

Un'analisi integrata del secretoma delle cellule umane di glioblastoma U87 rivela l'effetto antiproliferativo della Guanina.

Iacovone Giorgia¹, Del Fine Pietro², Mariachiara Zuccarini¹

1. Università degli Studi Gabriele d'Annunzio, Chieti – 2. U.O.C. Patologia Clinica di Chieti, ASL 02 ABRUZZO

INTRODUZIONE

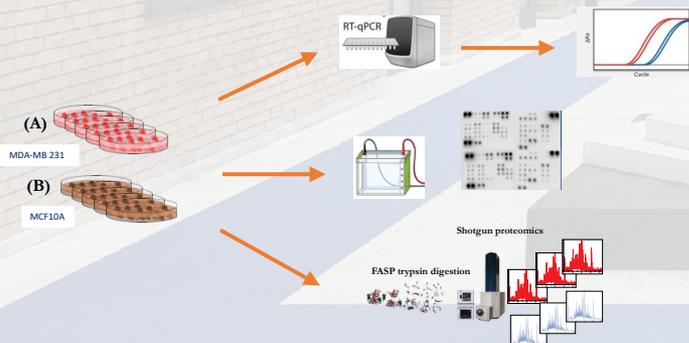
Il glioblastoma è il tumore cerebrale maligno più comune, caratterizzato da frequenti recidive e scarsa risposta terapeutica^[1]. Il sistema purinergico è coinvolto in numerosi processi quali neurotrasmissione, l'infiammazione, il differenziamento, la proliferazione cellulare e l'apoptosi^[2].

OBIETTIVO

Valutare nelle cellule umane di glioblastoma: come la Guanina potesse modulare l'espressione di geni correlati a proliferazione ed invasività tumorale e le vie di trasduzione del segnale coinvolte in questo effetto.

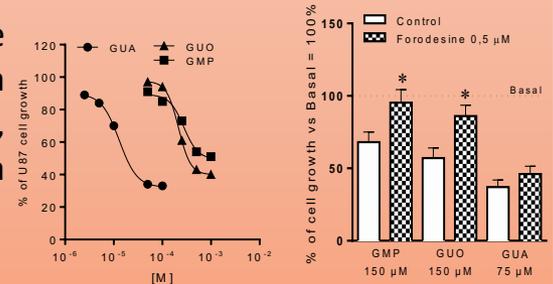
MATERIALI E METODI

Per valutare gli effetti delle purine a base guaninica nella proliferazione delle cellule di glioblastoma è stato effettuato un saggio MTS. È stata analizzata l'espressione dei geni associati a cancerogenesi mediante Real time PCR e WesternBlot. Invece, il pattern di proteine maggiormente coinvolte nella biologia dei tumori è stato valutato con uno studio di proteomica.

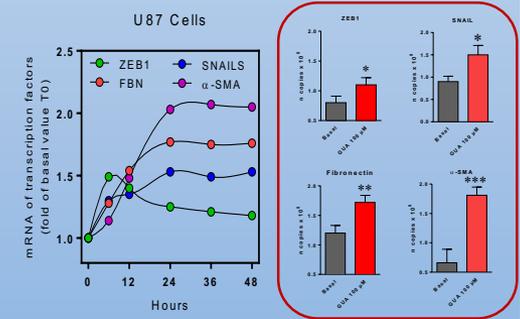


RISULTATI

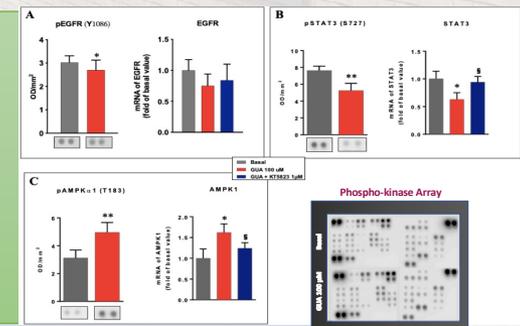
1. Dal saggio MTS è stato riscontrato che la Guanina riduce la proliferazione cellulare in maniera dose-dipendente con una potenza maggiore rispetto a Guanosina o GMP (guanosina mono fosfato), il trattamento con Forodesina, l'inibitore della PNP (purina nucleotide fosforilasi, enzima che converte la guanosina in guanina) revertiva gli effetti sia della Guanosina che del GMP.



