

INTRODUZIONE

LA PROSTATA

La prostata, il cui nome deriva dal greco *prosteitos* ("posta davanti") è un organo ghiandolare esocrino appartenente all'apparato genitale maschile. È situato nella piccola pelvi, posto anteriormente (da cui il nome) ed alla base della vescica e circonda completamente la prima porzione dell'uretra. Nell'adulto pesa mediamente intorno ai 25-30 grammi.

La sua funzione principale è quella di produrre ed emettere il liquido seminale, uno dei costituenti dello sperma, che contiene gli elementi necessari a nutrire e veicolare gli spermatozoi. Essa è anche attraversata obliquamente dai dotti eiaculatori, che sboccano nell'uretra prostatica dove il liquido seminale può unirsi agli spermatozoi.

La prostata è costituita da una serie di ghiandole tubulo acinose ramificate, incluse in un tessuto stromale di natura fibro-muscolare, che si aprono nell'uretra prostatica. L'epitelio dei dotti prostatici e degli acini è composto da 3 diversi tipi di cellule: le cellule luminali cilindriche, le cellule basali ed una componente minoritaria di cellule neuroendocrine (NE)¹. Le cellule cilindriche contengono numerosi granuli secretori; il secreto prostatico costituisce circa il 15-30 % del liquido seminale. È debolmente acido e contiene numerosi enzimi idrolitici (fibrinolisinasi, proteasi di varia natura) che riducono la viscosità del liquido seminale durante l'eiaculazione. La distribuzione delle componenti epiteliale e stromale nella prostata non è uniforme: ciò permette di distinguere, nel contesto della ghiandola, varie zone aventi caratteristiche strutturali e funzionali proprie. Macroscopicamente la ghiandola viene suddivisa in quattro zone:

zona di transizione - comprende circa il 5% del tessuto prostatico e circonda la parte prossimale dell'uretra prostatica, costituisce la sede di origine dell'ipertrofia prostatica benigna; *zona centrale* - comprendente circa il 25% delle strutture ghiandolari, circonda i dotti eiaculatori e si estende dalla base della prostata allo

sbocco dei dotti eiaculatori; *zona periferica* - costituisce il 70% del tessuto ghiandolare ed è l'area più spesso interessata dal carcinoma e dai processi infiammatori dell'organo². Lo stroma fibro-muscolare, situato anteriormente, non contiene tessuto ghiandolare.

IL TUMORE PROSTATICO

Epidemiologia

L'incidenza globale del carcinoma prostatico (CP) è in aumento, soprattutto nei Paesi occidentali. Le incidenze più alte sono registrate a carico della popolazione afroamericana (185 casi per 100.000 abitanti), seguita dalle popolazioni caucasiche dei paesi scandinavi (90 casi su 100.000 abitanti). Nei Paesi asiatici i tassi d'incidenza sono molto più bassi (in Cina 1,7 casi su 100.000 abitanti)³.

È di estremo interesse il fatto che le popolazioni asiatiche emigrate in Occidente presentino, dopo alcune generazioni, tassi di incidenza simili a quelli della popolazione originaria del Paese verso cui è avvenuta l'emigrazione. In Europa il tasso di incidenza del CP è di 55 casi per 100.000 abitanti e quello di mortalità di 22,6 decessi per 100.000 individui⁴. Il rischio cumulativo di ammalarsi di cancro della prostata, considerato fino all'età massima di 74 anni, è del 4 % e quello di morire per malattia dell'1,2 %.

La neoplasia della prostata rappresenta la seconda causa di morte dopo il tumore polmonare nel sesso maschile ed è più frequente dopo i 50 anni. In Italia, il processo di invecchiamento della popolazione, la conseguente crescita del numero di nuovi casi di tumore prostatico e la migliore sopravvivenza hanno determinato un forte aumento della prevalenza nel corso degli ultimi decenni⁴. Dal 1970 al 2005 l'incidenza è aumentata considerevolmente: è passata da 18,5/100.000 a 83,22/100.000 abitanti⁵. Le regioni con il più alto numero di nuovi casi sono il Piemonte (121/100.000), il Trentino Alto Adige (115/100.000), la Lombardia (118/100.000) e l'Umbria (108/100.000)⁵. In Toscana e nel resto del centro Italia, tuttavia, dal 2003 si è assistito ad una lieve riduzione di nuovi casi con CP probabilmente dovuta all'introduzione del test di screening del PSA (Prostatic

Specific Antigen) nel decennio precedente⁶.

Fattori di rischio e eziologia

Non è perfettamente chiara, a tutt'oggi, l'eziologia della neoplasia prostatica. E' invece un dato riportato in letteratura che esiste un'associazione tra fattori di rischio e maggior incidenza di malattia⁴.

Età. L'età avanzata rappresenta uno dei fattori di rischio più evidenti del tumore. La malattia è di raro riscontro prima dei 50 anni, mentre l'incidenza aumenta esponenzialmente con l'invecchiamento⁷.

Razza. E' stato riscontrato che la razza nera ha un rischio più elevato di insorgenza di carcinoma prostatico³.

Ormoni e attività sessuale. La presenza di ormoni androgeni biologicamente attivi in circolo costituisce un possibile fattore causale di notevole rilievo. Il polimorfismo genico dell'enzima 5 α -reduttasi e del recettore androgenico potrebbero determinare variazioni dei livelli e attività biologiche degli androgeni e potrebbe quindi spiegare le differenze inter-etniche rilevate nell'incidenza⁸.

Fattori ambientali e dietetici. L'incidenza di riscontri autoptici di neo-plasie prostatiche è simile in tutto il mondo, mentre varia l'incidenza della malattia clinica. Sembra, perciò, che i fattori ambientali svolgano un ruolo nell'insorgenza della patologia. Si ritiene che una dieta ricca di lipidi, come l'acido α -linoleico, o di idrocarburi aromatici policiclici, che si formano durante la cottura di carni rosse, incrementi il rischio^{9,10}. Anche un *body mass index* (BMI) elevato è correlato ad un aumento di incidenza della patologia. L'obesità sarebbe responsabile di forme biologicamente più aggressive, ad alto grado e frequentemente recidivanti⁹. Fattori dietetici protettivi sembrano invece essere il licopene (contenuto nei pomodori)¹¹, il selenio, la vitamina E, la soia¹², il tè verde¹³. Attualmente, sono in corso studi per dimostrare l'effettiva utilità di una eventuale chemio-prevenzione.

Fattori familiari e genetici. L'aggregazione familiare e la diffusione razziale del carcinoma prostatico suggeriscono l'impatto di fattori genetici. Sono stati identificati 7 loci di suscettibilità¹⁰ per il carcinoma prostatico: il più studiato è nel

cromosoma 1 (1q 24-25) ed è chiamato (HPC1)¹⁴.

Lo sviluppo di una neoplasia prostatica è un processo multistadio. Un evento precoce è l'ipermetilazione del promotore del gene GSTP1 (π -class glutathione S-transferase)¹⁵ che determina la perdita di funzione di un gene in grado di detossificare sostanze cancerogene. Si ritiene che anche l'infiammazione possa svolgere un ruolo nella patologia neoplastica della prostata, in base all'evidenza che molte neoplasie prostatiche si sviluppano nelle adiacenze di una lesione denominata atrofia infiammatoria proliferativa (PIA).

Anatomia patologica e marker tumorali

La neoplasia origina tipicamente dai gruppi ghiandolari periferici e posteriori della prostata (70-75%) e meno frequentemente dalla zona di transizione (15%). In circa il 95% dei casi si tratta di adenocarcinoma che presenta un vasto spettro di varianti (acinare, endometrioide, mucinoso, a cellule ad anello con castone, adenosquamoso, a piccole cellule, sarcomatoide, carcinoide) e spesso è multifocale ed eterogeneo. Il restante 5% comprende altre forme quali il leiomiomasarcoma, linfomi (rarissimi quelli primitivi) e i tumori secondari che originano dalle vescichette seminali e dalla vescica¹⁶. La neoplasia prostatica intraepiteliale (PIN) è una lesione istologica con carattere proliferativo a carico dei dotti, duttuli ed acini prostatici. Viene classificata in due gradi: *low grade* (LG)-PIN e *high grade* (HG)-PIN. Quella ad alto grado è il precursore dell'adenocarcinoma moderatamente e scarsamente differenziato.

La HG-PIN non è identificabile né all'esplorazione rettale né con l'indagine ecografica e non si associa ad innalzamento del PSA. Le cellule della lesione sono caratterizzate da varie anomalie cito-architetturali: dimensioni variabili, nuclei alterati, contenuto cromatinico aumentato e nucleoli prominenti. Nelle lesioni LG-PIN, lo strato delle cellule basali è continuo o con rare interruzioni, mentre in quelle di alto grado è frequentemente discontinuo. Il quadro microscopico di gran lunga più frequente del carcinoma della prostata è l'adenocarcinoma acinare. La diagnosi si basa sulla valutazione di alcuni parametri: citologici (nucleari e citoplasmatici) e architetturali. Le cellule presentano nuclei ampi, provvisti di

nucleoli prominenti, multipli e marginati e citoplasma anfofilo. Inoltre il tumore è costituito da acini di dimensioni piccole o intermedie, con contorno e distribuzione stromale irregolare. Le cellule basali sono assenti. Le indagini immunoistochimiche utilizzate per definire l'immunoprofilo tumorale sono il prostatic-specific antigen (PSA), la "prostatic specific acid phosphatase" (PSAP), citocheratine ad alto peso molecolare (presenti nelle cellule basali, ma non nel tumore), la proteina p63 (non espressa nell'adenocarcinoma) e l' α -metil-CoA-racemasi. L'identificazione macroscopica del tumore non appare sempre agevole; è possibile identificare il tumore della zona periferica e centrale, quando questo deforma il profilo o il contorno della ghiandola¹⁶.

Il PSA è una serino-proteasi, membro della famiglia delle callicreine¹⁷. È presente soltanto nel citoplasma delle cellule epiteliali prostatiche e quindi è altamente organo-specifica, ma non tumore-specifica. Un valore ematico di PSA < 4 ng/ml viene convenzionalmente ritenuto normale. Valori tra 4 e 10 ng/ml vengono considerati appartenenti ad una zona grigia in cui la presenza della neoplasia è possibile, mentre per valori > 10 ng/ml il carcinoma prostatico è presente frequentemente, tranne che nei casi di prostatite acuta o subacuta, dove l'infiammazione induce una maggiore secrezione di PSA. La sensibilità del PSA come marcatore tumorale viene in parte migliorata valutando la sua variazione nel tempo, dove un incremento annuo maggiore di 0,75 ng/ml è indice di tumore prostatico. Per migliorare la specificità si può valutare inoltre il PSA *ratio*, ossia il rapporto espresso in percentuale tra il PSA libero e frazionato. Il PSA libero circolante (non legato all' α -anti-chimotripsina) è specificamente ridotto nei pazienti con neoplasia prostatica rispetto a quelli con altra patologia non maligna; dunque un rapporto inferiore al 10% esprime, con buona probabilità, la presenza di una neoplasia, mentre un rapporto superiore al 20% indicherebbe una patologia benigna. Si può inoltre utilizzare anche il PSAD (densità del PSA) che è il rapporto tra PSA e volume prostatico valutato ecograficamente. Valori superiori a 0,15 sono indicativi di neoplasia. L'impiego del PSA, introdotto nel 1994 per la diagnosi precoce di neoplasia maligna, è al momento controverso a causa della sua bassa specificità; viene invece utilizzato con successo nel follow-up per valutare eventuali recidive tumorali, sia locali che sistemiche.

Prognosi

I fattori prognostici più importanti sono rappresentati dal grado di differenziazione secondo Gleason e dallo stadio della neoplasia. Il sistema Gleason si basa sul riconoscimento di cinque pattern di crescita ghiandolare e di infiltrazione ognuno definito con un numero progressivo che va da 1, il più differenziato, a 5 il più displastico. Per ogni tumore, i due pattern di crescita più rappresentati vengono stabiliti con lo score appropriato, e la somma dei due numeri definisce il grado di differenziazione della neoplasia¹⁸. La stadiazione del carcinoma prostatico secondo TNM¹⁹ è quella universalmente accettata. Tuttavia l'accuratezza della stadiazione clinica del tumore prostatico è tuttora mediocre: il rischio di sotto-stadiazione è compreso tra il 50 e il 68%. Vengono quindi utilizzati dei nomogrammi che combinano diversi fattori prognostici, fra i quali il PSA sierico, la stadiazione patologica (pTNM), il volume tumorale, le varianti istologiche e la presenza del tumore sui margini chirurgici⁸.

Come anticipato, neoplasie con un grado di *Gleason* più alto sono più aggressive ed hanno, quindi, una prognosi peggiore. Una lettura moderna di tale stadiazione in chiave molecolare, sostenuta da diverse pubblicazioni scientifiche, suggerisce oggi che i diversi "pattern" secondo Gleason siano indicativi del processo di EMT (transizione epitelio-mesenchima) (**Figura 1**). E' ormai accettato dalla comunità scientifica come la EMT rappresenti molto spesso uno *step* necessario affinché molti tumori possano acquisire competenze di invasività e metastatizzazione non soltanto loco-regionale, ma anche a distanza²⁰. Come mostrato in Figura 1, mentre il *pattern 1* è rappresentativo di un tumore che è quasi identico alla ghiandola prostatica normale (fenotipo epiteliale esocrino), nei preparati istologici inquadrati come *pattern 5* non sono riconoscibili strutture ghiandolari, ed è spesso fortemente significativa la presenza di cellule tumorali a fenotipo mesenchimale²¹. Inoltre, sembra emergere da altri studi che il tipo di correlazione esistente fra la patologia oncologica prostatica e l'EMT, sia mantenuta anche nell'iperplasia prostatica benigna²².

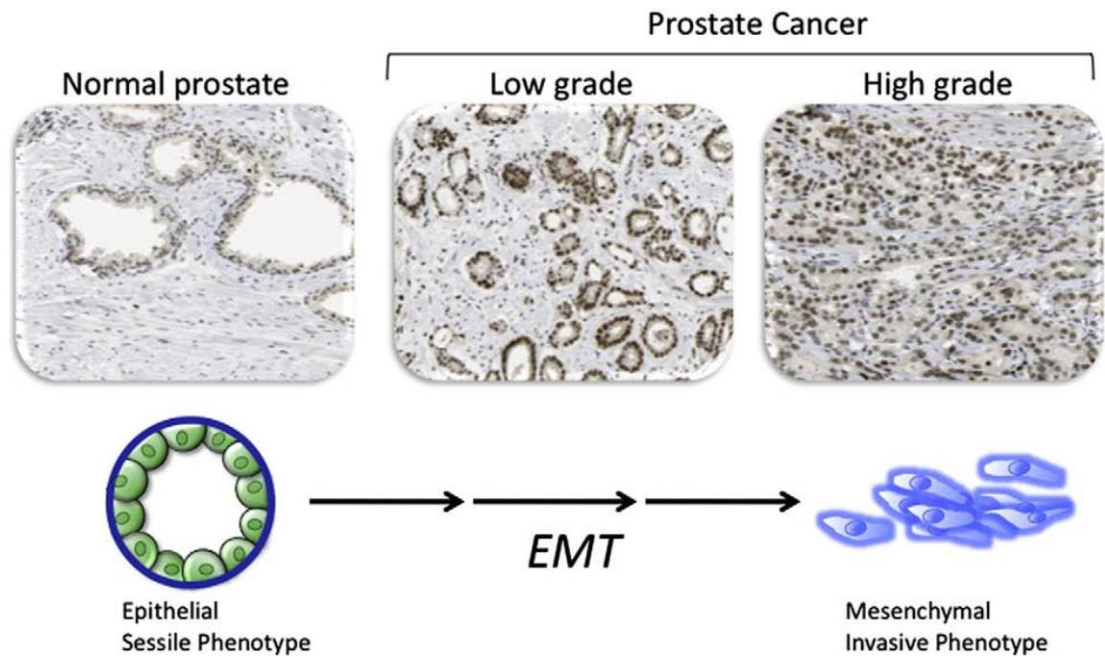


Figura 1 - Colorazione immunohistochimica che correla un Gleason score più alto ad una maggiore entità di EMT nell'ambito del tumore²¹.

Terapia

La prostatectomia radicale è il trattamento chirurgico ottimale nella terapia del carcinoma prostatico: consiste nell'asportazione in blocco di prostata e vescicole seminali e la successiva anastomosi vescico-uretrale. La linfadenectomia pelvica prevede l'asportazione dei linfonodi regionali con lo scopo di impostare una stadiazione patologica accurata della malattia. La chirurgia è indicata negli stadi cT1, cT2, cT3 del sistema TNM. Nello stadio cT3 spesso è associata a terapie adiuvanti (radioterapia e/o ormonoterapia). Nella malattia clinicamente localizzata è possibile procedere all'asportazione completa della prostata risparmiando i fasci vascolo-nervosi che presiedono all'erezione (tecnica *nerve-sparing*).

La valutazione anatomico-patologica del pezzo operatorio fornisce informazioni prognostiche importanti come la positività dei margini chirurgici. Alcune più frequenti complicazioni della procedura sono l'impotenza, l'incontinenza urinaria, ed emorragie. Il *follow-up* consiste nella misurazione del PSA sierico: se la radicalità chirurgica è stata raggiunta, esso deve scendere a livelli indosabili (< 0,2

ng/mL) entro i due mesi post-operatori. Se il PSA ritorna a essere dosabile anche molto tempo dopo l'asportazione radicale si considera una recidiva neoplastica^{4,23}. La radioterapia, utilizzata in passato nella malattia in stadio avanzato, costituisce oggi un trattamento equipollente alla chirurgia. La radioterapia può essere somministrata con differenti intenti terapeutici: radicale esclusiva, adiuvante (entro 6 mesi dalla chirurgia), di salvataggio (dopo 6 mesi dalla chirurgia) e palliativa sulle sedi metastatiche sintomatiche (ossee, linfonodali, midollari cerebrali). La radioterapia, con intento di escissione radicale della malattia, può essere preceduta da cicli di ormonoterapia. La radioterapia adiuvante viene eseguita in caso di carcinoma prostatico che presenta rischio di recidiva locale: punteggio di Gleason patologico >7, presenza di estensione extracapsulare, margini chirurgici positivi⁴.

L'ormonoterapia viene utilizzata nel trattamento di tumori in stadio avanzato (cT4) o metastatizzati. Il suo razionale consiste nel fatto che il tumore della prostata è una neoplasia ad elevata ormono-dipendenza. Fondamentalmente sopprime i livelli di androgeni circolanti. L'androgeno-privazione si può ottenere con un'orchietomia bilaterale, metodica semplice e di basso costo, ma dal forte impatto psicologico. In alternativa si possono somministrare analoghi del LH-RH che conducono ad una saturazione dei recettori ipofisari per il Gn-RH e quindi all'arresto dell'increzione del LH. Gli anti-androgeni periferici vengono suddivisi in steroidei (ciproterone acetato) e non steroidei (flutamide, nilutamide, bicalutamide). A seconda dello stadio della malattia è possibile optare per un blocco androgenico totale o intermittente. In quest'ultimo caso l'ormonoterapia viene sospesa dopo 6-9 mesi quando il PSA raggiunge valori normali o si azzerava. Gli studi finora condotti sull'ormonoterapia intermittente hanno dimostrato un rapido recupero della libido associato a un miglioramento soggettivo generale alla sospensione della terapia e un pronto efficace effetto di ormono-soppressione al momento della ripresa. Gli effetti collaterali della castrazione sono: impotenza (100%), vampate di calore, ritenzione idrica, aumento del peso corporeo, ginecomastia e mastodinia (per gli antiandrogeni steroidei)⁴.

La chemioterapia offre risultati deludenti e viene utilizzata con finalità solo palliative in quanto la chemiosensibilità del tumore prostatico è bassa. Spesso viene praticata quando il tumore diviene androgeno-indipendente e non risponde all'ormonoterapia. Tra i farmaci attivi vi sono l'estamustina, le antracicline, il

cisplattino, l'etoposide, la vincristina e i taxani⁴.

Le terapie di supporto vengono utilizzate principalmente in fase metastatica. Tra queste si ricordano i bifosfonati, l'acido zoledronico per la prevenzione delle fratture ossee, FANS ed oppioidi per il dolore.

Carcinoma prostatico e invecchiamento: fattori molecolari coinvolti

Il tumore della prostata è una neoplasia età-correlata, la cui incidenza aumenta con l'aumentare dell'età. Infatti, il rischio di diagnosticare un tumore prostatico cresce a partire da 0,01% negli uomini con età inferiore a 40 anni a 14% negli uomini con età superiore a 70 anni^{24,25}. Tuttavia le basi molecolari che determinano questa stretta correlazione tra invecchiamento e cancro prostatico non sono ben conosciute. Alcuni studi riportano che l'incremento dello stress ossidativo in età avanzata²⁶ sia responsabile anche dello sviluppo del carcinoma prostatico²⁴. Dati epidemiologici recenti mostrano come l'assunzione di agenti antiossidanti come la vitamina D, la soia, il licopene possano avere un ruolo protettivo nello sviluppo del cancro¹¹⁻¹³.

La via di segnale mediata dalla proteina p53 ha un impatto molto importante sulla longevità e sulle malattie legate all'età. L'efficacia della risposta di p53 allo stress diminuisce significativamente con l'età e, dato il suo ruolo cruciale nella prevenzione dei tumori, il declino della sua attività ad età avanzate potrebbe contribuire all'aumento dell'insorgenza dei tumori nell'anziano²⁷. La p53 induce l'apoptosi, media le risposte di riparazione e difesa all'interno delle cellule ed è inoltre capace di incrementare l'espressione di numerosi geni i cui prodotti riducono i livelli dei radicali liberi. La p53 è stata inoltre identificata come uno dei numerosi substrati delle sirtuine, una famiglia di proteine altamente conservate (SIRT1 nei mammiferi) che regolano il silenziamento genico, la riparazione del DNA, la stabilità cromosomica^{24,28}. SIRT1 inattiva, tramite deacetilazione, la p53 suggerendo che le sirtuine aumentano il rischio di insorgenza di cancro. Un'elevata espressione di SIRT1 è infatti un evento comune nel CP²⁹.

