infiammatori, sia acuti che cronici. La possibilità che ci sia un collegamento tra uno stato infiammatori prolungato e lo sviluppo di cancro appare sempre più concreta (Fisher et al. 2014). L'inflammatione cronica incide sulla regolazione cellulare nella carcinogenesi prostatica regolando il microambiente tumorale (Nguyen et al. 2013).

Nonostante i numerosi studi sul CNTF ed il suo recettore CNTFR $\alpha$  nel sistema nervoso centrale e negli organi periferici (Pasquin et al. 2015), non è noto in letteratura il suo ruolo funzionale nella prostata normale e patologica. In questo studio è stato dimostrato che sia il CNTF che il suo recettore sono presenti sia nel tessuto prostatico normale che patologico. In particolare, analizzando i risultati ottenuti tramite immunohistochimica vediamo come il CNTF è presente prevalentemente nel comparto basale delle ghiandole prostatiche dell'adenoma e delle ghiandole "normal looking" provenienti da cistectomie e prostatectomie. Mentre nell'adenoma lo stroma della ghiandola è prevalentemente negativo, nelle ghiandole che appaiono normali ma che

provengono da organi dove è presente un tumore lo stroma risulta esprimere più CNTF. Il fatto che questa citochina sia presente nelle cellule basali, dove è anche presente il suo recettore CNTFR $\alpha$ , ci suggerisce che il CNTF possa essere coinvolto nell'omeostasi della ghiandola prostatica poiché questo comparto rappresenta la componente staminale della ghiandola. La presenza del CNTF nello stroma ghiandolare indica che questa molecola può essere secreta dalla ghiandola e successivamente diffusa negli altri componenti tissutali. Il carcinoma prostatico è marcatamente positivo per il CNTFR $\alpha$  mentre è debolmente positivo per il CNTF. Ciò sta a significare che le cellule del carcinoma prostatico sono molto sensibili all'azione del CNTF. Per dimostrare qual è il ruolo funzionale del CNTF sono state utilizzate tre diverse linee cellulari di prostata, una normale (PWR-1E) e due (LNCaP e 22RV1) da carcinoma. Tramite l'immunofluorescenza è stato dimostrato che sia il CNTF che il CNTFR $\alpha$  sono presenti in tutte le tre linee cellulari. Queste tre linee cellulari sono state utilizzate per studiare il ruolo del CNTF nel metabolismo e nella crescita delle cellule prostatiche normali e patologiche analizzando i diversi pathway che possono essere attivati da questa citochina una volta legata al suo recettore. Quindi sono stati studiati i tre seguenti pathway (Nguyen et al. 2013):

- JAK-STAT signalling pathway (mediante l'analisi di pSTAT3)
- MAPK/ERK signalling pathway (mediante l'analisi di pERK1/2)
- PI3K/AKT/mTOR signalling pathway (mediante l'analisi di pAKT).

È stato interessante notare che la linea cellulare normale in seguito al trattamento con CNTF ha mostrato una diminuzione di pERK e nessuna attivazione delle altre due vie suggerendo un probabile ruolo nell'omeostasi della proliferazione cellulare. Al contrario le altre due linee cellulari tumorali

pur mostrando una diminuzione di pERK e pAKT hanno mostrato un'attivazione pSTAT3. Questo risultato è molto interessante perchè è stato dimostrato che l'aumento di pSTAT3 sia in grado di regolare il ciclo cellulare e promuovere la sopravvivenza delle cellule (Kroon et al. 2013). Questa differenza nella modalità di risposta al CNTF delle linee tumorali rispetto quella normale ci indica che il CNTF ha una funzione cellulo-specifica e che gioca un ruolo fondamentale nella carcinogenesi. I nostri dati sono supportati da alcuni studi in letteratura dove si dimostra che il CNTF può utilizzare, in base al tessuto pathway diversi (Rezende et al. 2009). L'azione del CNTF nelle cellule tumorali potrebbe essere correlata all'alterazione della proliferazione cellulare tipica dei tumori.

In conclusione, questo studio apre la via per nuove indagini finalizzate alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della carcinogenesi tumorale. In particolare, lo studio delle molecole coinvolte nella proliferazione ed invasività cellulare.