2. Il trattamento con Guanina 100 uM per 48h aumentava l'espressione di tutti i marker con un andamento variato nel tempo. Questo risultato è sembrato in contrasto con l'effetto antiproliferativo evocato dalla Guanina nelle stesse cellule ed infatti deve essere ancora investigato anche se molto probabilmente è dovuto ad un'espressione basale molto alta di questi marker che è difficile da modulare con le concentrazioni di Guanina utilizzate.

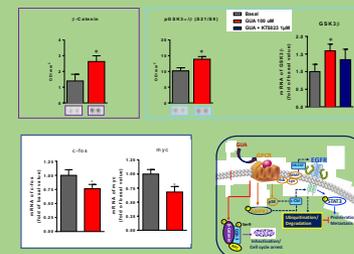


3. Con un un fosfo-chinasi array e conferma con RealTime-PCR, è stato visto come la Guanina dopo 24 ore diminuiva moderatamente la fosforilazione dell'EGFR (associato a malignità di molti tumori) anche l'espressione di STAT-3, uno dei maggiori effettori dell'EGFR, era diminuito. La Guanina, allo stesso tempo, aumentava la fosforilazione di AMPK-1 che degrada EGFR.

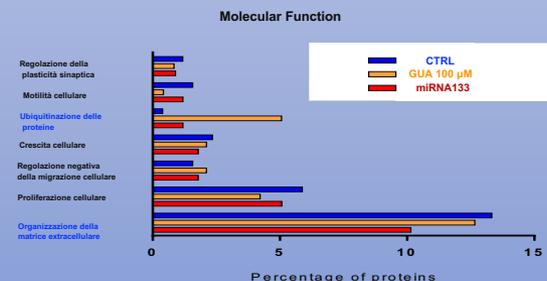


RISULTATI

4. Sempre dall'analisi del fosfo-array poi confermato da RT-PCR, è stato osservato che un'altra via di segnale modulata dalla Guanina era quella di beta catenina (associata alla via di segnale di wint) e GSK3. La Guanina aumentava la fosforilazione di beta catenina che a sua volta fosforilava GSK3 al suo sito inibitorio causando la formazione di un complesso inattivo che favoriva l'arresto del ciclo cellulare. Inoltre, la Guanina riduceva significativamente l'espressione di due oncogeni C-myc e c-fos correlati con prognosi negativa nei pazienti affetti da glioblastoma.



5. Per quanto riguarda le proteine rilasciate, si è visto che la Guanina 100uM diminuiva le proteine della matrice extracellulare coinvolte nella migrazione e adesione cellulare, mentre aumentava quelle che regolavano l'ubiquitinazione.



CONCLUSIONI

Nonostante la Guanina aumentasse l'espressione di geni associati all'invasività dei tumori, la sua capacità di sopprimere vie di segnale associate ad EGFR, beta catenina, c-fos e c-myc suggeriva il ruolo protettivo della stessa Guanina.

Nell'insieme, i dati suggeriscono che la Guanina regola negativamente la proliferazione delle cellule di glioblastoma attraverso vie di segnale non lineari che formano un complesso network che coinvolge EGFR e altri circuiti associati alla proliferazione delle cellule tumorali.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera W. Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives. *Biomed Res Int.* 2017;2017:8013575. doi: 10.1155/2017/8013575. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28316990; PMCID: PMC5337853.
- [2] Di Liberto, V., G. Mudò, R. Garozzo, M. Frinchi, V. Fernandez-Dueñas, P. Di Iorio, R. Ciccarelli, F. Caciagli, D. F. Condorelli, F. Ciruela and N. Belluardo (2016). "The Guanine-Based Purinergic System: The Tale of An Orphan Neuromodulation." *Front Pharmacol* **7**: 158.