È noto che anche gli androgeni hanno un ruolo nel CP³⁰. Il CP si sviluppa da un epitelio androgeno-dipendente ed è di solito sensibile agli androgeni nei primi stadi della malattia. Nelle fasi avanzate le cellule tumorali stesse diventano in grado di attivare i recettori androgenici³¹ che da regolatori della proliferazione e differenziazione dell'epitelio prostatico, divengono induttori di una crescita incontrollata.

A tutt'oggi è dibattuta l'esistenza di un'associazione tra abbassamento dei livelli plasmatici di testosterone, come avviene nell'invecchiamento, e insorgenza del tumore della prostata. Alcuni studi hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di testosterone durante l'invecchiamento è concomitante con un incremento della crescita tumorale ed è associato ad un tumore più aggressivo³². Molti trial clinici sono stati fatti negli ultimi decenni sulla terapia con testosterone in pazienti con ipogonadismo primario e secondario; tuttavia i dati sull'efficacia del trattamento e sull'insorgenza dei tumori della prostata sono ancora controversi³³. Infine una riduzione del livello degli androgeni associata all'invecchiamento, potrebbe portare ad un aumento dei livelli di Transforming Growth Factor- β (TGF- β) e favorire lo sviluppo del CP³⁴. È stato dimostrato che la vitamina D, un potente antiossidante, è di fondamentale importanza per la regolazione della proliferazione delle cellule prostatiche, ed il suo segnale è frequentemente attenuato negli ultimi stadi della progressione neoplastica³⁵. Poiché i livelli di vitamina D sono frequentemente ridotti durante l'invecchiamento, è stata ipotizzata l'esistenza di un meccanismo di disregolazione del livello dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che potrebbe favorire sia la comparsa di mutazioni genomiche che l'insorgenza del CP.

Lo stress ossidativo agirebbe inoltre aumentando l'espressione di diversi fattori di crescita, come il VEGF (vascular endothelial growth factor), un potente fattore pro-angiogenetico, in grado di promuovere la progressione tumorale e l'eventuale metastatizzazione³⁶.

Anche il microambiente stromale della prostata sembra rivestire un ruolo importante nello sviluppo del CP. Infatti, tutti i compartimenti cellulari della ghiandola, dall'epitelio ai fibroblasti, alle strutture vascolari, alle cellule muscolari, interagiscono fra di loro in maniera paracrina attraverso la secrezione di fattori di crescita. Recenti evidenze hanno dimostrato che cambiamenti nella composizione del microambiente tumorale possono contribuire allo sviluppo e

alla progressione di tumori epiteliali altamente invasivi. Un esempio di questo processo è stato descritto nello studio di Bhowmick *et al.*³⁷ nel quale si dimostra come un'alterazione nella via di segnale del TGF- β nei fibroblasti stromali, favorisca il processo di trasformazione neoplastica nell'epitelio prostatico adiacente. Olumi *et al.*³⁸ hanno inoltre dimostrato che, mentre i fibroblasti isolati da carcinoma prostatico stimolano la progressione tumorale di cellule epiteliali non tumorigeniche, sia *in vivo* che *in vitro*, fibroblasti normali coltivati insieme a cellule epiteliali prostatiche sane non hanno alcun effetto sullo sviluppo di carcinomi.

Gli stessi danni cellulari che si accumulano durante l'invecchiamento delle cellule stromali e che portano le cellule ad acquisire un fenotipo senescente, sembrano favorire la produzione di proteine (IL-6, IL-8, CXCL12, proteine di matrice come il collagene di tipo IV, laminine, integrine) capaci di stimolare la carcinogenesi nell'epitelio prostatico adiacente^{39,40}, collegando ancora una volta l'invecchiamento dell'organo con l'insorgenza del tumore prostatico.

DIFFERENZIAMENTO NEUROENDOCRINO

Le cellule neuroendocrine – origine e funzione

La prostata, in quanto ghiandola accessoria dell'apparato riproduttivo maschile, non dipende esclusivamente dagli androgeni per il normale funzionamento delle proprie attività. Al contrario, è vasto il panorama di fattori in generale, in particolare ormoni sia autocrini che paracrini, che sembrano necessari al mantenimento delle funzioni prostatiche. Nel corso degli anni numerose sono state le prove a sostegno dell'idea che le cellule meno rappresentate del compartimento epiteliale, le cellule neuroendocrine (NE), avessero un ruolo di prim'ordine in tal senso⁴¹.

Le cellule NE rappresentano uno dei tre citotipi epiteliali dell'organo, assieme alle cellule esocrine e quelle basali⁴¹. Esse rappresentano solo una frazione minoritaria

e risultano essere disperse nell'epitelio dei dotti e degli acini della prostata. Esercitano funzioni regolatorie nell'ambito della crescita, differenziazione ed attività secretoria della ghiandola, mediante l'attività di prodotti che agiscono per via autocrina, paracrina ed endocrina⁴². Rivestono, pertanto, un ruolo importante sia nelle condizioni fisiologiche che fisiopatologiche della prostata.

Dall'attuale stato dell'arte risulta ancora controversa l'esatta origine embrionale delle cellule neuroendocrine prostatiche. Non è chiaro se, durante l'embriogenesi, esse originino dalla cresta neurale oppure da un precursore comune anche alle cellule epiteliali prostatiche. La prima ipotesi è supportata da diversi lavori, in particolare quello di Abrahamsson *et al.*⁴³ a favore dell'origine neuroectodermica delle cellule prostatiche NE. La seconda ipotesi ha invece portato alla formulazione di una teoria generale sulla staminalità che ammette un'origine delle cellule NE comune con i citotipi epiteliali esocrino e basale, a partire da un comune progenitore: una cellula staminale stanziale “tripotente” dello strato basale. Tale concezione è basata sulla presenza di cellule epiteliali con morfologia e immunofenotipo epiteliale misto (positività per PSA, citocheratine delle cellule basali e per la cromogranina-A)^{44,45}. Tuttavia Cohen *et al.*⁴⁶ avanzano la possibilità di due popolazioni funzionalmente distinte di cellule NE, distribuite diversamente nella ghiandola prostatica (cellule NE “periferiche” a fronte di quelle periuretrali), ognuna con una origine embrionale differente.

Da un punto di vista morfologico sono stati descritti due tipi di cellule NE: quella cosiddette “aperte” a forma di fiasca, dotate di lunghi e sottili processi dendritici apicali che si estendono fino al lume della ghiandola ed il tipo “chiuso”, che possiede estensioni non così accentuate e rimane confinato nella porzione basale dell'epitelio, in comunicazione con l'endotelio e le strutture nervose⁴⁷ (**Figura 2**).

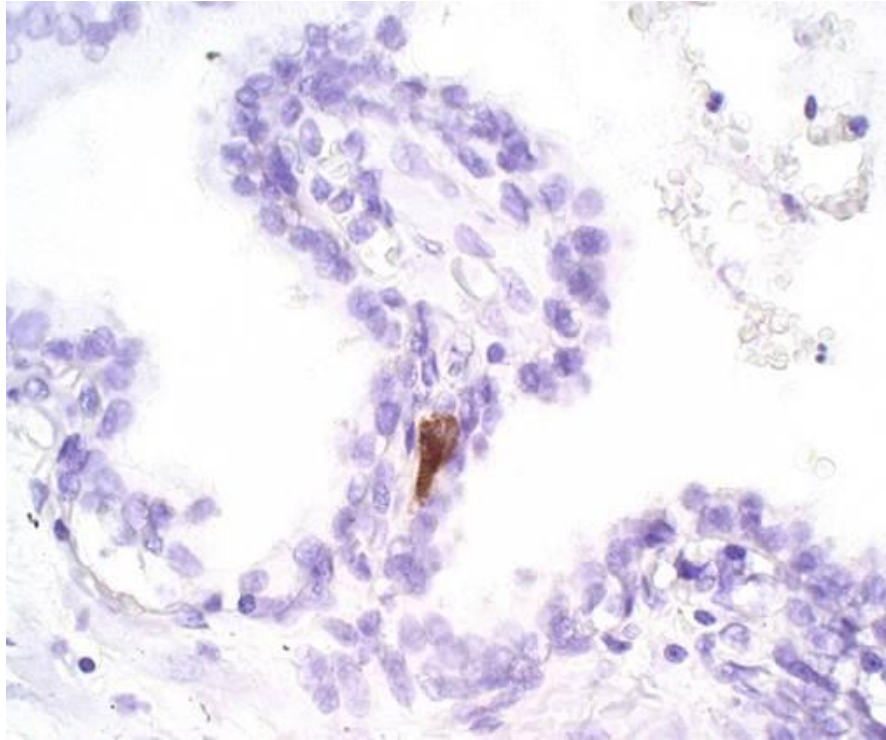


Figura 2 - Una tipica cellula neuroendocrina nel compartimento epiteliale della prostata. In evidenza il corpo allungato e la relativa forma a “fiasco”⁴⁸.

Entrambi i tipi cellulari, comunque, posseggono delle estensioni citoplasmatiche più o meno irregolari che mettono in stretta comunicazione le cellule NE con gli altri tipi cellulari stanziali e risultano essere disperse e poco rappresentate⁴⁹. Nonostante le due principali classificazioni morfologiche, il ruolo e le specifiche differenze funzionali sono tutt'ora ignote. Le cellule NE producono una vasta gamma di marker neuroendocrini che permettono di identificarle in maniera univoca (per uso diagnostico o di studio) all'interno di una popolazione cellulare eterogenea^{42,49}. Presentano, inoltre, numerosi granuli citoplasmatici contenenti ormoni come serotonina, meno frequentemente somatostatina, calcitonina e colecistochinina (CCK), nonché proteine strutturali dei granuli come la cromogranina A (CGA) ed enzimi come l'enzima neuronale specifico (NSE)^{1,50} che possono essere ritrovati anche nel torrente sanguigno e nel liquido seminale. La CGA e la NSE sono attualmente riconosciute come eccellenti marker di differenziazione cellulare neuroendocrina¹. Le cellule NE, in genere, risultano essere quiescenti, non proliferative in quanto negative ai comuni marcatori

mitotici umani come Ki-67⁵¹ e sono pertanto cellule differenziate terminalmente. Caratteristica fondamentale che genera anche profonde ripercussioni nell'ambito della patologia oncologica prostatica, è che sono negative per il recettore androgenico e quindi indolenti a qualsivoglia modulazione ormonale androgeno-mediata^{52,53}.

Le cellule neuroendocrine e il carcinoma prostatico

Le cellule NE sono presenti anche nel CP. Alcuni tumori sono composti interamente da questo tipo di cellule come il carcinoide e il tumore a piccole cellule. Più frequentemente, invece, se ne riscontrano solo piccoli foci all'interno della massa tumorale^{54,55}. Virtualmente ogni carcinoma prostatico può contenere foci di cellule NE. Tuttavia la differenziazione neuroendocrina, a seconda degli studi, viene identificata in percentuali variabili e relativamente minoritarie (frequenza compresa fra 10%-100%) nelle biopsie effettuate per sospetto di carcinoma, pertanto non fornisce di per sé uno strumento prognostico utile^{49,56,57}. Tuttavia, una differenziazione NE considerevolmente estesa e multifocale rilevata alla diagnosi è indicatrice di neoplasie più aggressive e maggiormente resistenti alla terapia ormonale, quindi indicatrice di una prognosi peggiore. Uno studio recente ha riportato come il livello di NED (neurodifferenziazione) sia un valido strumento prognostico e predittivo di malattia metastatica, sia da solo che in combinazione con la stadiazione secondo Gleason⁵⁸. Inoltre diversi studi mostrano che l'entità della NED è maggiore nei casi di carcinoma piuttosto che nell'adenoma prostatico (**Figura 3 A, B**)^{44,48,59}.

Così come nella fisiologia della prostata, anche per il CP l'origine delle cellule NE è stata, sino ad ora, compresa soltanto parzialmente. Alcuni autori ritengono che nel CP, esse abbiano origine da processi di differenziazione di cellule staminali intermedie che nel tumore sono regolati in maniera aberrante^{44,53}. Un'altro modello ha suggerito un incremento di tali cellule derivato da un processo di trans-differenziazione delle cellule carcinomatose verso il fenotipo neuroendocrino. Numerosi sono gli studi che hanno confermato questo modello^{51,60,61}.

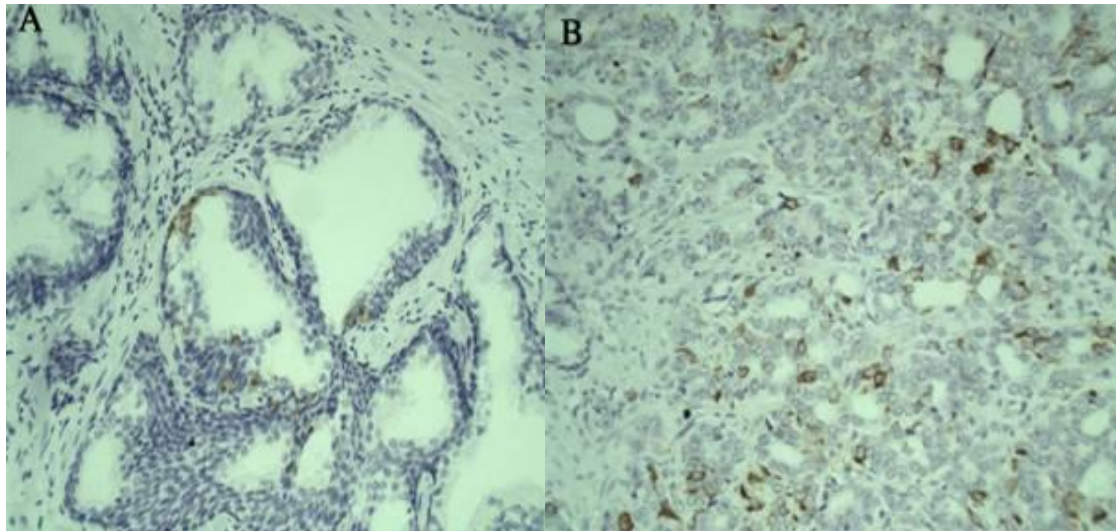


Figura 3 – Differenze nell’entità di NED tra campioni tissutali relativi a (A) iperplasia benigna e (B) adenocarcinoma primario “Gleason 4”⁴⁸.

E’ stato ampiamente dimostrato come la linea cellulare androgeno-dipendente LNCaP sia in grado di effettuare differenziazione neuroendocrina in risposta a svariati stimoli quali la deprivazione di androgeni⁶², la stimolazione con IL-6⁶³, IL-1 β ⁶⁴, la stimolazione β -adrenergica⁵¹, HB-EGF (*heparin-binding-Epidermal Growth Factor*)⁶⁵, l’ipossia^{66,67} ed altri.

Evidenze molto recenti ottenute in modelli sperimentali, suggeriscono che anche la radioterapia potrebbe indurre NED^{68,69}. In particolare, nelle cellule LNCaP, esposizioni a radiazioni ionizzanti inducono una mortalità del 80%, selezionando un 20% di cellule che vanno incontro a NED, diventando resistente alla terapia radiante.

A livello molecolare la NED è sostenuta dall’attivazione e traslocazione nel nucleo del fattore trascrizionale CREB (cAMP response element-binding *protein*)^{68,69}. Anche gli agenti che utilizzano il cAMP come secondo messaggero, come epinefrina, isoprotenerolo e forskolina sono in grado di indurre un fenotipo neuroendocrino nelle cellule LNCaP⁵¹. Il cAMP attiva a sua volta il CREB, che può essere fosforilato ed attivato indipendentemente da più di 15 chinasi, fra cui MAPK, AKT e PKA⁷⁰. Anche vie di segnalazione intracellulare coinvolgenti STAT-3 e PI3K sono in grado di indurre NED, in particolare la via di segnale PI3K-AKT che converge su mTOR,⁷¹. Infatti, il trattamento delle

cellule LNCaP con rapamicina, un inibitore di mTOR, attenua in modo considerevole l'espressione di NSE in condizioni di privazione androgenica⁷¹.

Le vie segnalatorie capaci di innescare la NED sono, pertanto, multiple ed intricate, sebbene spesso risultino parzialmente sovrapposte a partire dai vari stimoli che le attivano dalla membrana e dal microambiente extracellulare.

Le cellule NE sono in grado di secernere fattori di crescita e ormoni capaci di sostenere, in maniera paracrina, la crescita del tumore circostante. Fra queste, la bombesina ha una funzione mitogena sulle cellule di CP che esplica tramite l'attivazione del fattore di trascrizione Elk-1⁷². Inoltre questo ormone incrementa l'espressione di alcune metalloproteasi (come la MMP-9) che stimolano il rimodellamento della matrice extracellulare e quindi l'invasione tumorale, l'angiogenesi e la formazione di metastasi⁷³. Una di queste è la calcitonina essere che è capace di aumentare il potenziale invasivo di diverse linee cellulari di CP⁷⁴, presumibilmente giocando, anche *in vivo*, un ruolo nella crescita delle metastasi ossee⁷⁵. Le cellule NE, oltre che stimolare la proliferazione delle altre cellule del tumore sono capaci di produrre fattori angiogenici come IL-8, VEGF e VIP. A tale riguardo, alcuni studi hanno identificato una correlazione tra NED e neovascolarizzazione tumorale. Qui il numero delle cellule NE è risultato essere un fattore predittivo della crescita di nuovi vasi⁷⁶.

Al contrario, è stato osservato che in determinate condizioni microambientali, le cellule NE sono alternativamente in grado di rilasciare fattori con attività inibitoria non solo sulla cinetica del ciclo cellulare delle cellule carcinomatose ma anche sull'invasività⁶⁰. L'IL-6 infatti induce NED, tuttavia, gli effetti paracrini generati dai fattori rilasciati sulle cellule neoplastiche non-NE risultano essere inibitori⁶⁰. Da ricordare però che, paradossalmente, elevati livelli di IL-6 sono associati sia alla morbilità che al numero di metastasi in pazienti con carcinoma prostatico⁷⁷. Tale varietà nel tipo e nella funzione esercitata dai neuropeptidi prodotti dalle cellule NE, suggerisce che possano esistere all'interno del tumore diverse popolazioni di cellule neuroendocrine.

Una maggiore attività proliferativa delle cellule di CP in stretta prossimità con cellule NE (tumorali) è stata comunque dimostrata⁷⁸. Grobholz *et al.* hanno esaminato tale questione analizzando l'entità di espressione del marker di

proliferazione Ki-67 su preparati istologici. È stato visto che carcinomi con una maggiore componente neuroendocrina mostravano una maggiore presenza di Ki-67 sia rispetto ai tumori privi di isole NE, sia rispetto a quelli con una componente NE inferiore⁷⁹.

Come già anticipato, nel contesto di un carcinoma prostatico le cellule NE tumorali non sono proliferanti, in quanto negative a Ki-67. Al contrario, i tumori neuroendocrini puri come quelli a piccole cellule hanno un'alta cinetica di cicli cellulari⁸⁰.

Alcuni autori suggeriscono che il fenotipo delle cellule NE differenziate da cellule del carcinoma possa essere reversibile. *In vitro*, al cessare di determinati stimoli, come ad esempio agenti che inducono incrementi di cAMP o radiazioni ionizzanti, esse potrebbero de-differenziare tornando ad uno stato proliferativo capace di ricostituire il tumore^{51,69}. Basse ma costanti concentrazioni di IL-6 a lungo termine, per esempio, possono indurre in un primo tempo NED, ma poi creare successivamente condizioni per le quali le cellule modificano il proprio fenotipo, dando origine ad un tumore ancora più aggressivo⁸¹.

Durante la progressione della malattia tumorale, la differenziazione neuroendocrina sembra essere in grado di peggiorare la prognosi del paziente. Spesso infatti il tumore con differenziazione neuroendocrina non risponde più alla chemioterapia e alla terapia ormonale. Sono quindi in studio, per questi pazienti, altri tipi di trattamento farmacologico, ad esempio con analoghi della somatostatina. La somatostatina è una proteina prodotta sia dalle cellule NE, che dalle cellule infiammatorie e del sistema immunitario ed è l'unico composto che può agire bloccando direttamente l'attività NE. L'attivazione del recettore della somatostatina (SSTR), bloccando il rilascio di vari ormoni secreti dalle cellule NE induce l'apoptosi (attraverso l'espressione di p21 e p53), inibisce l'angiogenesi e promuove vasocostrizione. Inoltre può avere effetti anti proliferativi anche direttamente sulle cellule tumorali^{82,83}. Gli antagonisti della somatostatina somministrati assieme ad estrogeni, hanno dimostrato un miglioramento clinico in pazienti con CP refrattario alla terapia ormonale⁸⁴. Le cellule NE producono e secernono anche serotonina, un neurotrasmettitore che è anche un potente mitogeno per le cellule tumorali. È stato dimostrato che i recettori della serotonina (in particolare 5-HTR1 e 5-HTR4) sono altamente espressi nel CP refrattario alla

terapia ormonale⁸⁵. Studi *in vitro* hanno evidenziato che la somministrazione di antagonisti della serotonina induce una riduzione della crescita tumorale⁸⁶. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per dimostrare la reale efficacia di questi composti.