## Bibliografia

- Berry, Coffey, Walsh, Ewing. «The development of hbp hyperplasia with age.» *J Urol*, 1987: 474-479.
- Boulton, Stahl, Yancopoulos. «Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors.» *J. Biol. Chem*, n. 269 (1994): 11648-11655.
- Chung, Yu, Spiotto, Bartkowski, e Simons. «Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer.» *Prostate*, n. 38 (1999): 199–207.
- de Almeida, et al. «Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington’s disease.» *Neurobiology Disease*, n. 8 (2001): 433-446.
- Ding, et al. «Role of Ciliary Neurotrophic Factor in the Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells.» *Journal of Alzheimer’s Disease*, n. 37 (2013): 587-592.
- Ernsberger, e et al. «Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor.» *Neuron*, n. 2 (1989): 1275-1284.
- Ernst, e et al. «STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation- associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice.» *J. Clin. Invest*, n. 118 (2008): 1727-1738.
- Fisher, Appenheimer, Evans, e et. al. «The Two Faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment.» *Semin. Immunol.*, n. 26 (2014): 38-47.
- Gawlik- Rzemieniewska, N. & Bednarek, I. «The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells.» *Cancer Biol. Ther*, n. 17 (2016): 1–10.
- Gloaguen, et al. «Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, n. 94 (1997): 6456–6461.
- Hobisch, Eder, Putz, e et al. «Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor.» *Cancer Research*, n. 58 (1998): 4640-4645.
- Homma, Gotoh, Yokoyama, et al. «Outline of JUA clinical guidelines for benign prostatic hyperplasia.» *Int J Urol.*, 2001: 741-756.
- Jenkins, Simon A. Jones and Brendan J. «Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer.» *Nature Reviews immunology* 18 (2018): 773-789.
- Kench, et al. «Dataset for the reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy specimens: updated recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting.» *Virchows Arch.*, 2019: 263-277.

- Kroon, Berry, Stower et al. «JAK-STAT blockade inhibits tumor initiation and clonogenic recovery of prostate cancer stem-like cells.» *Cancer Res*, n. 73 (2013): 5288–98.
- Kroon, Berry, Stower, e et al. «JAK-STAT blockade inhibits tumor initiation and clonogenic recovery of prostate cancer stem-like cells.» *Cancer Research*, n. 73 (2013): 5288–5298.
- Kuhlmann, Remington, Cognet, Bourbonniere, Zehntner, Guilhot,. «Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis.» *Am. J. Pathol*, n. 169 (2006): 584-598.
- Leao, Faleiro, Binnie, de Mello, Maia, e Castelo-Branco. «Epigenetic therapy in urologic cancers: an update on clinical trials.» *Oncotarget*, 2017: 12484–12500.
- Maitland, e Collins. «Prostate cancer stem cells: a new target for therapy.» *J Clin Oncology*, 2008: 2862-2870.
- McGregor, Poulton, Walker, Pompolo, Quinn, e Martin. «Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex specific role in bone growth and remodeling.» *Calcif. Tissue Int*, n. 86 (2010): 261-270.
- Nguyen, Li, Tewari, e et al. «Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6).» *BJUI International*, n. 113 (2013): 986 - 992.
- Pallares, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans LI, e de Torres I. «Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues.» *Histol Histopathol*, n. 21 (2006): 857–865.
- Pasquin, e Sharma. «Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies.» *Cytokine & Growth Factor*, n. 26 (2015): 507-515.
- Petruzzelli, e et al. «A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia.» *Cell Metab*, n. 20 (2014): 433–447.
- Rezende, L.F, e et al. «Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3–SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis.» *Cytokine*, n. 46 (2009): 65-71.
- Sanders, et al. «Prostate transglutaminase (TGase-4, TGaseP) enhances the adhesion of prostate cancer cells to extracellular matrix, the potential role of TGase-core domain.» *J Transl Med*, 2013: 269.
- Sarma, e Wei. «Clinical practice. Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms.» *N Engl J Med*, 2012: 248-257.
- Sendtner, Arakawa, Stockli, Kreutzberg, e Thoenen. «Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival.» *J. Cell Sci. Suppl.*, n. 15 (1991): 103-106.
- Skinder, Danielle PA-C, Ilana PA-C Zacharia, Jillian PA-C Studin, e Jean DHSc Covino. «Benign prostatic hyperplasia.» *Journal of the American Academy of PAs*, 2016: 19-23.

- So, Lu W, Hou M, de Miguel F, Gerber L, e Gao AC. «Interleukin-6 promotes androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells.» *Clin Cancer Res*, n. 9 (2003): 370-376.
- Sullivan, N. J., e et al. «Interleukin-6 induces an epithelial mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells.» *Oncogene*, n. 28 (2009): 2940–2947.
- Taniguchi. «IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer.» *Semin. Immunol*, 2014: 26 54-74.
- Tsukamoto, e et al. «Immune-suppressive effects of interleukin-6 on T cell mediated immunity.» *Cancer science*, 2018: 523 -530.
- Zhang, Zhao, Li, Kirk, e Tang. «Prostate Luminal Progenitor Cells in Development and Cancer.» *Trend Cancer*, n. 1 (2018): 769-783.
- Zhu, e Kyprianou N. «Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells.» *Endocr Rel Cancer*, n. 15 (2008): 841–849.