



## ECTO-5'-NUCLEOTIDASI E PURINA NUCLEOSIDE FOSFORILASI NEL CARCINOMA MAMMARIO

Messina G.<sup>1</sup>, Zuccarini M.<sup>1</sup>, Del Fine P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di scienze mediche orali e biotecnologiche, Università degli studi di Chieti-Pescara

<sup>2</sup> U.O.C. Patologia Clinica di Chieti, ASL 02 ABRUZZO

### INTRODUZIONE

Gli enzimi ecto-5'-nucleotidasi (CD73) e purina nucleoside fosforilasi (PNP) fanno parte della famiglia degli enzimi deputati al metabolismo delle purine. Il CD73 catalizza la reazione di conversione dell'AMP in adenosina, mentre la PNP catalizza la reazione da inosina (metabolita dell'adenosina) ad ipoxantina e da guanosina a guanina. L'interesse nello studio delle purine è giustificato dal loro ruolo nella modulazione di varie funzioni fisiologiche e della loro implicazione nello sviluppo e nella proliferazione di cellule tumorali. Di conseguenza, lo studio degli enzimi deputati al metabolismo delle purine offre importanti opportunità nella scoperta di nuovi marcatori diagnostici, prognostici e terapeuti nell'ambito oncologico e non solo.

Il CD73 è noto per essere maggiormente espresso in diverse tipologie tumorali e di favorirne la progressione, specialmente attraverso la sua attività enzimatica di conversione dell'AMP in adenosina, nucleoside dall'attività immunosoppressiva nel microambiente tumorale.

Anche l'enzima (PNP), pur essendo meno conosciuto e studiato, sembrerebbe essere correlato all'aggressività tumorale.

Il carcinoma mammario rappresenta nelle donne circa il 30% di tutte le nuove diagnosi di cancro ed è ancora oggi la causa di morte più frequente dovuta a tumore. Studi precedenti hanno mostrato un aumento di recettori per le purine e dell'espressione di CD73 nei tumori al seno, in particolare in quelli più aggressivi.

### OBIETTIVO

Indagare, nel cancro al seno, l'espressione ed il ruolo del CD73 e della PNP e valutarne l'eventuale utilizzo come marcatori diagnostici, prognostici e terapeutici



## MATERIALI E METODI

### LINEE CELLULARI UTILIZZATE

MDA MB 231: linea di carcinoma mammario triplo negativa molto aggressiva non esprimente i recettori per estrogeno e progesterone. MCF 12A: linea cellulare di tessuto epiteliale mammario sano. Le cellule sono state mantenute a +37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>/95% di aria in terreno completo (DMEM con % di FBS e 1% di pen/strep) e starvate in DMEM 1%FBS due ore prima dei trattamenti. Dopo la starvazione, le cellule trattate in condizioni di normossia sono state poste in incubatore a +37°C mentre quelle trattate in condizioni di ipossia sono state poste in camerette ipossiche saturate con una miscela di gas contenente l'1% di O<sub>2</sub>, il 5% di CO<sub>2</sub> e il 94% di N<sub>2</sub> e incubate a +37°C:

### TRATTAMENTI

Le cellule sono state seminate 30000/well in DMEM/10% FBS inattivo/1% pen/strep per 24 ore e starvate per 2 ore (DMEM/1% FBS/1% pen/strep). Successivamente sono state trattate fino a 72 ore con: 1) APCP, un inibitore specifico del CD73, alle concentrazioni di 5uM, 50uM e 100uM; 2) forodesina, inibitore specifico della PNP, alle concentrazioni di 2uM, 20uM e 100uM; 3) adenosina alle concentrazioni di 50 uM, 100uM e 500 uM; 4) guanina alle concentrazioni di 75 uM, 150 uM e 300 uM.

### WESTERN BLOT PER VALUTARE L'ESPRESSIONE DEGLI ENZIMI

Dopo 24 ore dai trattamenti, le cellule sono state lavate in PBS e lisate con lysis buffer e 1% di inibitori delle proteasi. Il lisato è stato centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti a freddo. La quantificazione proteica è stata effettuata mediante saggio Bradford. I campioni diluiti in SDS sono stati bolliti 5 minuti e separati in gel al 10% SDS poliacrilammide. L'incubazione con l'anticorpo primario è avvenuta overnight a +4°C, mentre con l'anticorpo secondario è avvenuta per 1 ora temperatura ambiente. La normalizzazione è stata effettuata tramite la quantificazione di b-actina. Le bande sono state visualizzate tramite chemiluminescenza e quantificate mediante analisi densitometrica con l'Image J 1.53 software.