Il ruolo degli androgeni

Fisiologicamente, lo sviluppo della prostata avviene a partire dalla decima settimana di vita embrionale. In questo periodo gemme epiteliali derivanti dall'endoderma della porzione pelvica del seno urogenitale proliferano per effetto degli androgeni prodotti dal testicolo e si invaginano nel mesenchima che circonda il primo tratto dell'uretra. Da tali gemme origina l'epitelio ghiandolare, mentre dal mesenchima circostante deriva lo stroma fibro-muscolare dell'organo.

Gli androgeni sono senza dubbio gli ormoni più importanti nel controllo della funzione della prostata. L'androgeno principale è il testosterone, prodotto per la maggior parte dalle cellule di Leydig del testicolo; la regolazione della sua produzione avviene mediante l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi ed implica l'intervento dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), secreto dall'ipotalamo, e delle gonadotropine ipofisarie (LH e FSH). Il testosterone è presente in circolo in gran parte legato a proteine, tra cui specialmente la globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG) e l'albumina; solo una piccola quota è in forma libera, la forma biologicamente attiva. La maggior parte degli effetti esercitati da quest'ormone sull'apparato genitale maschile sono mediati dal diidrotestosterone (DHT), metabolita del testosterone provvisto di un'affinità per i recettori androgenici nettamente maggiore rispetto al testosterone stesso. La trasformazione del testosterone in DHT avviene ad opera di un enzima, la 5 alfa-reduttasi, presente soprattutto nelle cellule epiteliali delle ghiandole prostatiche. Il DHT si lega ad un recettore citoplasmatico e migra quindi nel nucleo delle cellule prostatiche, dove innesca una serie di eventi biochimici che regolano la proliferazione, l'apoptosi, la differenziazione e la senescenza cellulare⁸⁷. Nella prostata gli androgeni agiscono prevalentemente sulle cellule dello stroma inducendole a secernere andromedine (fattori di crescita e di sopravvivenza

cellulare) che a loro volta agiscono sulle cellule epiteliali secretorie del lume ghiandolare⁸⁸. In queste cellule, il recettore androgenico ha un ruolo di soppressore della crescita cellulare attraverso l'espressione di p27^{Kip1}⁸⁹, tuttavia è stato recentemente dimostrato che può promuovere la tumorigenesi nelle cellule stromali prostatiche⁹⁰.

Il CP si sviluppa da un epitelio androgeno-dipendente ed è sensibile agli androgeni nei primi stadi della malattia: infatti la privazione di androgeni è la prima linea di trattamento in questo tipo di tumori. Nelle fasi avanzate sono le stesse cellule tumorali ad attivare i recettori androgenici, anche in assenza dello stesso ormone³¹, pertanto, da regolatori della proliferazione e differenziazione divengono induttori di crescita incontrollata. Berger *et al.*⁹¹ hanno dimostrato che anche nelle fasi più precoci del CP, gli androgeni possono indurre la differenziazione delle cellule tumorali, mentre evidenze cliniche suggeriscono che nelle fasi avanzate della malattia tale meccanismo risulta essere drammaticamente compromesso⁹².

Il CP nella sua progressione passa da uno stato androgeno-dipendente ad uno stato androgeno-indipendente e, verosimilmente, diviene refrattario alla terapia ormonale per alterazioni quali-quantitative del recettore androgenico. Come ricordato precedentemente, esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che la privazione androgenica può indurre efficacemente una differenziazione neuroendocrina in cellule androgeno-dipendenti⁶¹ e che l'espressione del recettore androgenico, al contrario reprime tale acquisizione fenotipica⁹³. Le cellule NE, infatti, non esprimono recettori androgenici; esse sono capaci di secernere una grande varietà di neuropeptidi e citochine che stimolano la proliferazione e l'invasività delle cellule tumorali circostanti. Essendo indolenti a qualsivoglia modulazione di tipo ormonale, non sono target della terapia ed al contempo contribuiscono alla androgeno-indipendenza degli altri "cloni" tumorali epiteliali ed alla progressione del carcinoma prostatico.

L'ipossia e il carcinoma prostatico

Nell'evoluzione del tumore prostatico spesso accade che le cellule neoplastiche si trovino a crescere in un microambiente ipossico. Questa condizione si sviluppa nelle aree in cui la crescita delle cellule neoplastiche supera il potenziale angiogenico della massa tumorale. L'ambiente ipossico è inoltre caratterizzato da un pH acido e da una carenza di nutrienti^{94,95}. In queste condizioni una parte delle cellule tumorali va incontro a morte. Tuttavia alcuni studi hanno mostrato che l'ipossia è in grado di modificare l'attività metabolica e l'espressione genica delle cellule tumorali, in maniera tale da permettere alle stesse di sopravvivere e di incrementare il loro potenziale aggressivo. L'ipossia, infatti, impone una pressione selettiva che permette l'espansione di quei cloni cellulari resistenti all'apoptosi^{96,97}. Il fattore trascrizionale chiave della risposta ipossica è HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α). In condizioni di normossia HIF-1 α viene idrossilato e successivamente degradato. In condizioni d'ipossia, l'idrossilazione non ha luogo. Esso si accumula e si sposta nel nucleo dove, congiungendosi con HIF-1 β , si lega ad alcune regioni del DNA (HRE, Hypoxia-Response Elements) promuovendo l'espressione di geni che inducono l'angiogenesi, l'eritropoiesi, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare⁹⁴. Numerosi studi hanno confermato che l'attivazione di HIF-1 α determina un aumento di espressione del VEGF ed altri fattori pro-angiogenici capaci di incrementare l'aggressività e la sopravvivenza del tumore^{98,99}, sostenendone la vascolarizzazione¹⁰⁰. I gruppi di geni implicati nella cancerogenesi e nella progressione tumorale regolati da HIF-1 α sono stati divisi in 5 gruppi e codificano per fattori angiogenetici, trasportatori del glucosio, enzimi glicolitici, fattori di sopravvivenza e fattori pro-invasivi⁹⁸. È stato inoltre documentato che linee cellulari umane di CP, transfettate con il gene HIF-1 α , mostrano una trasformazione da un fenotipo "epiteliale" ad un fenotipo "mesenchimale" che le rende molto più aggressive e invasive¹⁰¹.

Anche se con una certa variabilità da cellula a cellula, è stato stimato che circa un 2% dei geni umani può essere controllato dalla funzione nucleare di HIF-1 α ⁹⁵. Visto il ruolo centrale di HIF-1 α nei processi di adattamento delle cellule tumorali all'ipossia, non sorprende che una sua sovra-espressione nei tumori solidi sia correlata ad una mancata risposta terapeutica e ad una incrementata mortalità⁹⁸.

La prostata sembra essere, anche fisiologicamente, un organo relativamente ipossico. Misurazioni con elettrodi che quantificano la pressione parziale di ossigeno rivelano tensioni di O₂ nettamente inferiori a molti altri distretti dell'organismo. La pressione parziale dell'O₂ prostatico rispetto al muscolo scheletrico, sembra essere addirittura inferiore di circa 10-13 volte¹⁰². In comune con altre neoplasie solide, aree ipossiche sono identificabili anche nel CP¹⁰³. È stato anche suggerito che lo sviluppo di un tumore da un distretto di per sé già ipossico faciliti l'attuazione di una risposta mirata a rendere il tumore competente nell'adattarsi alle condizioni più svariate⁹⁵.

Esperimenti *in vitro* su cellule LNCaP, hanno dimostrato che l'ipossia acuta stabilizza HIF-1 α , induce espressione e secrezione di VEGF, mentre riduce l'espressione sia del recettore androgenico che del PSA, suggerendo un fenotipo meno differenziato che si associa ad un comportamento più aggressivo⁹⁴. Anche c-myc e ciclina-D1 sono ridotte nelle cellule sottoposte a bassa tensione di ossigeno; poiché questi due prodotti genici sono implicati nella proliferazione cellulare, la loro rapida diminuzione indica che l'ipossia ha anche la capacità di inibire la crescita tumorale. Tuttavia, gli stessi autori mettono in evidenza che alcuni oncosoppressori, quali p53 e p27, sono ridotti nelle cellule LNCaP in condizioni di ipossia, suggerendo un meccanismo di compenso per sopperire alla perdita di c-myc e ciclina-D1 e garantire la progressione del tumore⁹⁴. Al contrario, è stato recentemente dimostrato che un gene soppressore tumorale della matrice extracellulare, chiamato maspina, è sovra-regolato in cellule di CP in condizioni ipossiche¹⁰⁴. Ciò dimostra che l'attuazione della "risposta ipossica" non è necessariamente pro-tumorigenica.

Ghafar *et al.*⁹⁴ dimostrano però che l'ipossia incrementa anche la fosforilazione di Akt/PKB nelle cellule LNCaP, aumentando così la loro capacità proliferativa, la crescita e la resistenza all'apoptosi, e rendendo ragione della resistenza del CP ai comuni regimi terapeutici.

Come riportato da Stewart *et al.*, gli studi sulla relazione tra ipossia e attivazione/inattivazione dei recettori androgenici sono numerosi⁹⁵. Esperimenti *in vivo*¹⁰⁵ hanno evidenziato che la castrazione nel ratto conduce alla degenerazione del sistema vascolare prostatico, riduce l'ossigenazione delle cellule e attiva la risposta ipossica. La privazione androgenica causa la morte delle cellule endoteliali, la degenerazione dei capillari e la vasocostrizione. Secondo Park *et*

*al.*¹⁰⁶, cellule LNCaP esposte in maniera transitoria ad una tensione di ossigeno inferiore allo 0,05% mostrano un incremento di attività del recettore androgenico. Mabeesh *et al.*¹⁰⁷ riportano che il DHT, attivando il suo recettore, incrementa l'espressione di HIF-1 α nelle LNCaP, ma non nelle PC-3 (linea cellulare androgeno-indipendente). Al contrario, gli antiandrogeni (bicalutamide e flutamide) bloccano anche l'espressione di HIF-1 α ¹⁰⁸.

Ciò suggerisce che parte dell'attività clinica di tali composti coinvolga una riduzione della via di HIF-1 α , riducendo il potenziale angiogenico di cloni androgeno-sensibili. Anche l'ipossia di per sé può mediare l'attivazione del recettore androgenico nelle cellule LNCaP¹⁰⁶, sebbene sia stato dimostrato che in condizioni di ipossia cronica, queste stesse cellule sviluppano una androgeno-indipendenza ed un fenotipo più aggressivo⁹⁷.

L'ipossia tumorale è stata identificata da più di 50 anni come causa di radioresistenza. Quando le radiazioni ionizzanti interagiscono con il materiale biologico, vengono prodotti radicali liberi soprattutto attraverso la ionizzazione dell'acqua; questi prodotti rompono i legami chimici e danneggiano la struttura del DNA e delle proteine. In assenza di ossigeno i radicali liberi reagiscono con H⁺ e ricostituiscono la loro forma originaria⁹⁵¹⁰⁹. Per questo motivo sono in fase di studio protocolli che combinano la radioterapia con farmaci che riducono l'ipossia (ARCON, ossigeno iperbarico e nimorazolo)⁹⁵.

I RECETTORI NOTCH

Struttura e via di segnale

La famiglia dei recettori Notch comprende una serie di proteine transmembrana a singolo passaggio, di tipo I, implicate in un'ampia varietà di processi tra cui la differenziazione, la morfogenesi, la proliferazione e la morte cellulare. Il primo recettore Notch fu scoperto nella *Drosophila melanogaster*, come responsabile dell'acquisizione di un particolare fenotipo: la mancata azione del recettore

determinava infatti la formazione di indentature (notches, da cui il nome della famiglia) nel margine dorso - ventrale delle ali dell'insetto¹¹⁰.

Nei mammiferi sono presenti quattro recettori Notch (Notch 1-4) e cinque ligandi che appartengono al gruppo Jagged (J1 e J2) e Delta-like (DII-1, 3 e 4)^{111,112} (Figura 4).

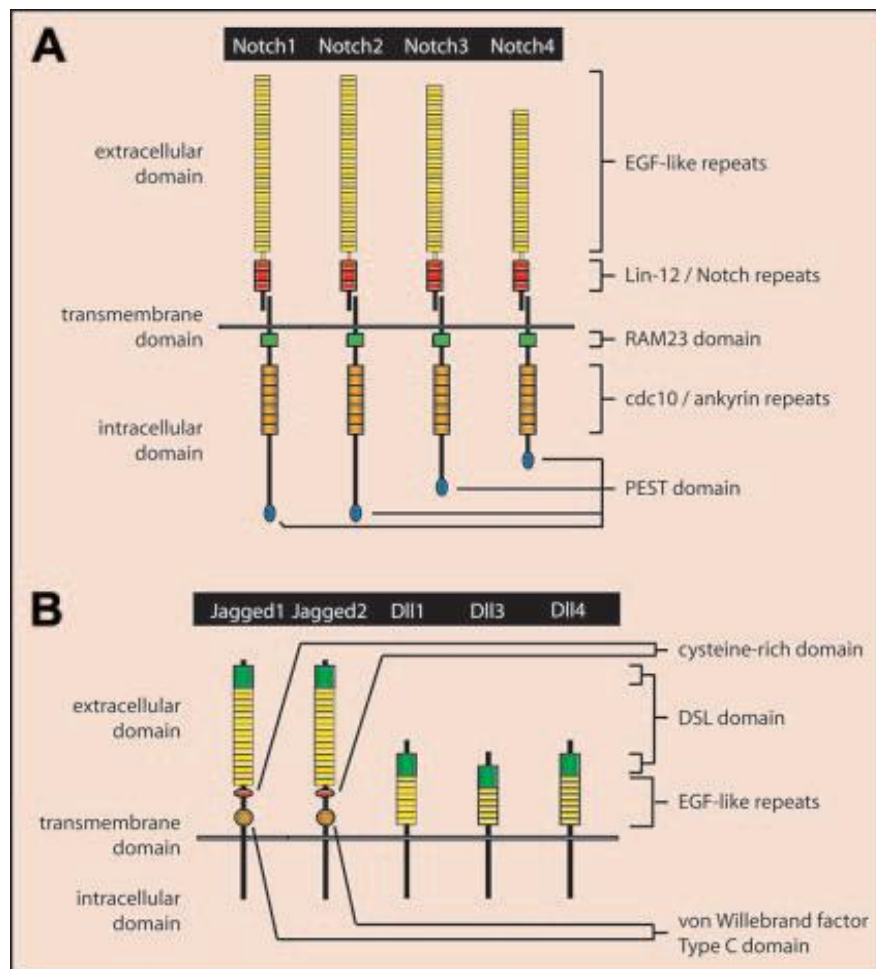


Figura 4 - Rappresentazione schematica della struttura dei recettori Notch e dei rispettivi ligandi¹¹³.

I ligandi, così come i recettori, sono proteine transmembrana, dunque l'interazione recettore-ligando avviene per contatto diretto tra due cellule vicine, sebbene autori abbiano dimostrato come in alcuni organismi, ligandi solubili possano mediare l'attivazione del recettore¹¹⁴. Nei mammiferi ciò risulta controverso. In questi ultimi è consenso comune che tali ligandi solubili agiscano

da dominante negativo piuttosto che da attivatori del segnale^{115,116}. L'interazione cellula-cellula porta ad un'attivazione del segnale sia nella cellula che esprime il recettore, sia in quella che esprime il ligando (*trans*-interazione). Tuttavia, a volte, la co-espressione dei ligandi e del recettore sulla stessa cellula può portare al blocco dell'attivazione del segnale, al fine di evitare un'attivazione di tipo autocrino. Tale fenomeno viene definito *cis*-interazione¹¹⁷. I recettori Notch sono proteine eterodimeriche, sintetizzate a partire da un precursore a singola catena che successivamente viene tagliato in due subunità da un enzima chiamato furina nell'apparato del Golgi. Successivamente le due parti vengono assemblate e trasportate a livello della membrana plasmatica. Esse sono caratterizzate da tre domini amminoacidici: la porzione extra-cellulare (ECD), il dominio transmembrana (TM) e quello intracellulare (ICD).

La porzione extracellulare include un numero variabile di ripetizioni *Epidermal Growth Factor* (EGF)-simili (da 29 a 36), fondamentali per l'interazione con il ligando e tre porzioni definite LN (Notch/Lin12) che servono invece a bloccare il segnale in assenza di ligando^{118,119}. I domini EGF-simili controllano anche la produttività o l'abortività del segnale mediata da un'attivazione in *trans* o in *cis*, rispettivamente. L'ICD è costituito da ripetizioni di anchirina e dal dominio PEST; è la forma attiva della proteina, responsabile del trasferimento del segnale di Notch nel nucleo^{120,121}. L'attività trascrizionale dell'ICD può essere regolata negativamente mediante fosforilazione del dominio PEST. Nello stato fosforilato, tale dominio espone sequenze target di poli-ubiquitinazione riconosciute dalla E3 ubiquitino-ligasi FBXW7 (SEL-10) che ne induce la degradazione¹²². Dopo l'interazione con il suo ligando, il recettore Notch va incontro a due eventi proteolitici. Il primo taglio avviene sulla porzione extracellulare ad opera della metalloproteinasi ADAM17/TACE. Questo rende il recettore suscettibile di un secondo taglio nella porzione transmembrana mediato dalla γ -secretasi, un complesso proteico costituito da 5 subunità (presenilina 1 e 2, nicastrina, Pen-2 e Aph1) (**Figura 5**).

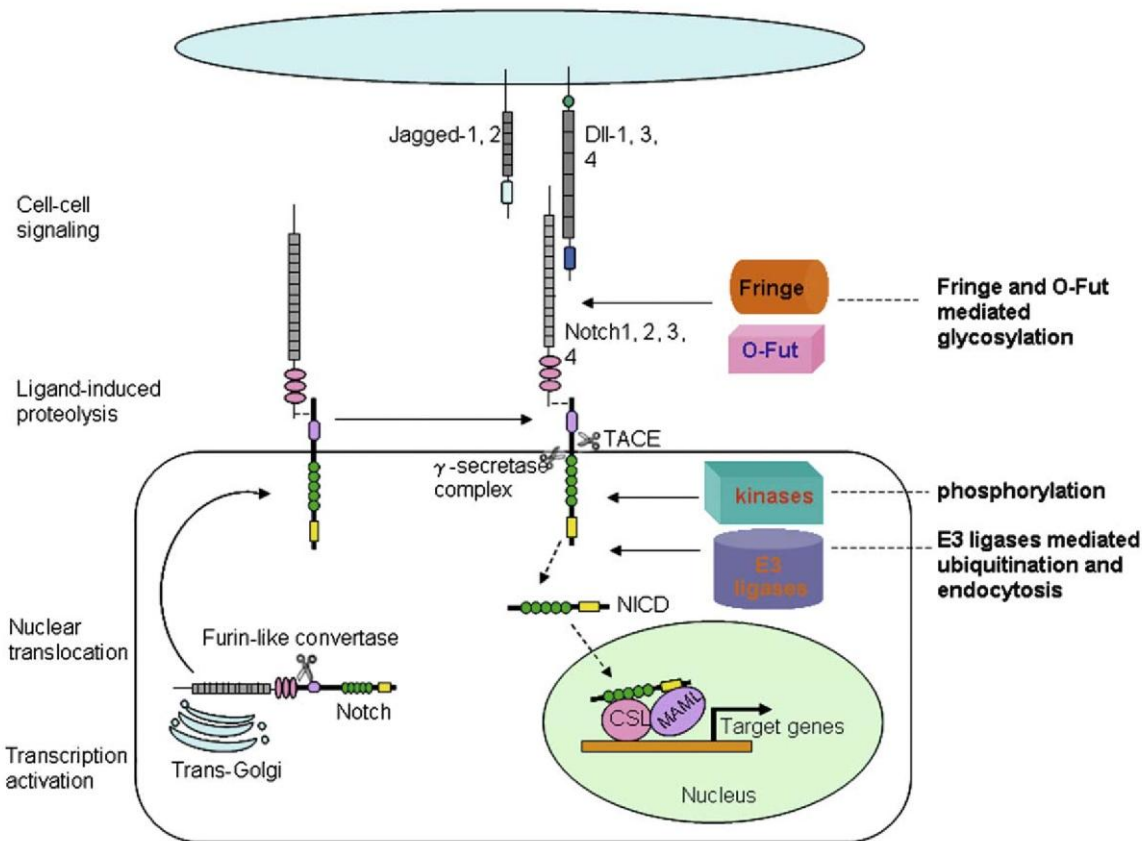


Figura 5 – Meccanismo di attivazione e trasduzione del segnale dei recettori Notch ¹¹¹.

In seguito a questi eventi, si libera il NIC (Notch Intra-Cellular) che trasloca nel nucleo, dove forma un complesso con il fattore di trascrizione CSL (CBF1 nei mammiferi, Su-h nei moscerini e LAG-1 nei nematodi). Normalmente il CSL è un inibitore trascrizionale, ma il suo legame con NIC ne determina l'attivazione attraverso il legame con le proteine MAML (mastermind-like). L'attivazione di Notch determina principalmente la trascrizione di fattori come HES (Hairy and Enhancer of Split) e HERP (Hes-Related Repressor Protein), ma anche di proteine di fondamentale importanza nella regolazione del ciclo e nella differenziazione cellulare come ciclina D1, p21, NF-κB, pre-Tα, c-Myc¹¹¹. L'attività dei recettori Notch è finemente regolata da numerosi enzimi. Altre ligasi appartenenti alla famiglia di E3 (Numb, LNX e Sel-10) mediano l'ubiquinazione e la susseguente proteolisi del recettore. Le modifiche post-traduzionali a cui possono andare incontro sono varie: i recettori Notch possono essere glicosilati e/o fosforilati

nella loro porzione extracellulare. Le proteine della famiglia Fringe, per esempio, posseggono attività glicosiltransferasica e sono coinvolte nelle modificazioni dei Notch (Lunatic Fringe, Manic Fringe e Radical Fringe)¹¹¹ che avvengono principalmente a livello dell'apparato del Golgi. Nei vertebrati tali enzimi posseggono funzioni uniche e specializzate a seconda del sottotipo. Lunatic Fringe, per esempio, promuove il legame tra Notch 1 e DII-1, mentre inibisce il legame tra il recettore e Jagged 1. Per quanto riguarda Notch 2, Lunatic Fringe potenzia la via di segnale attivata sia da Jagged 1 che da DII-1. La funzione delle altre proteine Fringe non è ancora ben delineata¹²³.

La via di segnale di Notch è regolata anche dalle modificazioni dei livelli extracellulari di ione calcio. È stato infatti dimostrato che le ripetizioni EGF-simili nel dominio extracellulare del recettore sono in grado di legare il calcio; una deplezione dello ione dal terreno di coltura delle cellule, porta ad una potente attivazione ligando-indipendente¹²⁴⁻¹²⁶. Altre vie di regolazione dell'attività del sistema recettoriale di Notch sono rappresentate dalla proteina MINT (Msx2-Interacting Nuclear Target Protein) che interferisce con NIC impedendone il legame con CSL e dalla proteina NRARP (Notch Regulated Ankyrin Repeat Protein) che contiene due ripetizioni anchirina-simili con le quali inibisce l'attività del recettore^{126,127}.

Funzioni biologiche

Nei mammiferi, durante l'organogenesi, Notch e i suoi ligandi guidano lo sviluppo di numerosi tessuti, sia di origine endodermica, che mesodermica ed ectodermica¹²⁸. La via di segnale di Notch inoltre è implicata in diversi processi cellulari anche nei tessuti dell'adulto: dal mantenimento del pool di cellule staminali, alla regolazione di funzioni quali differenziazione, proliferazione cellulare e apoptosi. Essa partecipa alla scelta da parte delle cellule dei tessuti embrionali a percorrere vie diverse di differenziazione. Ad esempio, durante lo sviluppo della *Drosophila*, i precursori delle cellule nervose e degli organi di senso hanno origine da un gruppo di cellule equipotenti, con la capacità di dare

origine sia a neuroni che a cellule epidermiche. All'inizio i precursori esprimono sia i recettori Notch che i ligandi; poi la concentrazione delle varie proteine comincia a variare tra le cellule. Tali variazioni portano ad avere cellule esprimenti o solo Notch o solo il ligando: le cellule che esprimono Notch sono inibite ad adottare la via che le trasformerebbe in cellule nervose e diventano cellule epidermiche, mentre le cellule che esprimono i ligandi diventano cellule nervose^{110,128,129}.

Nel sistema nervoso centrale dei vertebrati il Notch influenza l'equilibrio tra pool di cellule progenitrici e progenie differenziata. Infatti studi su modelli animali hanno dimostrato che il segnale mediato da questo recettore impedisce la via dei progenitori verso la neurogenesi, via che, al contrario, viene attivata bloccandone il segnale intracellulare, con conseguente diminuzione del pool di cellule staminali. Dunque in questo contesto, Notch favorisce il mantenimento del comparto staminale^{110,130}. Studi più recenti hanno inoltre dimostrato che il segnale mediato da Notch è coinvolto anche nel mantenimento del pool di cellule staminali ematopoietiche¹³¹ dove mantiene indifferenziati i precursori linfoidi, mieloidi ed eritroidi. Al contrario di quanto detto sopra, in alcuni contesti biologici la via di segnale di Notch può indurre la cellula verso la differenziazione terminale. Ne è un esempio lo sviluppo delle ali della *Drosophila*. L'attivazione di Notch tra i compartimenti cellulari dorsale e ventrale delle future ali, determina la formazione dei margini delle stesse. Una riduzione del segnale di Notch causa la perdita delle estremità del tessuto alare, mentre una sua artificiale attivazione è responsabile di una crescita eccessiva¹¹⁰. Inoltre i recettori Notch sono implicati in molti stadi dello sviluppo dell'occhio. L'espressione di antagonisti del recettore impedisce la formazione dell'organo di senso. L'attivazione ectopica di questi recettori può indurre la formazione di occhi al di fuori delle normali sedi¹²⁸. Nell'epidermide umana è il segnale attivato dal ligando Dll-1 che, attraverso la stimolazione del recettore, inizia il programma di differenziazione¹³². Notch è anche implicato nel regolare lo sviluppo e la differenziazione di cellule T, cellule B, monociti, macrofagi, cellule dendritiche, osteoclasti e cellule natural killer¹³³⁻¹³⁷.

Nei mammiferi i quattro recettori Notch svolgono ciascuno funzioni diverse anche se le differenze non sono ancora del tutto chiarite. Una mutazione non senso del Notch 3 è la causa genetica del CADASIL, una microangiopatia non ipertensiva e

non amiloidosica, causa di ictus ricorrenti e deterioramento cognitivo¹³⁸. Un'aploinsufficienza di J1¹³⁹ o una mutazione di Notch 2¹⁴⁰ portano alla Sindrome di Alagille caratterizzata da malformazioni a livello del sistema cardiovascolare, del rene e del fegato.

Una perdita di funzione di Notch 1, Notch 3, Notch 4, Dll-4 o J1 porta a difetti dell'angiogenesi e dello sviluppo dell'apparato vascolare¹⁴¹. Mutazioni del gene Notch 1 sembrano determinare la leucemia a cellule T¹⁴². Infine alcune forme di disostosi spondilocostale sono dovute a mutazioni di DII-3¹⁴³.

Come si può notare dalle precedenti considerazioni, la via segnalatoria dei Notch è fortemente implicata nell'angiogenesi. Se i fattori pro-angiogenetici, come quelli appartenenti alla famiglia del VEGF, stimolassero l'intero pool dei precursori endoteliali di un microambiente, si otterrebbe una risposta sovra-regolata ed un'angiogenesi non produttiva. In realtà non tutte le cellule endoteliali vengono stimulate. Esistono dei meccanismi che decidono quali cellule possono rispondere allo stimolo e quali no. L'asse segnalatorio Dll-4/Notch gioca un ruolo in questo meccanismo. Ad esempio è stato dimostrato che il fattore pro-angiogenetico VEGF-A induce l'espressione del Dll-4 solamente sulle cellule endoteliali deputate alla formazione del vaso in senso longitudinale (*tip cells*)¹⁴⁴. Sotto la medesima stimolazione, le *tip cells* esprimono anche dei filopodia che ne regolano il fronte d'avanzamento nel senso della lunghezza. Differentemente, altre cellule endoteliali ossia quelle deputate a rivestire il vaso (*stalk cells*), esprimono il recettore Notch 1, che le indirizza verso specializzazioni differenti, inibendo le caratteristiche proprie del primo tipo cellulare¹⁴⁵.

Notch e tumori – Ruolo oncogenico

Tutti i membri della famiglia Notch hanno il potere di indurre tumorigenesi, ovvero sono in pratica potenziali oncogeni. Infatti, una loro sovra-espressione o l'attivazione costitutiva della via di segnale, sono state spesso osservate in associazione a vari tipi di tumore (Tabella I). Numerose evidenze hanno dimostrato il ruolo oncogeno del recettore Notch 1 nella leucemia linfoblastica acuta a cellule T ed in alcuni linfomi¹⁴⁶. L'analisi cromosomica dei pazienti ha

rivelato una traslocazione cromosomica che giustappone il dominio C-terminale del Notch1 al *locus* del TCR (T-cell receptor), determinando un'attivazione costitutiva del Notch 1. Anche se meno dell'1% dei pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta mostra tale aberrazione cromosomica¹⁴⁷, mutazioni puntiformi del recettore con effetto di attivazione costitutiva del segnale costituiscono più del 50% dei casi di tale malattia^{146,148}.

Similarmente a quanto avviene in oncematologia, un'attivazione aberrante del segnale di Notch è stata provata anche nei tumori solidi. La prima evidenza che i recettori Notch potevano essere implicati nei tumori epiteliali si è avuta già negli anni '80. Infatti, studi su tumori mammari murini indotti da virus (MMTV)^{111,149} hanno indicato Notch 4 come possibile agente oncogeno. Anche in questo tipo di tumore si osserva l'espressione di una forma troncata, costitutivamente attiva, del recettore Notch 4 che sarebbe responsabile della tumorigenesi.

Studi più recenti hanno confermato che la sovra-espressione di Notch 4 porta a trasformazione tumorale anche in linee cellulari mammarie umane¹¹¹. Alternativamente, l'attivazione di J1 è stata caratterizzata in tumori della prostata¹⁵⁰, della cervice uterina¹⁵¹ e del cervello¹⁵², mentre la sovra-espressione del Notch 1 e Notch 2 è stata ben documentata a livello di carcinomi della cervice¹⁵¹, del colon (solo Notch1), del polmone¹⁵³, pancreas¹⁵⁴, cute¹⁵⁵ e del cervello¹⁵². I Notch 3 e 4 risultano essere sovra-espressi in casi di melanoma¹⁵⁵ e di carcinoma pancreatico¹⁵⁴. Il Notch 3, in particolare, sembra ricoprire un ruolo importante nella progressione del carcinoma polmonare (NSCLC)¹⁵⁶ e negli stadi avanzati del carcinoma prostatico¹⁵⁷. I meccanismi di oncogenesi Notch-indotta includono l'inibizione dell'apoptosi, l'induzione della proliferazione e della crescita cellulare ed adattamenti metabolici¹⁵⁸.

Nei tumori solidi, l'attivazione dei recettori Notch può proteggere dall'apoptosi regolando negativamente la chinasi JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), che viene attivata a seguito di alcuni stress cellulari¹⁵⁹. In questo sistema, il NIC1 interagisce fisicamente con una protein-chinasi attivatoria di JNK bloccandone l'attività. Diversamente, l'attivazione di Notch può indurre proliferazione promuovendo la CDK2 (*cell cycle dependent kinase 2*) e la ciclina D, oppure rimuovendo restrizioni a valle, attraverso la sotto-regolazione degli inibitori del ciclo cellulare, quali ad esempio la proteina p27^{kip1}^{160,161}.

TIPO TUMORALE	NOTCH/LIGANDO	FUNZIONE	RIFERIMENTI
Leucemia linfoblastica acuta a cellule T	Notch 1	oncogeno	146
Carcinoma squamoso della cute	Notch 1	oncosoppressore	162
Melanoma	Notch 1	oncogeno	155
Tumore della mammella	Notch 4, Notch 1	oncogeno	111
Tumore del polmone non a piccole cellule	Notch 3	oncogeno	156
Adenocarcinoma del polmone	Notch 1/Jagged1,Dll1,Dll4	oncosoppressore	156
Tumore del polmone a piccole cellule	Notch 1/2	oncosoppressore	156
Cancro del colon-retto	Notch 1/Jagged1,Jagged2	oncogeno	153
Cancro del pancreas	Notch 1,Notch 3/Jagged2	oncogeno	154
Gliomi	Notch 2	oncogeno	163
Adenocarcinoma epatico	Notch 1	oncosoppressore	154

Tabella I - Ruolo dei recettori Notch nei diversi contesti tumorali.

Sempre in ambito tumorale, i Notch possono essere attivati da Ras e, in un circuito a *feedback* positivo, possono sostenere, a loro volta, l'attivazione di Ras¹⁶⁴.

Il coinvolgimento oncogenico della segnalazione dei Notch, nei tumori, diventa rilevante se consideriamo anche aspetti pro-tumorali che provengono dal microambiente. A tale riguardo è stato dimostrato che un'attivazione dei Notch nei macrofagi, in un contesto microambientale neoplastico, induce l'acquisizione del fenotipo M2 (*Macrophage 2*)¹⁶⁵. È noto da diversi studi come tale fenotipo impedisca l'attuazione di una risposta citotossica anti-tumorale efficiente, propria invece dei macrofagi M1 che rilasciano citochine utili a combattere il tumore¹⁶⁶.

Notch e tumori – Ruolo oncosoppressore

A fronte dei numerosi studi che inquadrano il segnale di Notch come pro-tumorale, numerose evidenze sembrano suggerire per i recettori Notch un ruolo anti-tumorale, a prima vista paradossale. Notch, infatti, a seconda del contesto

tissutale può essere un potente oncosoppressore. Rispetto alle neoplasie dei linfociti T, nelle malattie linfoproliferative del tipo B, in 4 diversi studi, è stata individuata una chiara azione anti-tumorale. L'attivazione di tale via è capace, infatti, di indurre blocco del ciclo cellulare e di indurre apoptosi nei linfociti B trasformati¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Nella leucemia linfoblastica acuta a cellule B, la forma costitutivamente attiva di tutte 4 le forme recettoriali funge da potente induttore di arresto della crescita e di apoptosi; il NIC1 sembra esplicare tali funzioni anti-tumorali anche nel linfoma di Hodgkin e nel mieloma multiplo¹⁷⁰. Un coinvolgimento in tal senso è stato osservato anche per il carcinoma della cervice uterina. Infatti, negli stadi più precoci della malattia è ancora possibile osservare un'attivazione del Notch 1. In questi pazienti il Notch 1 sembrerebbe controllare negativamente la progressione dei tumori HPV-indotti; infatti, negli stadi più tardivi i livelli di Notch 1 sono drasticamente ridotti, facendo supporre che una sua attivazione possa contrastare la progressione tumorale¹⁷¹. La funzione di oncosoppressore del Notch 1 è stata dimostrata anche a livello della cute dei topi¹⁶². Qui l'inibizione selettiva dell'attività di Notch 1 determina la formazione di tumori a cellule basali o carcinomi squamosi; all'esordio l'epidermide inizia una fase iperproliferativa che culmina poi con la piena trasformazione delle cellule. La via di segnale di Notch sembrerebbe commissionare la differenziazione dell'epitelio squamoso tramite la sovraespressione di p21¹⁶². Dunque sembra verosimile ipotizzare che Notch 1 possa funzionare nella cute come oncosoppressore. Tale evidenza è stata dimostrata anche nella cute umana. Infatti, in una normale epidermide differenziata, Notch attivato assicura la maturazione ed il mantenimento dei cheratinociti¹⁷². In effetti, uno studio di immunostochimica condotto su tessuti umani ha dimostrato che l'espressione di Notch 1 è ridotta nei carcinomi squamosi dell'epidermide e nei carcinomi basali, rispetto alla cute sana¹⁷³. Tale ruolo anti-tumorale è stato caratterizzato anche in altri tumori solidi come il polmone¹⁷⁴, il cervello¹⁷⁵ ed il fegato¹⁷⁶.

Nella prostata la via di segnale dei Notch è di fondamentale importanza sia nello sviluppo che nella crescita della ghiandola normale. Wang *et al.*^{177,178} hanno studiato l'azione del segnale di Notch in modelli murini, *ex vivo* ed *in vivo*, dimostrando che l'inattivazione del segnale recettoriale determina un aumento della proliferazione accompagnato da un'alterata differenziazione delle cellule epiteliali prostatiche. La prova definitiva di un ruolo attivo di Notch nello

sviluppo della prostata è stata ottenuta in un modello murino, tramite il silenziamento del gene Notch 1¹⁷⁹ che ha dimostrato che questo recettore è indispensabile per la crescita e la differenziazione della ghiandola. E' stato suggerito che la perdita di funzione di Notch 1, e del suo effettore HEY-1, porti allo sviluppo di un fenotipo iperplastico, facilitando così l'insorgenza del tumore prostatico^{177,178}.

Shou *et al.*¹⁸⁰ hanno dimostrato che l'attivazione forzata del segnale di Notch 1 in cellule di carcinoma prostatico, determina un'inibizione della proliferazione cellulare, mentre Zhang *et al.* hanno dimostrato che la ridotta espressione del ligando J1 induce un'inibizione della crescita cellulare e l'arresto del ciclo cellulare in fase S¹⁸¹. Tuttavia dati recenti suggeriscono un ruolo pro-tumorale di Notch 1 nel carcinoma prostatico in cui il recettore sembra in grado di promuovere la capacità invasiva delle cellule tumorali¹⁸². In conclusione, il ruolo di Notch nell'insorgenza e nell'evoluzione del tumore della prostata è ancora, in larga parte, da chiarire.

Notch ed ipossia

L'ipossia controlla molti aspetti della vita delle cellule normali e di quelle tumorali. Recentemente è stato scoperto che la bassa tensione di ossigeno è capace di regolare la differenziazione delle cellule staminali in coltura. Gustafsson *et al.*¹⁸³ hanno mostrato che l'ipossia inibisce la differenziazione delle cellule progenitrici della cresta neurale e delle cellule miogeniche e che questo processo è mediato dall'attivazione dei recettori Notch. Infatti, la somministrazione di inibitori di γ -secretasi in ambiente ipossico ripristina la differenziazione cellulare. Gli autori sostengono che HIF-1 α , aumentato in condizioni di bassa tensione di ossigeno, sia in grado di potenziare la stabilità del NIC e dunque il suo segnale. In letteratura, tuttavia, non è ancora chiarito il preciso meccanismo molecolare dell'interazione esistente fra segnale di Notch e ipossia¹⁸⁴. Un importante tassello del puzzle è fornito dal lavoro di Sahlgren¹⁸⁵ in cui si dimostra che l'ipossia favorisce la transizione epitelio-mesenchimale delle cellule tumorali (EMT) e che l'attivazione di Notch 1 è necessaria a tal fine. Un elevato numero di studi ha dimostrato che l'EMT apporta un contributo primario nell'invasività locale ed a

distanza; il coinvolgimento dei Notch nella metastatizzazione tumorale sembrerebbe passare proprio per la EMT¹⁸⁶. Inoltre l'ipossia tumorale è strettamente legata alla EMT ed al potenziale metastatico e sembrerebbe che, in diverse linee cellulari, il Notch 1 attivato sia necessario per convertire lo stimolo ipossico in uno stimolo induttore di EMT¹⁸⁵. Tale differenziazione viene mediata, in parte, da due repressori trascrizionali, Snail e Slug. Sahlgren *et al.* hanno mostrato che la via di Notch 1 adotta due meccanismi che agiscono sinergicamente nell'attivare Snail. Il primo è quello di reclutare NIC1 direttamente sul promotore del gene Snail, mentre nel secondo, indirettamente, il NIC1 favorirebbe il legame di HIF-1 α sul promotore di un'ulteriore proteina enzimatica, la LOX-1 (*lysyl oxidase*), la quale a sua volta coopererebbe nel massimizzare l'espressione genica dello stesso Snail¹⁸⁵. Inoltre Chen *et al.* hanno osservato che l'ipossia può mediare l'incremento dei geni target dei Notch, HES-1 e HEY-1, e che è proprio HIF-1 α ad indurne l'espressione¹⁸⁶. In entrambi questi lavori, il blocco in ipossia dell'attivazione della via di Notch abroga l'incremento e l'attivazione di Snail e Slug così come le competenze migratorie ed invasive acquisite alle basse tensioni d'ossigeno^{185,186}.

SCOPO DELLO STUDIO

Nell'evoluzione del CP l'ipossia riveste un ruolo importante; infatti, un abbassamento della tensione di ossigeno tissutale si correla ad una maggiore aggressività del tumore. In alcuni tumori solidi sembra che l'ipossia possa modulare la via di segnale di Notch.

La nostra ricerca si proponeva di valutare gli effetti dell'ipossia cronica sull'espressione e sull'attivazione dei recettori Notch nel carcinoma prostatico ed il ruolo che essi esercitano nella progressione del tumore.

È noto dalla letteratura che le cellule di adenocarcinoma prostatico possono andare incontro ad un processo di trans-differenziazione e acquisire un fenotipo simil-neuroendocrino (NED), in risposta a cambiamenti del "microambiente tumorale", e che l'ipossia riesce ad indurre efficacemente tale differenziazione. Poiché Notch è uno dei principali regolatori dello sviluppo neuronale, abbiamo deciso di valutare se l'ipossia fosse in grado di modulare la NED attraverso la modulazione del segnale di Notch. Inoltre, è noto che l'acquisizione della ormono-indipendenza nel CP è legata ad una prognosi infausta e che tale fenotipo è favorito da un microambiente tumorale ipossico. Pertanto abbiamo valutato se l'acquisizione del fenotipo ormono-indipendente in ipossia fosse legata ad una modulazione del segnale di Notch.

Poiché le vie di segnalazione a partenza dalla membrana cellulare, vengono regolate dalle modificazioni dei microdomini lipidici di membrana che possono compartimentalizzare tali proteine, limitando o favorendo la trasduzione del segnale, abbiamo valutato se in ipossia vi fossero delle modificazioni di membrana che potessero giustificare una modulazione del segnale mediato dai recettori Notch.

Nel dettaglio, il nostro lavoro si è articolato nei seguenti punti:

- stabilire il profilo di espressione dei quattro recettori Notch e dei cinque ligandi nel nostro modello sperimentale, in normossia e ipossia;
- studiare il ruolo dell'ipossia sulla modulazione della via di segnale dei recettori Notch;

- identificare il ruolo della modulazione del segnale di Notch indotta dall'ipossia sulla crescita tumorale;
- stabilire il ruolo dell'ipossia sulla differenziazione neuroendocrina delle cellule di CP ed identificare il ruolo dei recettori Notch;
- stabilire una eventuale correlazione fra ipossia, acquisizione di ormono-indipendenza e segnale di Notch;
- stabilire se l'ipossia induca un rimaneggiamento dei raft lipidici di membrana che possa modificare la via di segnalazione di Notch;
- analizzare il profilo dei recettori Notch in tessuti umani derivati da biopsie di pazienti oncologici ed individuare un'eventuale correlazione con il grado di malignità tumorale e con il grado di ipossia.