### XCELLIGENCE PER VALUTARE LA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Per valutare l'effetto dei trattamenti con gli inibitori degli enzimi e con i prodotti stessi degli enzimi sulla proliferazione cellulare è stato utilizzato l'analizzatore cellulare in tempo reale xCELLigence, il quale registra l'impedenza tramite elettrodi posti sul fondo dei pozzetti della piastra. L'impedenza è espressa come cell index, la cui grandezza è proporzionale alla proliferazione delle cellule. I valori dell'indice cellulare sono stati normalizzati prima dell'aggiunta dei trattamenti e sono stati poi registrati ogni 30 minuti fino a 96 ore.

Le well contenenti unicamente terreno di coltura senza trattamento sono state utilizzate come controlli basali.

### ANALISI STATISTICA

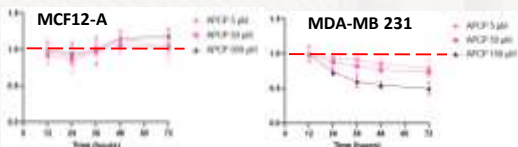
Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte. L'analisi statistica è stata effettuata con t-test Student e one-way analysis of variance. Le differenze con p <0.05 sono state considerate statisticamente significative.



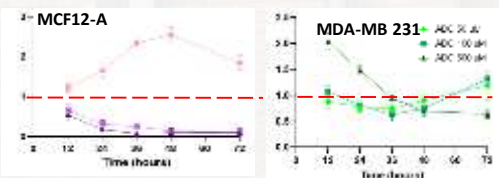


## RISULTATI CD73

L'espressione di CD73 era nettamente aumentata nelle cellule di carcinoma mammario rispetto alle cellule normali.

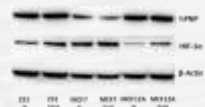


L'inibizione del CD73 con l'inibitore specifico **APCP** non provocava nessun effetto significativo sulla proliferazione valutata nelle 72 ore delle cellule non tumorali MCF12A mentre riduceva la proliferazione delle cellule triplo negative MDA MB 231 in maniera dose e tempo dipendente.

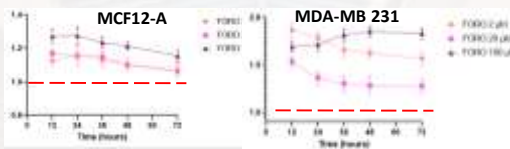


Nelle MCF-12A, la concentrazione di 50 µM di **adenosina** aumentava la proliferazione mentre a concentrazioni maggiori riduceva la proliferazione in maniera tempo- e dose-dipendente. Nelle cellule MDA-MB-231, le concentrazioni di Ado a 50 µM e 100 µM riducevano la proliferazione mentre a 500 µM aumentava la proliferazione nelle prime 24ore e poi diminuiva fino a 72 ore.

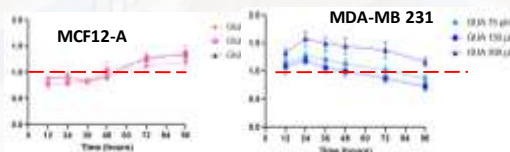
## RISULTATI PNP



L'ipossia aumentava l'espressione del CD73 ma non quella della PNP



L'inibizione della PNP con la **forodesina** provocava un aumento della proliferazione delle cellule MCF-12°. Anche nelle MDA-MB-231 la forodesina causava un aumento della proliferazione nelle 12 ore e poi diminuiva con le concentrazioni di 2µM e 20µM mentre aumentava con la concentrazione di 100µM fino alle 72 ore.



Nelle MCF-12A, la **guanina** non provocava nessun effetto sulla proliferazione, mentre nelle MDA-MB-231 aveva un effetto proliferativo a concentrazione di 300 µM fino a 72 ore, mentre alle concentrazioni minori non provocava nessun effetto significativo.

## CONCLUSIONE

L'inibizione di CD73 si è dimostrata protettiva riducendo la proliferazione delle cellule MDA-MB-231 in modo dose-dipendente mentre l'inibizione della PNP ha favorito la proliferazione cellulare. Questo risultato potrebbe essere dovuto rispettivamente alla mancata produzione di adenosina e di guanina. Tuttavia, i risultati ottenuti con l'inibizione degli enzimi non sono coerenti con quelli ottenuti dalla somministrazione dei loro rispettivi prodotti adenosina e guanina. Questo dato rivela l'esistenza di meccanismi extraenzimatici che coinvolgono CD73 e PNP nella progressione tumorale.

Senza dubbio la manipolazione degli enzimi deputati al metabolismo delle purine ha effetti sulla proliferazione cellulare e sulla progressione tumorale, ma sono essenziali ulteriori studi per la valutazione del valore diagnostico e prognostico del CD73 e della PNP nel carcinoma mammario.

## BIBLIOGRAFIA

- Siegel et al., 2022*
- Stagg et al., 2011*
- Zhi et al., 2007*
- Zhou et al. 2007*
- Buisseret et al., 2018*
- Giuliani et al., 2016*