Per valutare ciò ci siamo avvalsi di un modello sperimentale che ha previsto l'uso di una linea cellulare umana di carcinoma prostatico androgeno-dipendente, LNCaP. Tali cellule sono state sottoposte a condizioni di normossia e ipossia, ovvero a crescita in atmosfera di ossigeno al 21% o al 3%, per tempi prolungati (fino a 2 settimane).

Per la parte *ex-vivo*, in collaborazione con la Divisione di Urologia dell'Ospedale Universitario di Siena, abbiamo analizzato biopsie di CP confrontate con campioni di controllo non neoplastici.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

In questo studio è stata impiegata una linea cellulare di carcinoma prostatico umano androgeno-sensibile, LNCaP (ATCC, Rockville, MD, USA). Le cellule sono state cresciute in terreno di coltura RPMI 1640 (Euroclone), supplementato con 10% (vol/vol) di siero bovino fetale (FBS, Euroclone), soluzione antibiotica-antimicotica (Gibco), e glutamina (Euroclone), su piastre per coltura cellulare (Falcon).

Condizioni di crescita e mantenimento in coltura

Le cellule sono state coltivate ad una temperatura di 37°C, in atmosfera umidificata, con CO₂ al 5% e O₂ al 21% (normossia) o al 3% (ipossia) impiegando un incubatore per colture cellulari provvisto di sensore di ossigeno (Forma Scientific T/C Model 3131).

Microscopio a contrasto di fase

Per l'immunocitochimica, le immagini delle cellule cresciute in normossia o ipossia, sono state acquisite da una videocamera (AxioCam MR) collegata ad un microscopio a contrasto di fase invertito (Zeiss Axiovert 25). Le immagini sono state poi elaborate con il software Axiovision.

Studio della proliferazione cellulare ancoraggio-dipendente ed indipendente

Cellule LNCaP sono state piastrate a bassa densità (4×10^4 cellule) in piatti da 6 pozzetti (Falcon), in triplicato. La crescita è stata eseguita in normossia o ipossia,

in assenza o in presenza di inibitore della γ -secretasi, N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) (Sigma). Il DAPT è stato dissolto in DMSO (Dimethyl sulphoxide) (Sigma). Al tempo desiderato le cellule sono state contate mediante l'utilizzo di un emocitometro e di un microscopio a contrasto di fase. Per quanto riguarda la crescita ancoraggio-indipendente (soft agar), le cellule sono state piastrate a una densità pari a 2×10^3 cellule/piatto, in piatti da 6 cm (Falcon) ricoperti con agar allo 0.5% (Sigma), in un terreno contenente RPMI, 10% FBS e 0,33% agar. Le cellule sono state fatte crescere in condizioni di normossia o ipossia. Terreno di crescita fresco è stato aggiunto ogni tre giorni. Dopo quattro settimane le colonie sono state colorate con colorante vitale violetto di *p*-iodonitrotetrazolio (Sigma), e le colonie visibili sono state contate sull'intera piastra.

Studio della proliferazione cellulare in presenza di ormoni androgeni

Cellule LNCaP sono state piastrate a bassa densità (8×10^4 cellule) in RPMI supplementato con 10% di FBS, soluzione antibiotica-antimicotica e glutamina, in piatti da 6 pozzetti. Dopo 48 ore, il terreno di crescita è stato sostituito con RPMI contenente 1% di FBS e 4% di charcoal-stripped FBS e le cellule sono state incubate in normossia o ipossia per 5 giorni e poi stimolate con diidrotosterone (DHT) [10nmol/L]. Dopo 7 giorni le cellule sono state staccate dal piatto mediante tripsinizzazione, contate mediante l'utilizzo di un emocitometro e di un microscopio a contrasto di fase.

Estrazione di RNA, retrotrascrizione e Real Time-PCR quantitativa

L'estrazione del RNA totale, la retro-trascrizione e la PCR quantitativa (Real Time) sono state eseguite presso il laboratorio dell'Unità di Endocrinologia del Dipartimento di Fisiopatologia Clinica dell'Università di Firenze, secondo il seguente protocollo. Per l'estrazione del RNA totale è stato utilizzato il kit

RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguendo il protocollo raccomandato dalla ditta, effettuando un trattamento aggiuntivo con DNasi I per eliminare eventuali residui di DNA genomico. Le cellule sono state lavate con PBS freddo e raccolte nel tampone di lisi contenente guanidina isotiocianato, con l'aiuto di uno scraper. I campioni cellulari raccolti in tampone di lisi sono stati processati subito o mantenuti a -80°C. La quantità e la qualità del RNA totale estratto sono state determinate spettrofotometricamente usando lo strumento Nanodrop ND-1000. L'RNA totale è stato poi mantenuto a -80°C.

L'RNA totale (1µg) è stato retrotrascritto in 40 µl di volume finale usando i reagenti del TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem). Le condizioni di reazione della retrotrascrizione sono state le seguenti: 10 minuti a 25°C, 30 minuti a 48°C e 5 minuti a 95°C. Per ogni campione di RNA totale è stata fatta una retrotrascrizione in triplicato. Il cDNA ottenuto è stato sottoposto a PCR quantitativa secondo tecnica real-time, usando una tecnologia TaqMan, utilizzando un ABI PRISM 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystem). Tutti i primer specifici ed i probe marcati con il colorante FAM sono stati ottenuti dalla ditta Applied Biosystem. Per la normalizzazione dei campioni è stato usato come controllo interno il gene GAPDH. La PCR è stata eseguita usando il seguente protocollo: 100 ng di campione sono stati sottoposti a una incubazione iniziale a 50°C per 2 minuti e 95°C per 10 minuti; poi sono stati eseguiti 40 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. Ogni campione di cDNA è stato dosato in duplicato e i risultati espressi come fg di mRNA del gene analizzato per µg di RNA totale.

Estrazione delle proteine, elettroforesi su gel di poli-acrilamide (SDS-PAGE) e protocollo di Western Blotting

Per la purificazione delle proteine dai lisati cellulari, le cellule sono state recuperate con PBS freddo e centrifugate a 2000xg per 5 minuti. I pellet sono stati poi risospesi in 200 µl di PBS, contenente 1% (vol/vol) di Triton X-100, tenuti in ghiaccio per 10 minuti, sonicati per 5 minuti, rimessi in ghiaccio per altri 10 minuti e centrifugati a 2500xg per 10 minuti, a 4°C. Il sovrantante è stato recuperato e il contenuto proteico determinato mediante saggio colorimetrico con

Blue di Coomassie (Pierce). I campioni normalizzati per contenuto proteico, sono stati processati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide al 8% o 10% per la rivelazione di Notch 1, 2, 3, β 3-tubulina, NSE, dnHES-1 (HA-tag), GAPDH. Una volta separate mediante elettroforesi, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa a 500 mA per 2 ore, a 4 °C, in tampone di trasferimento (20 mM Tris, 180 mM glicina, 0,02% (w/v) SDS, 10% (v/v) metanolo). La membrana è stata quindi colorata con Ponceau S per valutare l'entità del trasferimento. Il blocco dei legami aspecifici della membrana è stato ottenuto mediante incubazione in albumina 5% in TBS (Tris buffer saline), a 42°C per 60 minuti. La membrana è stata quindi incubata, a 4°C per 12 ore, con anticorpi primari specifici per la proteina d'interesse, alle seguenti concentrazioni: anti-Notch 1 (1:1000) (Cell Signalling), anti-Notch 2 (Cell Signalling) (1:1000), anti-Notch 3 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology), anti- β 3-tubulina (1:2500) (Santa Cruz Biotechnology), anti-NSE (1:1500) (Dako Cytomation), anti-HA-tag (1:1000) (Cell Signaling) e anti-GAPDH (1:1000) (Cell Signaling). La membrana è stata poi lavata tre volte con TBS contenente Tween20 (0,1% v/v) e trattata con l'anticorpo secondario specifico. Come anticorpi secondari sono stati utilizzati anti-IgG di coniglio (Biorad, diluizione 1:3.000) e anti-IgG di topo (Pierce, diluizione 1:20000). L'interazione antigene-anticorpo è stata visualizzata mediante reazione di chemiluminescenza, utilizzando il kit ECL (Amersham Bioscience). Ciascun esperimento è stato eseguito tre volte.

Immunocitochimica

Per la valutazione del grado di NED mediante immunocitochimica, sono stati utilizzati anticorpi monoclonali anti-NSE (CellMarque, Ventana). L'analisi è stata effettuata mediante Benchmark XT Ventana System. Le cellule LNCaP sono state prima cresciute su un supporto di poli-L-lisina, poi lavate con PBS ed infine fissate in etanolo al 50%. L'immunocolorazione è stata resa possibile utilizzando HRP Multimer System. La 3-3'-diaminobenzidina (DAB, Ventana) è stata utilizzata come substrato per l'attuazione della reazione cromogena mediata dalla perossidasi (UltraView Universal DAB Detection Kit, Ventana).

Immunoistochimica

Sono stati analizzati 170 campioni ottenuti per biopsia da tessuto tumorale e 20 di tipo non neoplastico. La raccolta dei campioni e l'analisi è stata effettuata presso la Divisione di Urologia dell'Ospedale Universitario di Siena. Nessun paziente, al momento della biopsia, era stato sottoposto ad alcun trattamento e tutti hanno dato consenso informato allo studio. I tessuti, mantenuti in paraffina, sono stati tagliati in fettine di spessore di 4 μ m e colorati con il metodo eosina/ematossilina. Il grado ed il punteggio secondo il metodo di Gleason di ogni biopsia sono stati assegnati da un patologo esperto. Le sezioni di tumore sono state classificate di basso grado quando il punteggio di Gleason era ≤ 7 , oppure di alto grado se ≥ 8 . Come biopsie di controllo sono state scelte iperplasie delle cellule basali o atrofie. La colorazione è stata effettuata su fettine tissutali di 4 \pm 0,5 μ m di spessore utilizzando l'Ultravision Detection System Anti-Polyvalent HRP (Ultra V Block) (LabVision, Fremont, CA, USA, Bio-Optica). I corrispettivi vetrini sono stati incubati con anticorpi anti-Notch 1, Notch 2, Notch 3 (1:50; pH 6), e anti-anidrasi carbonica (CA) IX (Bioscience Slovakia S.R.O.) (1:50; pH 6) utilizzando come cromogeno la 3-3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako, Milano). Le sezioni sono state blandamente contro-marcate con ematossilina ed analizzate mediante microscopia. Come controllo negativo sono state considerate immunoglobuline sieriche non immunogene. La semi-quantizzazione del segnale colorimetrico è stata ottenuta mediante HSCORE¹⁸⁷ come riportato di seguito: 1 (debole, ma registrabile), 2 (moderato) e 3 (intenso). Sono stati considerati 3 campi differenti (100 cellule/campo) ad una risoluzione 20x. L'analisi è stata effettuata in cieco da 2 diversi patologi, e la media dei due punteggi è stata utilizzata per l'analisi statistica.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante SYSTAT-7. Le differenze nell'espressione dei Notch e della CA IX sono state analizzate mediante il test Chi-quadro. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Trasduzione adenovirale

La forma dominante negativa del gene HES-1 (dnHES-1), la forma costitutivamente attiva di Notch 1 (N1IC) e LacZ, sono stati clonati nel costrutto adenovirale pAdlox¹⁸⁸. Gli adenovirus ricombinanti così costruiti sono stati prodotti, purificati e trattati come descritto dal lavoro di Hardy *et al.* del 1997¹⁸⁸. La trasduzione adenovirale è stata effettuata in DMEM (serum-free) con 10³ particelle virali per cellula, in presenza di polilisina-D idrobromuro (Sigma), per due ore a 37°C. La preparazione dei costrutti adenovirali è stata eseguita nel laboratorio del Maine Medical Center Research Institute (MMCRI, Scarborough, ME, USA), diretto dal Prof. Igor Prudovsky.

Trasduzione particelle virali shRNA-Notch3/scramble

Per il silenziamento del gene NOTCH3 sono state utilizzate particelle lentivirali contenenti gli shRNA complementari (sc-37135-V, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Essi contengono tre specifici costrutti NOTCH 3-specifici codificanti per un oligonucleotide shRNA finale di circa 19-25 bp. Le particelle lentivirali (sc-108080, Santa Cruz Biotechnology Inc.) codificanti per una sequenza shRNA scramble, sono state utilizzate come controllo negativo. Le cellule LNCaP con una stabile espressione del shRNA-NOTCH 3 (siN3) e dello scramble (C) sono state isolate, previa selezione in puromicina, in funzione dell'entità di silenziamento della proteina di interesse, mediante Western blotting.

Frazionamento della membrana plasmatica

Per il frazionamento della membrana cellulare è stata utilizzata una tecnica che consente l'isolamento dei raft lipidici basandosi su proprietà chimico-fisiche di questi microdomini di membrana. I raft, infatti, sono resistenti ai detergenti organici come il Triton X-100 a temperature inferiori a 8° C. Dopo trattamento delle cellule con Triton X-100, la popolazione dei raft è stata separata in gradiente di saccarosio dal resto della membrana cellulare, in quanto possiede rispetto ad essa una densità diversa. Questa procedura, temperatura dipendente, è stata

eseguita in stanza fredda (4° C). Per questo studio è stato utilizzato il kit Caveolae/Raft isolation kit (Sigma) contenente la subunità β della tossina del colera coniugata con perossidasi (CTB-HRP). Quest'ultima è stata usata come marcatore dei raft, poiché in grado di legarsi in maniera altamente specifica al ganglioside GM1, proteina residente nei domini raft. Per marcare i domini non-raft è stata utilizzata una CTB-HRP coniugata ad un anticorpo anti-CD71 (Santa Cruz Biotechnology). Dopo centrifugazione (22 ore a 35.000 rpm/4°C), sono state raccolte 9 frazioni ed analizzate mediante dot-blot: ogni frazione (5 μ l) è stata depositata su una membrana di PVDF (Amersham Pharmacia Biotech) e valutata per la positività a CTB-HRP e CD71. In questo modo sono state selezionate le frazioni 3-4 (raft, R) e le frazioni 7-8 (non-raft, NR) che sono state separate su un gel di poliacrilammide al 8%, trasferite su membrana PVDF ed analizzate per l'espressione di Nicastrina, Presenilina-1, Notch 1, Notch 2 e Notch 3, mediante Western blotting.

RISULTATI

L'ipossia modula l'espressione dei recettori Notch e dei loro ligandi

Per studiare gli effetti dell'ipossia sul CP, la linea cellulare di carcinoma prostatico umano androgeno-dipendente, LNCaP, è stata esposta al 3% di ossigeno per tempi variabili, fino ad un massimo di 14 giorni. L'efficacia dell'ipossia nel nostro sistema sperimentale è stata valutata mediante Western blotting per l'espressione del fattore indotto dall'ipossia, HIF-1 α . Come mostrato in **Figura 6**, dopo 24 ore di incubazione, l'espressione di HIF-1 α risulta notevolmente incrementata nelle cellule mantenute al 3% di O₂ rispetto alle cellule di controllo.

Poiché Chen *et al.*¹⁸⁹ hanno dimostrato che l'ipossia modula la via di segnale di Notch in cellule di carcinoma polmonare, abbiamo valutato come potesse modificarsi l'espressione dei recettori Notch e dei loro ligandi, in ipossia nelle cellule di CP. Per fare ciò, cellule LNCaP sono state cresciute in condizioni di normossia e ipossia per 7 e 14 giorni, e l'espressione dei recettori Notch e dei ligandi è stata analizzata tramite PCR quantitativa (qPCR) (**Figura 7**). Nel nostro modello sperimentale Notch 4 e Dll-3 non sono risultati rilevabili. I livelli di mRNA di Notch 1 e 2 erano abbondanti in normossia, ma si riducevano significativamente in ipossia, mentre i livelli di Notch 3 non sembravano subire cambiamenti significativi (**Figura 7A**). Fra i ligandi, Jagged (J)1 e J2, sono risultati i più espressi ed anche la loro espressione si riduceva in ipossia. I ligandi della famiglia Delta, Dll-1 e 4, risultavano essere meno espressi, ma i loro livelli erano ugualmente modulati in condizioni di bassa tensione di ossigeno (**Figura 7B**). Le variazioni dell'espressione dei recettori Notch e dei loro ligandi non erano transitorie; permanevano infatti anche dopo 14 giorni di esposizione all'ipossia (dati non mostrati).

Il recettore Notch 3 è attivo nelle cellule LNCaP in condizioni di ipossia

Abbiamo quindi deciso di indagare l'espressione proteica dei recettori Notch nelle due condizioni sperimentali. Nelle cellule LNCaP, l'espressione proteica della forma non clivata (full-length), ossia non attivata, dei recettori Notch 1 e Notch 2 dopo 7 giorni di ipossia risulta significativamente ridotta (**Figura 8A**). Questa riduzione di espressione delle forme non clivate di Notch 1 e Notch 2 potrebbe essere attribuita sia ad una ridotta traduzione proteica, come suggerito dai risultati della qPCR, sia ad una "attivazione" dei due recettori con scomparsa della porzione non clivata in seguito al taglio proteolitico da parte di TACE e γ -secretasi, e aumento della porzione intracellulare attiva, a peso molecolare inferiore. Poiché il trattamento delle cellule con l'inibitore della γ -secretasi, DAPT, non aumenta la quota della forma full-length delle proteine Notch 1 e Notch 2, si evince che la riduzione dei livelli dei due recettori in ipossia è dovuta ad una ridotta traduzione proteica. La riduzione dell'espressione dei recettori Notch 1 e Notch 2 viene mantenuta fino a 14 giorni di bassa tensione di ossigeno (dati non mostrati).

Per quanto riguarda il Notch 3 invece, non solo l'ipossia non modifica in maniera significativa la trascrizione del recettore, ma porta ad una attivazione della proteina. Come dimostrato in **Figura 8A**, infatti, la forma "full-length" (non attiva) di Notch 3 scompare quasi del tutto in ipossia, ma il trattamento con il DAPT ripristina livelli significativi di proteina. Questi dati indicano che la mancata visualizzazione della forma non clivata in ipossia è secondaria ad una marcata attivazione del recettore. Per confermare che in ipossia Notch 3 è attivo, abbiamo valutato l'espressione di Notch 3 mediante immunocitochimica che ci permette di studiare la localizzazione cellulare della proteina. Infatti, la porzione intracellulare del recettore (NIC), una volta clivata, migra nel nucleo. Come si può osservare nella **Figura 8B**, in normossia è possibile apprezzare solo una blanda colorazione citoplasmatica e di membrana, mentre, in ipossia, la colorazione è più marcata e localizzata al compartimento nucleare. I dati, complessivamente, confermano l'attivazione di Notch 3 a basse tensioni di ossigeno.

L'ipossia modula la via di segnale intracellulare mediata dai recettori Notch

Per valutare se la ridotta trascrizione di mRNA di Notch 1 e Notch 2 corrispondesse ad una ridotta attivazione recettoriale, abbiamo determinato i livelli di espressione di due dei principali geni target di Notch 1 e 2, HES-1 e HEY-1. Cellule LNCaP sottoposte a bassa tensione di ossigeno hanno mostrato una significativa riduzione dei livelli di espressione di HES-1 e HEY-1 rispetto alle cellule in normossia, dimostrando quindi che la via di segnale mediata da Notch 1/2 è, in effetti, inattivata in ipossia (**Figura 9**). Cellule cresciute in presenza di DAPT sono state utilizzate come controllo dell'inibizione del segnale di Notch: la presenza di DAPT infatti riduce significativamente i livelli di HES-1 ed HEY-1 sia in normossia che in ipossia (**Figura 9**).

Poiché lo studio della proteina Notch 3 sembra indicare che il recettore è attivo in ipossia, abbiamo cercato di individuare i geni target di Notch 3 in questo modello sperimentale. Tuttavia, non abbiamo trovato nessun fattore di trascrizione, fra quelli riportati in letteratura (HES-1, HES-2, HES-5, HES-7, HEY-1, HEYL), i cui livelli aumentassero a basse tensioni di ossigeno (dati non mostrati). E' possibile che qualche altro gene target non analizzato in questo studio, o non ancora individuato, risponda all'attivazione di Notch 3 nel nostro modello sperimentale.

Distribuzione della γ -secretasi nei microdomini di membrana e attivazione del segnale di Notch 3 in ipossia

Per valutare il meccanismo di attivazione di Notch 3 in ipossia, abbiamo studiato la distribuzione del recettore e della γ -secretasi all'interno della membrana plasmatica, in normo e ipossia. Infatti, è noto che la γ -secretasi ha un livello di attività enzimatica diverso a seconda della composizione lipidica del microdominio di membrana in cui è inserita. La γ -secretasi è un complesso multiproteico che si compone di almeno 4 componenti: le preseniline, la nicastrina, l'APH-1 (anterior pharynx-defective 1) e la PEN-2 (presenilin

enhancer 2). Abbiamo valutato la presenza, nelle frazioni raft e non-raft, di presenilina 1 e nicastrina. La presenilina 1 rappresenta la funzione catalitica dell'enzima, responsabile del rilascio del frammento intracellulare attivo di Notch, il NIC. La presenilina può essere presente in forma attiva, non degradata, con un peso molecolare di 48 kDa, o in forma non attiva (degradata), con peso molecolare di 18 kDa. Per questo esperimento ci siamo avvalsi della collaborazione dei ricercatori del laboratorio di Endocrinologia del Dipartimento di Fisiopatologia Clinica (Università di Firenze) diretto dalla Prof.ssa Giovanna Danza che hanno effettuato il frazionamento della membrana plasmatica di cellule LNCaP esposte alla condizione di normossia o di ipossia, per 7 giorni. La **Figura 10** mostra il risultato di questo esperimento. Per prima cosa sono state caratterizzate le diverse frazioni per individuare le porzioni non-raft (NR) e le raft (R) (**Figura 10A**) identificate, rispettivamente, per la positività alla colorazione con anti-CD-71 e per la presenza della subunità β della tossina colerica (CT- β). Dopo aver selezionato due frazioni R (3, 4) e due NR (7, 8) è stata effettuata una analisi di Western blotting delle diverse frazioni (**Figura 10B**) dalla quale si dimostra che la proteina Nicastrina 1 si localizza di preferenza nelle porzioni R della membrana plasmatica sia in condizioni di normossia che di ipossia; invece, la proteina Presenilina 1 in condizioni di normossia si trova sia nei R che nelle porzioni NR; tuttavia, nelle frazioni R è totalmente degradata (18 kDa). In ipossia la Presenilina 1 passa di preferenza dalle frazioni NR alle frazioni R, mantenendosi sempre nella sua forma attiva, non degradata (48 kDa). Questi dati fanno ipotizzare che il complesso enzimatico della γ -secretasi in forma attiva si assembla, in condizioni ipossiche, all'interno delle porzioni raft. Come mostrato nei successivi pannelli della **Figura 10B**, le proteine corrispondenti ai recettori Notch 1, Notch 2 e Notch 3 risultano ben visibili in normossia nelle porzioni NR di membrana; in ipossia, le proteine Notch 1 e Notch 2 scompaiono, mentre la proteina Notch 3 è ancora visibile e viene ridistribuita equamente tra frazioni R e NR.

Quindi, in ipossia, γ -secretasi attiva e recettore Notch 3 coesistono all'interno dei domini raft di membrana. E' dunque plausibile che in queste condizioni il recettore Notch 3 sia il substrato naturale dell'enzima che lo cliva attivandone la via di segnale.

L'ipossia induce la differenziazione neuroendocrina (NED) nelle cellule LNCaP

Quando cellule LNCaP sono cresciute al 3% di ossigeno per tempi prolungati, si notano cambiamenti nella morfologia cellulare. In **Figura 11** sono riportate le immagini relative al settimo e al quattordicesimo giorno di coltura in ambiente ipossico: le cellule hanno modificato la loro normale morfologia assumendo un aspetto simile ai neuroni. In particolare, si osserva la comparsa di lunghi processi "simil-dendritici" in numerose cellule, un aspetto già in precedenza associato al fenomeno della differenziazione neuroendocrina (NED)⁶². Poiché è noto dalla letteratura che il fattore di trascrizione pro-neurogenico neurogenina (Ngn)3 è altamente espresso nei tumori neuroendocrini della prostata¹⁹⁰, abbiamo analizzato i livelli di Ngn3, tramite PCR quantitativa, nelle cellule cresciute in condizioni di normossia e ipossia. Come visibile in **Figura 12**, la trascrizione di Ngn3 è incrementata in maniera significativa già dopo 12 ore di esposizione a bassa tensione di ossigeno, con un aumento massimo dopo 24 ore (circa 11 volte rispetto alle condizioni di normossia), che si mantiene fino alle 72 ore.

Per confermare che i cambiamenti morfologici osservati e l'incrementata espressione di Ngn3 siano realmente correlati alla trans-differenziazione delle cellule in coltura in senso neuroendocrino, abbiamo analizzato l'espressione di tre marker di neurodifferenziazione: la cromogranina A (CGA), l'enolasi specifica neuronale (NSE) e la β 3-tubulina. La proteina CGA è risultata essere espressa a bassissimi livelli nelle cellule LNCaP, rendendo impossibile la sua visualizzazione mediante Western blotting. E' stato invece possibile visualizzare le proteine NSE e β 3-tubulina: cellule esposte a ipossia per 7 giorni hanno mostrato un incremento significativo dei livelli proteici di entrambi i marker (**Figura 13A e 13B**). La proteina NSE è stata analizzata anche mediante immunocitochimica che ha confermato come in ipossia la sua espressione aumenti notevolmente (**Figura 13C**).

L'espressione di una forma dominante negativa di HES-1 favorisce la NED delle cellule LNCaP

Poiché una riduzione dell'espressione del gene HES-1 è implicata nella differenziazione neuroendocrina delle cellule pancreatiche¹⁹¹, abbiamo ipotizzato che la NED delle cellule di carcinoma prostatico in ipossia potesse dipendere dalla ridotta espressione di Hes-1 secondaria alla down regolazione del segnale di Notch 1/2. Pertanto abbiamo studiato gli effetti di un costrutto virale codificante una forma dominante negativa di HES-1 (dnHES-1) sulla neurodifferenziazione delle cellule LNCaP. Un costrutto virale esprime il gene *LacZ* è stato utilizzato come controllo. A 4 giorni dall'infezione virale, abbiamo valutato l'espressione dei marker di NED, Ngn3 e CGA, tramite PCR quantitativa e di NSE e β -tubulina tramite Western blotting. Come mostrato nelle **Figure 14 e 15**, tutti i marker neuroendocrini presi in esame risultano essere sovra-regolati nelle cellule che esprimono dnHES-1 rispetto a quelle infettate con il costrutto di controllo *LacZ*.

Per confermare che l'attuazione del programma di NED correla inversamente con lo stato d'attivazione dei recettori Notch1/2, abbiamo trasdotto le cellule con un costrutto virale esprime una forma costitutivamente attiva del Notch 1 (caN1). A 4 giorni dall'infezione virale abbiamo analizzato i livelli dei marker neuroendocrini, CGA (qPCR), NSE e β -tubulina (Western blotting). Nelle cellule trasdotte con caN1 l'espressione di tutti e 3 i marker si è rivelata sensibilmente ridotta (**Figura 16**).

Modulazione del recettore androgenico in ipossia

Poiché numerosi studi hanno dimostrato che le cellule neuroendocrine del CP sono androgeno-indipendenti¹⁹², abbiamo studiato l'espressione del recettore androgenico (AR) nelle due condizioni sperimentali di normo e ipossia, mediante PCR quantitativa. Come dimostrato in **Figura 17A**, la trascrizione del AR si riduce sensibilmente quando le cellule sono sottoposte a ipossia.

Per valutare se alla ridotta espressione del recettore corrisponde una ridotta sensibilità androgenica, abbiamo effettuato un saggio di proliferazione cellulare durante stimolazione con 5 α -diidrotestosterone (DHT). Come è possibile osservare dal grafico in **Figura 17B**, mentre le cellule LNCaP in condizioni di normossia rispondono in termini proliferativi alla stimolazione con DHT, in ipossia non si osserva alcun incremento della proliferazione. Questi risultati indicano che, a basse tensioni di ossigeno, le cellule diventano insensibili alla stimolazione ormonale.

L'ipossia aumenta la capacità proliferativa delle cellule di CP

Per valutare gli effetti biologici dell'attivazione di Notch 3, abbiamo studiato la proliferazione cellulare, ancoraggio-dipendente ed indipendente, in condizioni di normo e ipossia. Come mostrato in **Figura 18**, l'ipossia è in grado di incrementare la capacità proliferativa delle cellule LNCaP che evidenziano una crescita esponenziale più marcata a bassa tensione di ossigeno, rispetto alla normossia.

Per valutare il ruolo del Notch 3 sulla proliferazione cellulare, per prima cosa abbiamo analizzato gli effetti dell'inibitore della γ -secretasi, DAPT. Come mostrato in **Figura 19A**, cellule LNCaP mantenute in ipossia proliferano più marcatamente, ma il trattamento con il DAPT annulla questo vantaggio nella crescita. Successivamente, abbiamo studiato anche la crescita ancoraggio-indipendente, dimostrando che le cellule in ipossia hanno una maggior capacità di formare colonie in soft agar, colonie che risultano sia di numero che di dimensioni maggiori rispetto a quelle riscontrate in normossia. Anche in questo caso il DAPT ne riduce la capacità di crescita (**Figura 19B**).

Il recettore Notch 3 sostiene la proliferazione delle cellule di CP

Poiché il DAPT inibisce la crescita cellulare e, in ipossia, l'unico recettore che rimane attivo è il Notch 3, abbiamo valutato il ruolo di Notch 3 sulla

proliferazione delle cellule LNCaP a bassa tensione di ossigeno. Per far questo abbiamo silenziato il gene NOTCH3 utilizzando un plasmide retrovirale. Come mostrato in **Figure 20**, la quantità di proteina Notch 3 è severamente ridotta nelle cellule silenziate (siN3), rispetto a quelle di controllo, infettate con sequenze scramble (C). Una volta scelto il clone a maggior grado di silenziamento, abbiamo studiato la crescita cellulare mediante saggi di proliferazione ancoraggio-dipendente ed indipendente. Come già dimostrato precedentemente, in condizioni di ipossia le cellule LNCaP mostrano un vantaggio proliferativo, rispetto alla condizione normossica. Tuttavia, le cellule siN3 sembrano perdere tale vantaggio sia in normossia che in ipossia (**Figura 21**), sia nella condizione di crescita ancoraggio-dipendente che indipendente.

Questi dati suggeriscono che il Notch 3 sostiene la proliferazione cellulare nel nostro modello sperimentale, sia in normossia che in ipossia.

L'espressione di Notch 3 in biopsie umane di carcinoma prostatico correla con il grado di malignità del tumore e di ipossia

Infine, abbiamo studiato il coinvolgimento di Notch 3 nella progressione del carcinoma prostatico, nei tessuti umani. I campioni sono stati analizzati in collaborazione con il Dipartimento di Patologia dell'Università di Siena (Prof.ssa M.T. Del Vecchio). Sono state considerate 94 biopsie di adenocarcinoma a basso grado, 56 ad alto grado e 20 tessuti di controllo (12 atrofie prostatiche e 8 iperplasie delle cellule basali) (**Figure 22 e 23**). L'espressione (HSCORE) del Notch 3 è stata rilevata in 5 di 11 High Grade-PIN adiacenti alle ghiandole trasformate (**22 c, d**), mentre l'espressione più elevata è stata riscontrata nelle neoplasie con un grado di Gleason maggiore (≥ 4 ; 95%), rispetto a quelle di grado inferiore (≤ 3 ; 22%) ($\chi^2 = 124.330$; $p < 0.001$) (**22 e, j**). A conferma del dato precedente, la colorazione maggiore è stata riscontrata in neoplasie con un Gleason score più alto (≥ 4 ; 95%), rispetto a quelle di punteggio inferiore (≤ 7 ; 40%) ($\chi^2 = 43.281$; $p < 0.001$). È da notare anche che i tumori di grado maggiore mostravano nel 90% dei casi una colorazione specificamente nucleare, rispetto a

quelli di grado inferiore (7%) ($p < 0,001$) (**22 e-j**). Questi dati suggeriscono una progressiva espressione ed attivazione del recettore Notch 3 durante la trasformazione e la progressione del tumore verso stadi più avanzati.

L'espressione dei recettori Notch 1 e Notch 2 è stata registrata con una maggiore frequenza nei tessuti rappresentativi di tumori di grado inferiore, indicando una correlazione inversa con la progressione tumorale. Comunque, in tutti i casi la localizzazione era citoplasmatica, indicando una inattività recettoriale (dati non mostrati).

Abbiamo infine valutato il grado di ipossia tissutale nelle diverse biopsie, attraverso la rilevazione della proteina CA IX¹⁹³. Anche in questo caso un HSCORE è stato utilizzato per ottenere una valutazione semi-quantitativa dell'espressione proteica. Come ci si attendeva, i tumori di grado maggiore mostravano una maggior espressione di CA IX (Figura 23). L'analisi statistica ha mostrato inoltre una correlazione diretta, significativa, fra livelli di Notch 3 e CA IX ($p < 0.0001$).

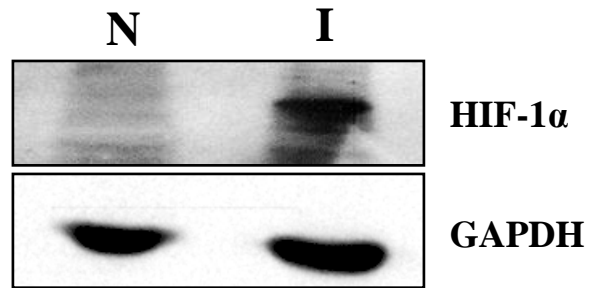
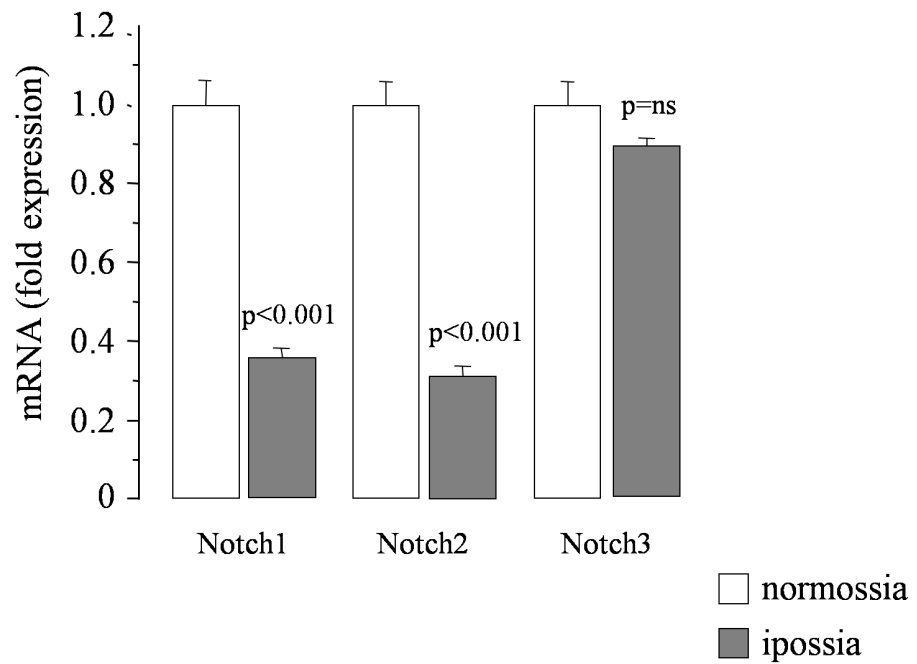


Figura 6 –Western blotting per l’analisi dell’espressione di HIF-1 α in cellule LNCaP cresciute in normossia (N) o in ipossia (I) per 24 ore. I livelli di GAPDH sono stati utilizzati per la normalizzazione della quantità di lisato cellulare.

A.



B.

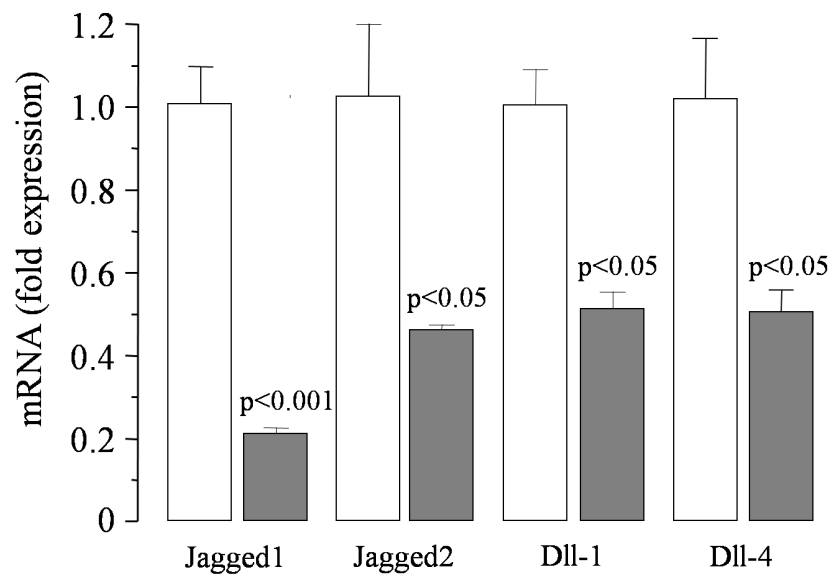


Figura 7 – PCR quantitativa per l'espressione di (A) Notch 1, 2 e 3, (B) Jagged 1 e 2, Delta-like (Dll)-1 e 4 in cellule LNCaP cresciute in condizioni di normossia ed ipossia per 7 giorni. La normalizzazione dei campioni è stata ottenuta mediante determinazione dei livelli di GAPDH. L'esperimento è stato svolto in triplicato. Statistica: t test di Student.

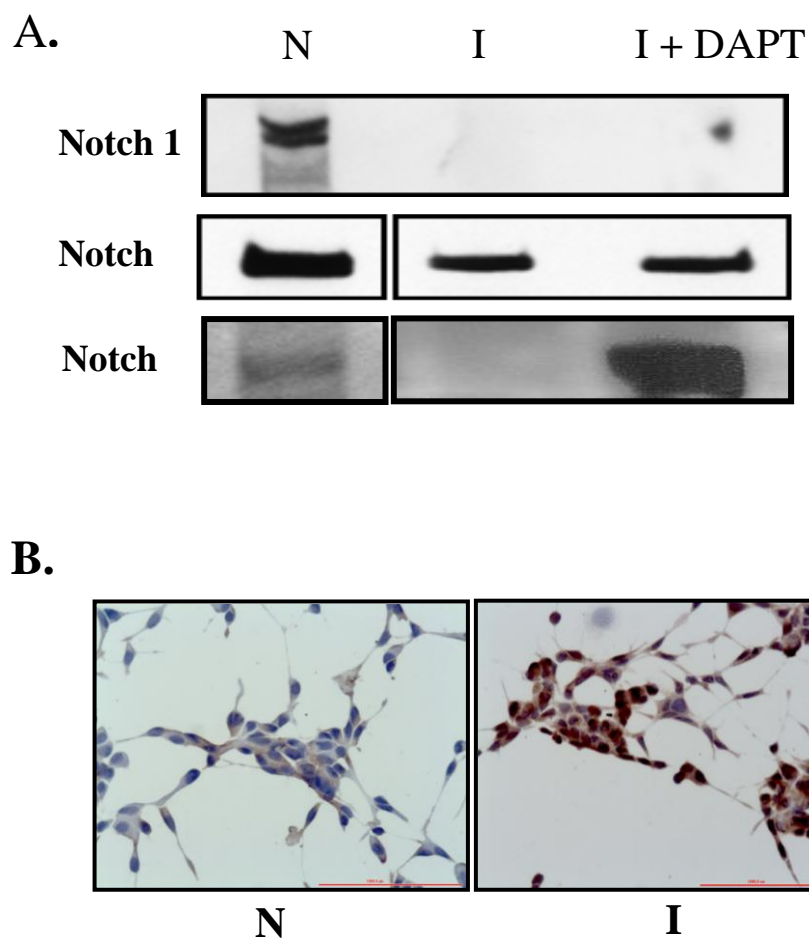


Figura 8 - A. Western blotting delle proteine Notch 1, 2, 3. Il lisato cellulare totale ottenuto da cellule LNCaP cresciute in condizioni di normossia (N), ipossia (I) e ipossia in presenza di DAPT [20 μ M] (I+DAPT) per 7 giorni, è stato analizzato utilizzando anticorpi specifici diretti contro la porzione COOH-terminale delle tre proteine. **B.** Analisi immunocitochimica dell'espressione del recettore Notch 3 in cellule LNCaP mantenute in normossia (N) e ipossia (I) per 7 giorni.

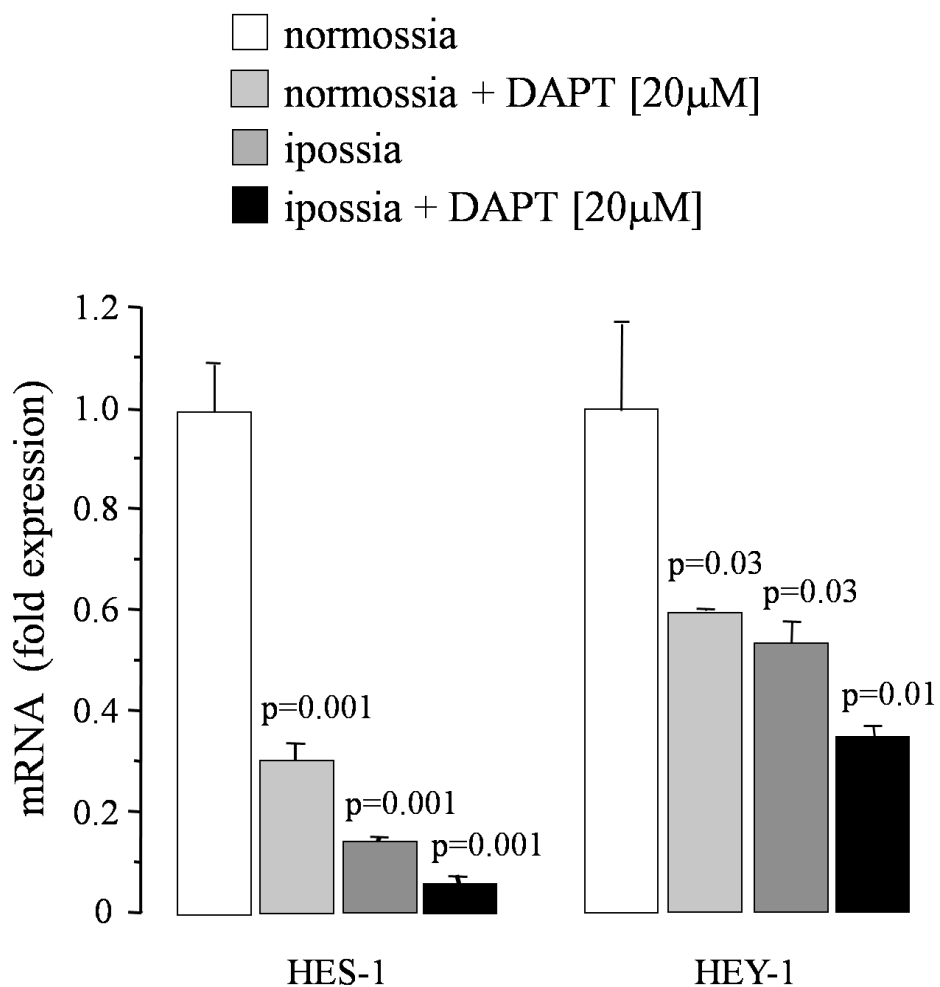


Figura 9 – Real time qPCR per l’espressione di HES-1 e HEY-1 in cellule LNCaP cresciute in condizioni di normossia ed ipossia per 7 giorni, in presenza e assenza di DAPT. La normalizzazione dei campioni è stata ottenuta mediante determinazione dei livelli di GAPDH. La quantità del trascritto in normossia è considerata pari a 1. L’esperimento è stato svolto in triplicato. Statistica: t test di Student.

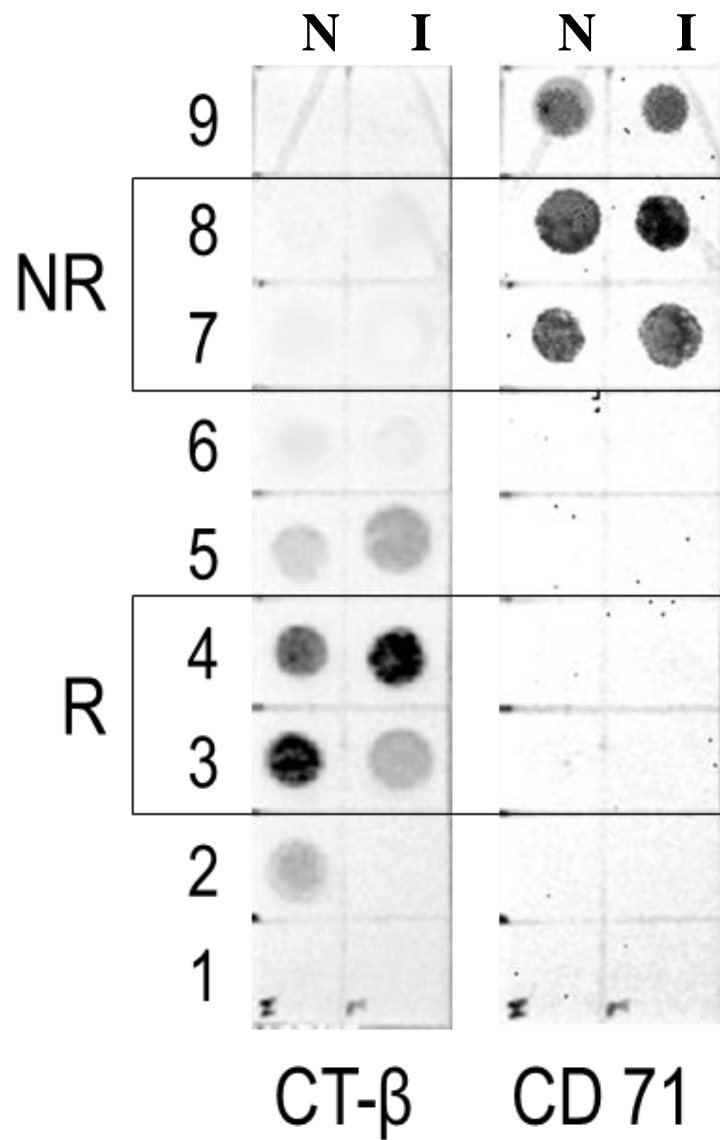


Figura 10A - Isolamento e caratterizzazione delle frazioni raft (R) e non-raft (NR) della membrana plasmatica di cellule LNCaP cresciute in normossia o ipossia per 7 giorni. Le porzioni R sono state identificate mediante positività per la subunità β della tossina colerica (CT- β), mentre quelle NR mediante positività per il CD71.

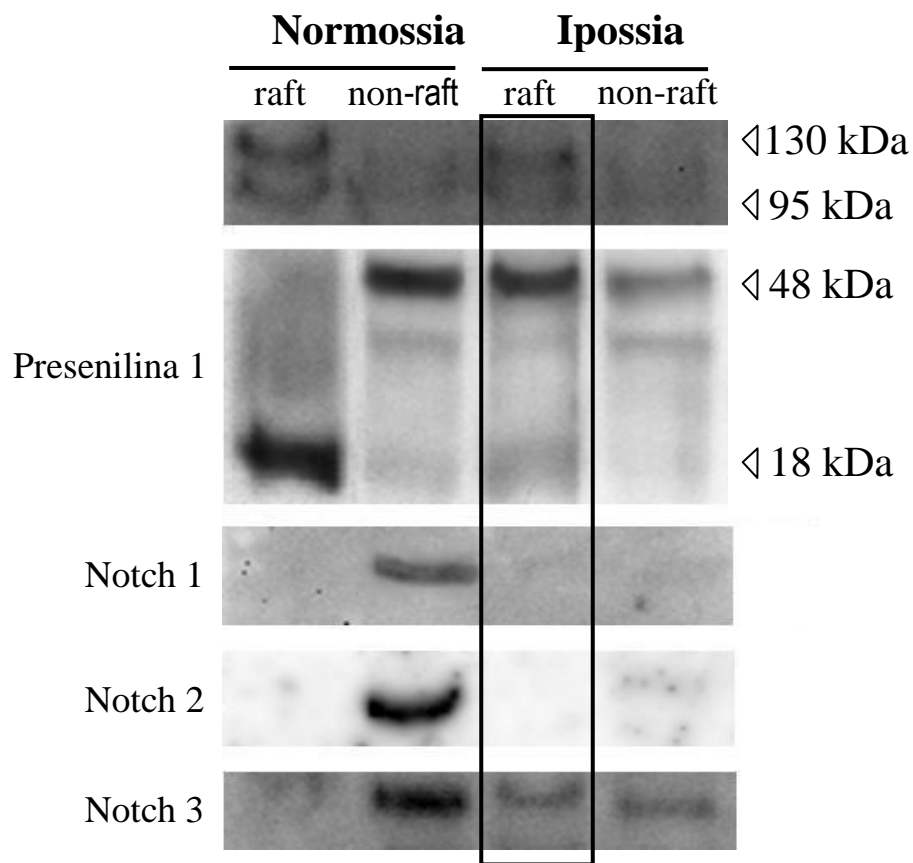
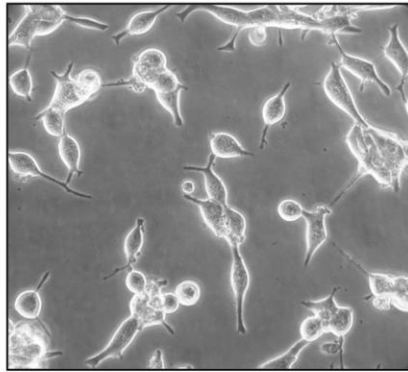
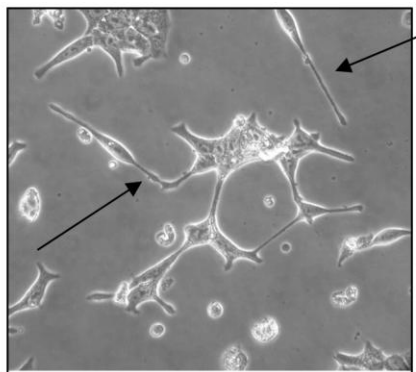


Figura 10B - Isolamento e caratterizzazione delle frazioni raft e non-raft della membrana plasmatica di cellule LNCaP cresciute in normossia o ipossia per 7 giorni. Western blotting per le proteine Nicastrina 1, Presenilina 1, Notch 1, e 3. Il riquadro evidenzia la frazione raft nella quale si osserva la migrazione del recettore Notch 3 in ipossia.

Normossia



Ipossia giorno 7



Ipossia giorno 14

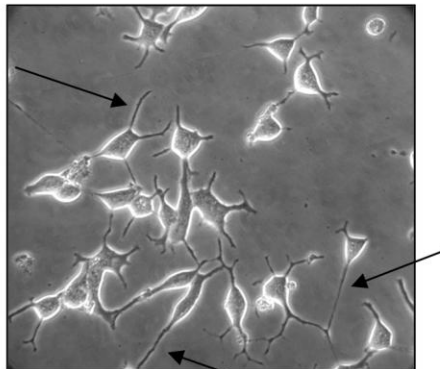


Figura 11 – Cellule LNCaP cresciute in normossia ed ipossia (7 e 14 giorni). Immagini acquisite con microscopio a contrasto di fase. Nelle cellule cresciute a bassa tensione d’ossigeno, si evidenzia un cambiamento morfologico che le rende simili a cellule neuronali. Le frecce indicano la presenza dei processi simil-dendritici.

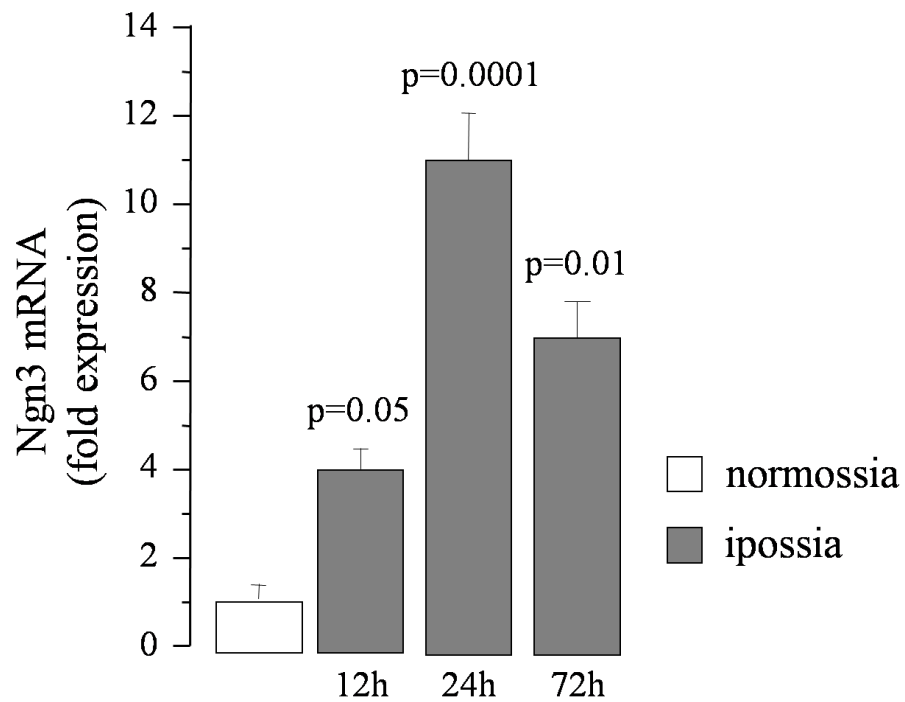


Figura 12 – Espressione di Neurogenina (Ngn) 3 in cellule LNCaP cresciute in condizioni di normossia ed ipossia mediante qPCR. La normalizzazione dei campioni è stata ottenuta mediante determinazione dei livelli di GAPDH. I livelli di espressione di Ngn3 in normossia sono stati considerati pari a 1. L'esperimento è stato svolto in triplicato. Statistica: t test di Student.

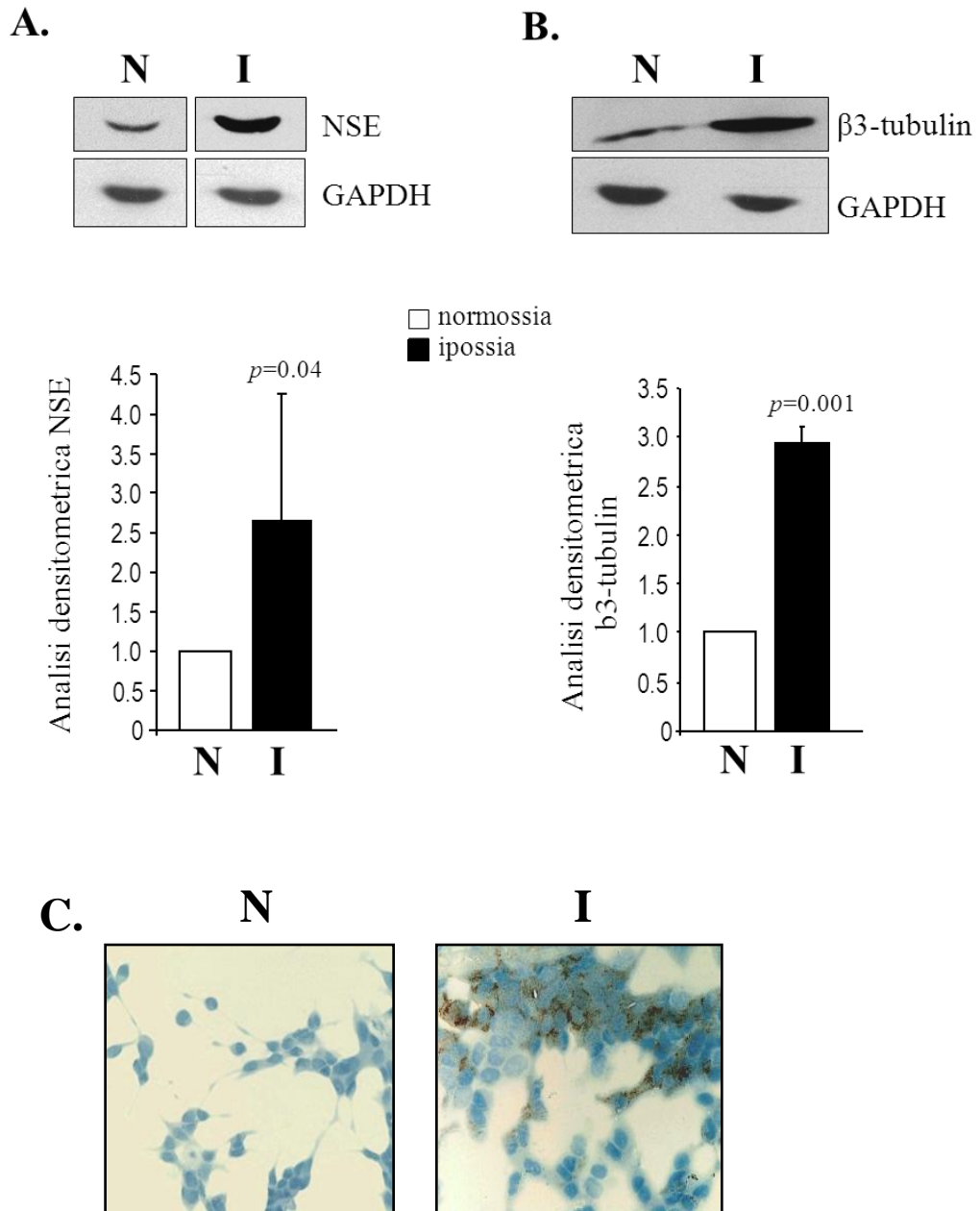


Figura 13 – Western blotting per la visualizzazione delle proteine NSE (A) e β 3-tubulina (B) in cellule LNCaP cresciute in condizioni di normossia ed ipossia per 7 giorni. Per entrambi i blot è riportata l'analisi densitometrica delle bande immunoreattive; i valori sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti separati. Statistica: t test di Student. (C) Visualizzazione della proteina NSE mediante immunocitochimica in cellule cresciute in normossia (N) e ipossia (I) per 2 settimane.

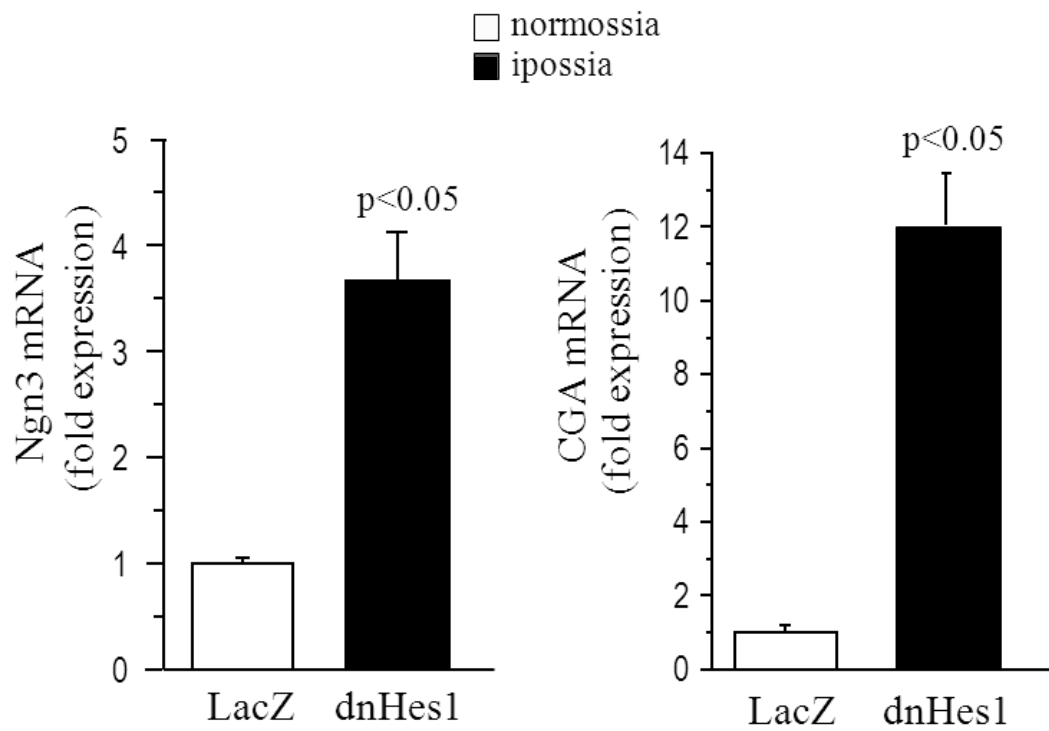


Figura 14 – Cellule infettate con il gene *LacZ* o con la forma dominante negativa (dn) di HES-1. Analisi dell'espressione dei marker neuroendocrini Ngn3 e CGA mediante qPCR.

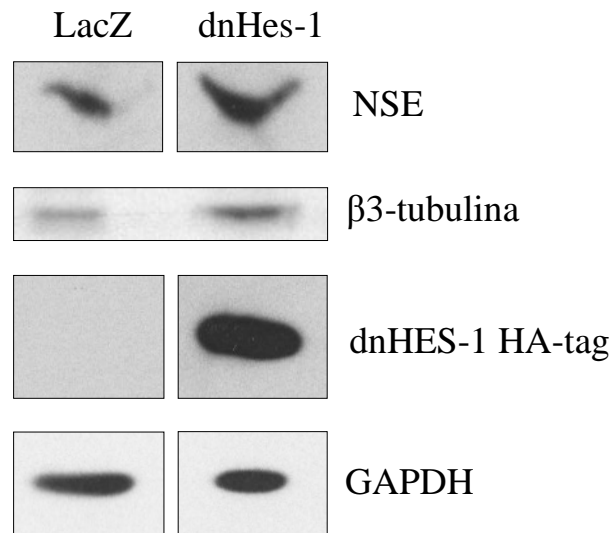
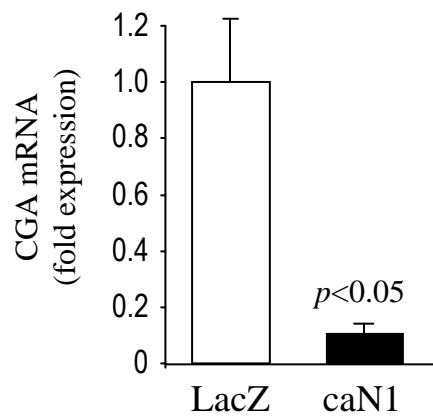


Figura 15 - Cellule LNCaP infettate con il gene *LacZ* o con la forma dnHES-1. Analisi dell'espressione dei marker neuroendocrini NSE e β3-tubulina. Le proteine ottenute dai lisati cellulari totali, a 4 giorni dall'infezione virale, sono state separate mediante SDS-PAGE e visualizzate mediante tecnica di Western blotting. L'anticorpo anti-HA è stato usato per visualizzare la proteina dnHES-1. GAPDH è stata utilizzata come controllo del contenuto proteico.

A.



B.

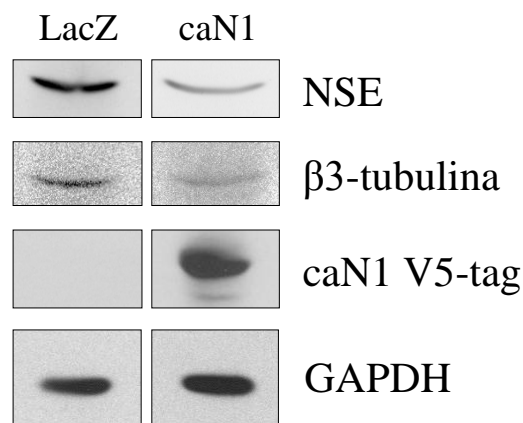
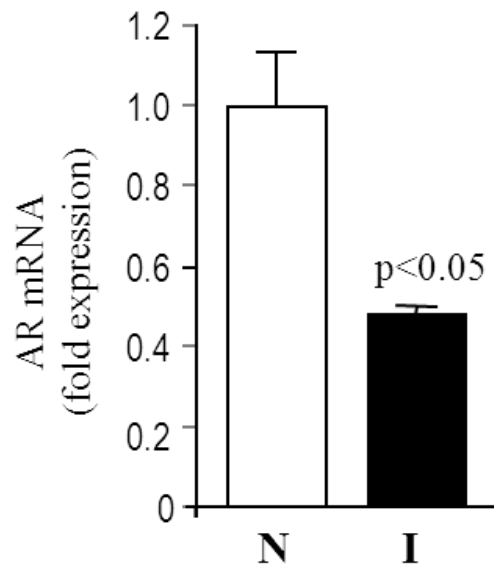


Figura 16 – Cellule LNCaP infettate con il gene *LacZ* o con una forma costitutivamente attiva di Notch 1 (caN1). Analisi dell'espressione dei marker neuroendocrini CGA, NSE e β3-tubulina. **A.** PCR quantitativa per la determinazione dei livelli di CGA mRNA a 4 giorni dall'infezione virale. **B.** Western blotting delle proteine ottenute dai lisati cellulari totali, a 4 giorni dall'infezione virale, separate mediante SDS-PAGE. L'anticorpo anti-V5 è stato usato per visualizzare la proteina caN1. GAPDH è stata utilizzata come controllo del contenuto proteico.

A.



B.

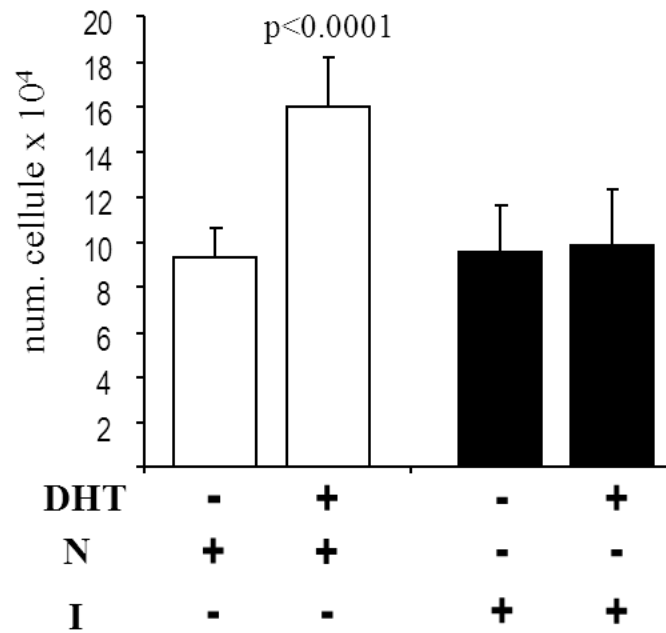


Figura 17 – A. Real time qPCR per la determinazione dei livelli di mRNA del recettore androgenico (AR) in cellule LNCaP cresciute in condizioni di normossia (N) ed ipossia (I) per 7 giorni. **B.** Studio della proliferazione di cellule LNCaP cresciute in N e I, con o senza DHT [10nM], per 7 giorni.

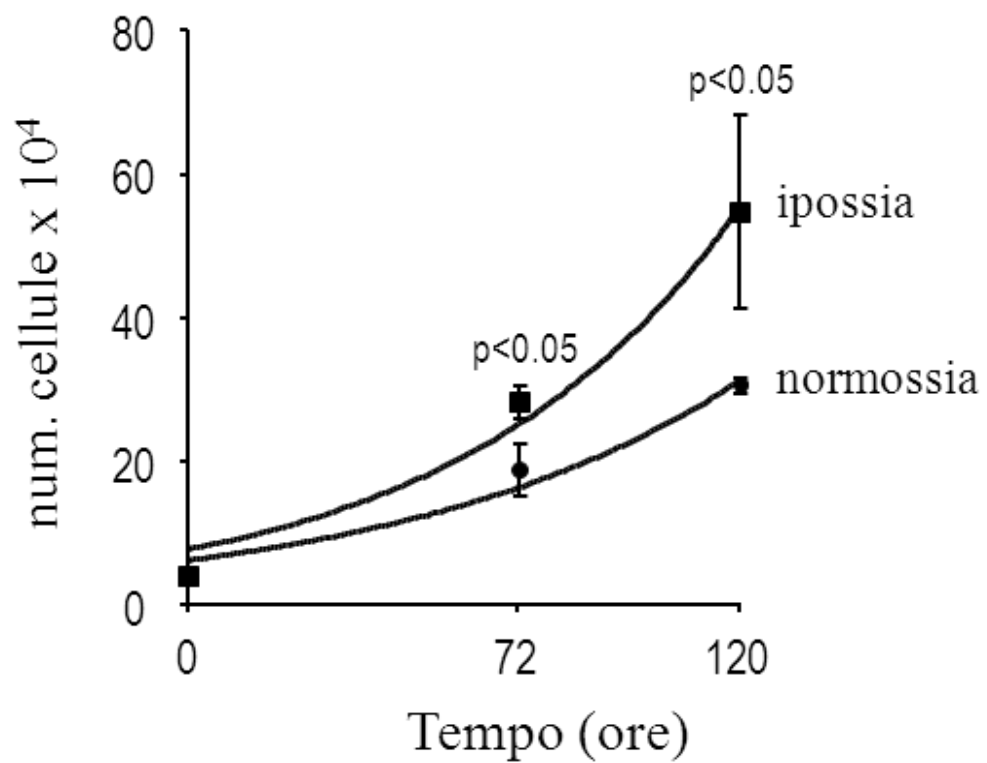
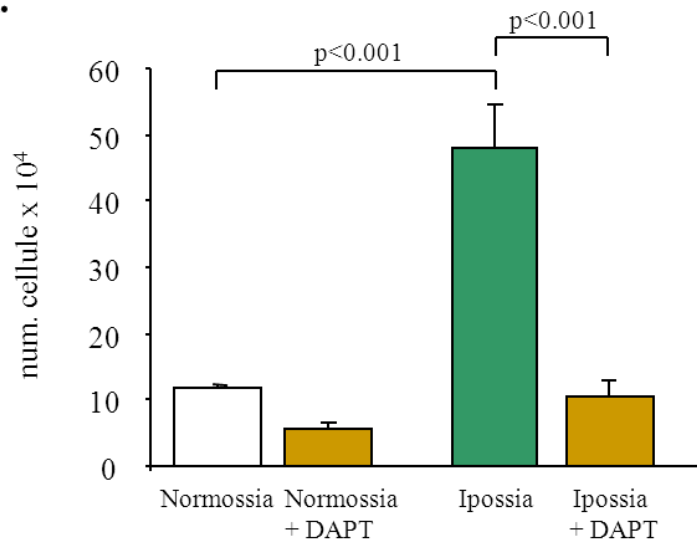


Figura 18 - Studio della proliferazione ancoraggio-dipendente di cellule LNCaP cresciute in normossia e ipossia, analizzata mediante curva di crescita esponenziale. I valori sono espressi come media \pm DS. Statistica: t test di Student.

A.



B.

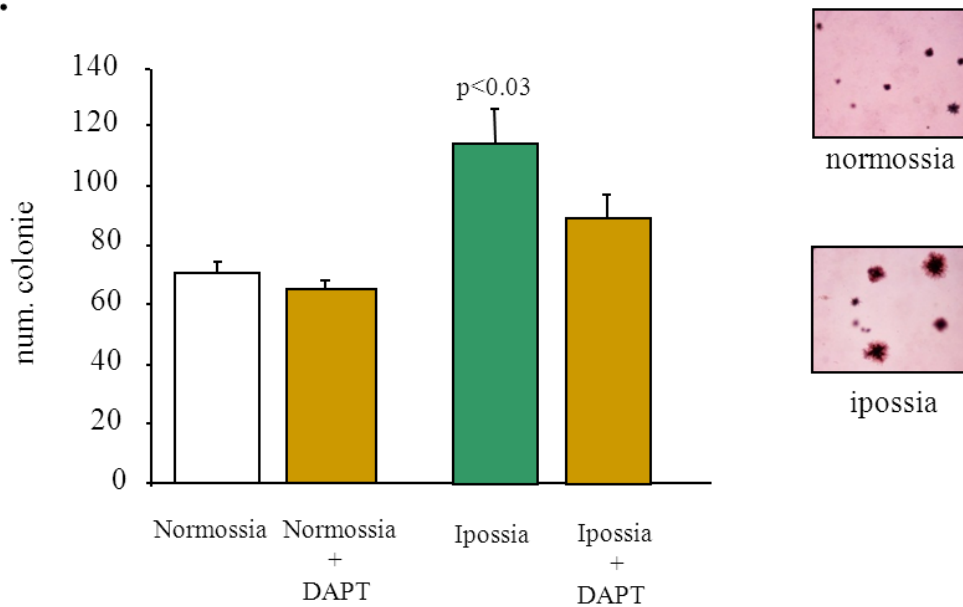


Figura 19 - Studio della proliferazione cellulare ancoraggio-dipendente (**A**) e indipendente (**B**) di cellule LNCaP cresciute in normossia e ipossia, con o senza inibitore della γ -secretasi DAPT [20 μ M]. I valori sono espressi come media \pm DS. Statistica: t test di Student.

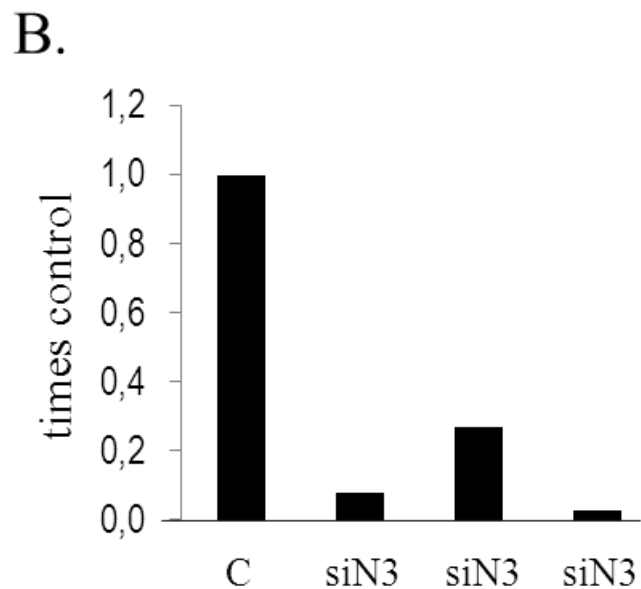
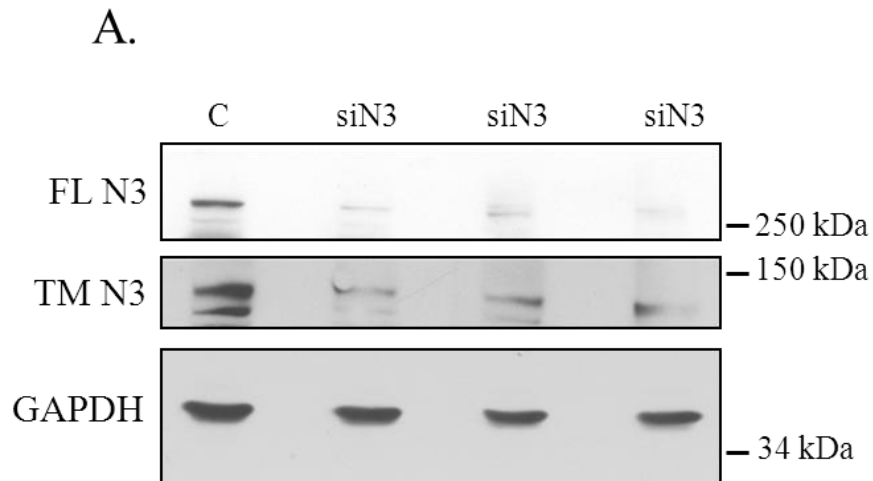


Figura 20 – A. Espressione del recettore Notch 3 FL (full-length) e della forma clivata (transmembrana, TM) in cellule LNCaP trasdotte col siRNA scramble (C) e con il siRNA-Notch 3 (siN3). GAPDH è stata utilizzata come controllo del contenuto proteico. **B.** Analisi densitometrica delle bande relative alla proteina Notch 3 full-length (A) nei 3 diversi cloni silenziati (siN3), rispetto alle cellule scramble di controllo (C); i valori sono normalizzati sull'espressione della proteina GAPDH.

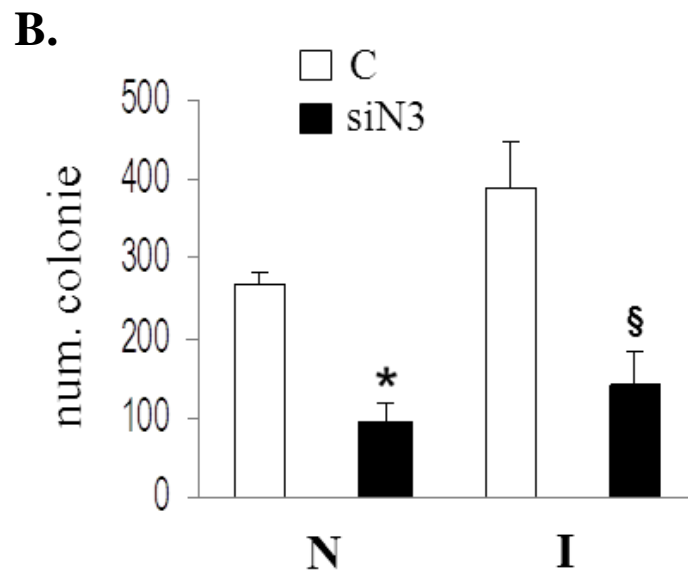
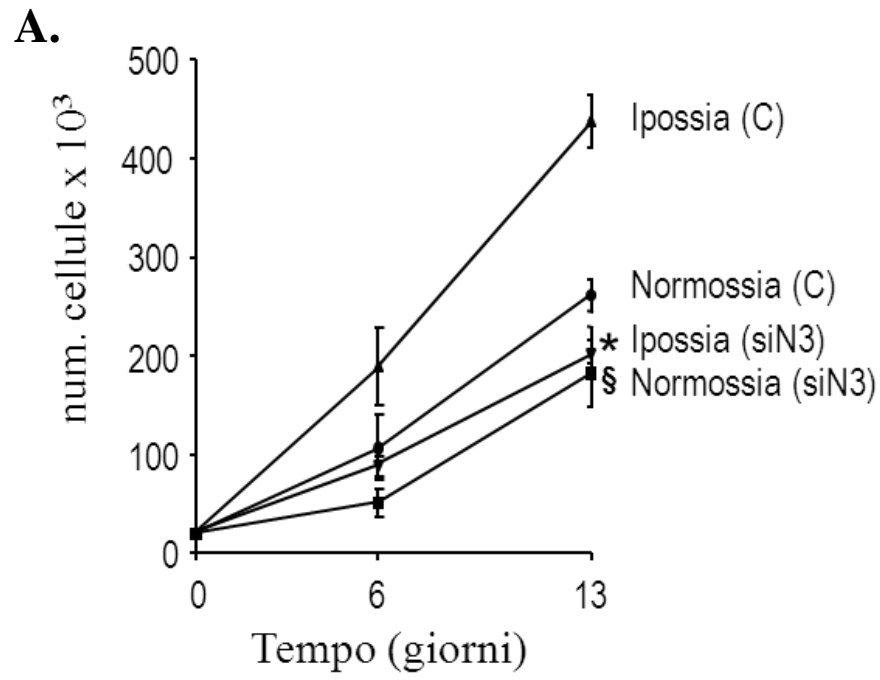


Figura 21 – **A.** Curva di crescita di cellule LNCaP di controllo (C, scramble) e silenziate per Notch 3 (siN3), mantenute in normossia ed in ipossia. **B.** Capacità di formare colonie in soft agar in N e I. Le colonie sono contate dopo tre settimane di crescita.

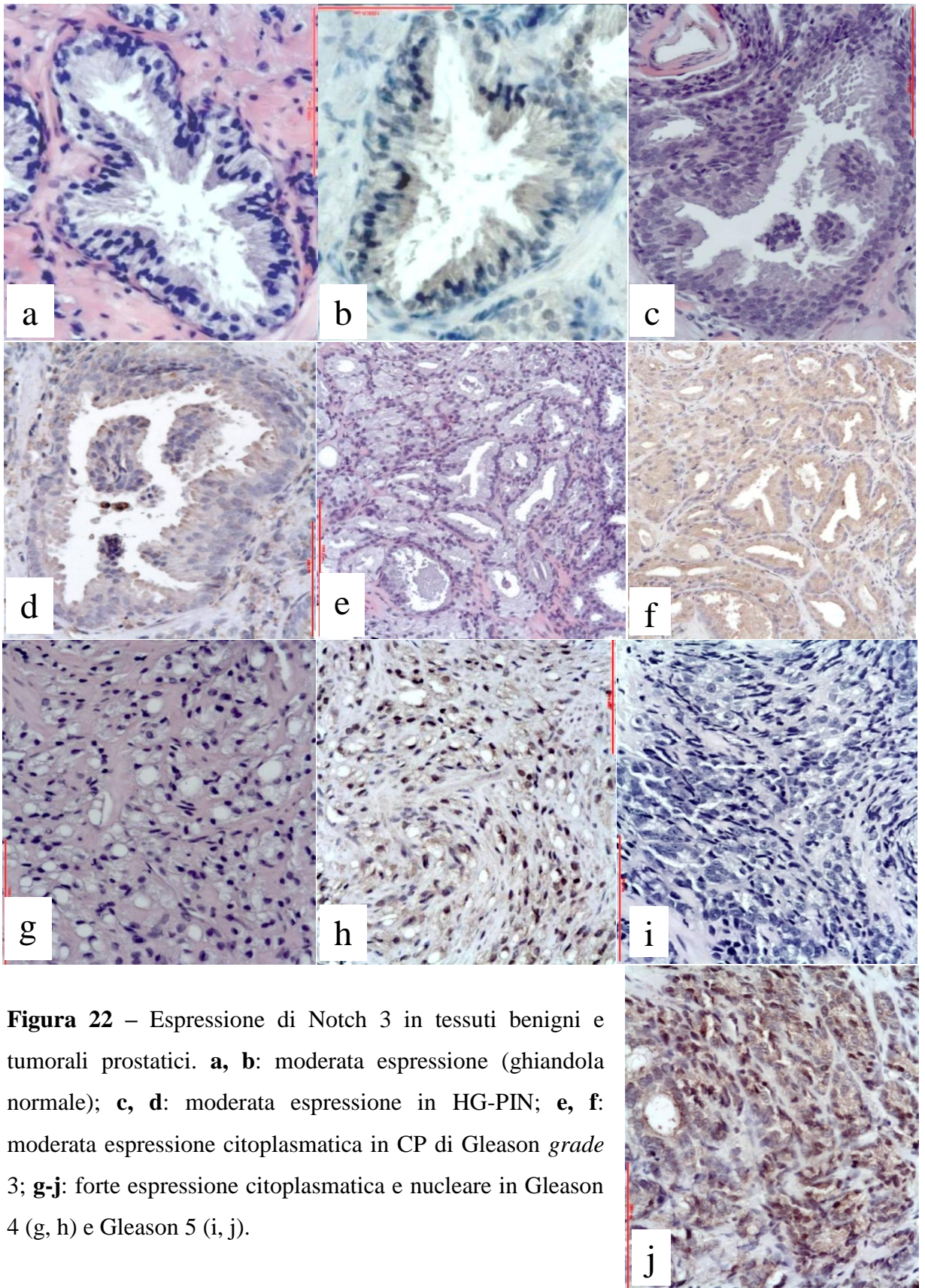


Figura 22 – Espressione di Notch 3 in tessuti benigni e tumorali prostatici. **a, b**: moderata espressione (ghiandola normale); **c, d**: moderata espressione in HG-PIN; **e, f**: moderata espressione citoplasmatica in CP di Gleason *grade* 3; **g-j**: forte espressione citoplasmatica e nucleare in Gleason 4 (g, h) e Gleason 5 (i, j).

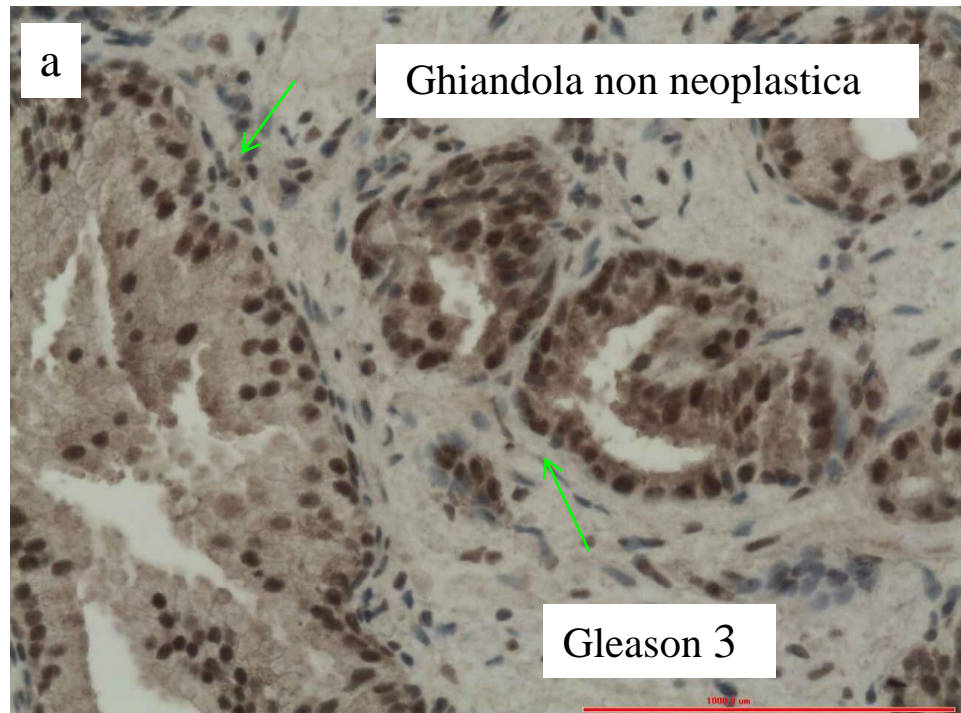
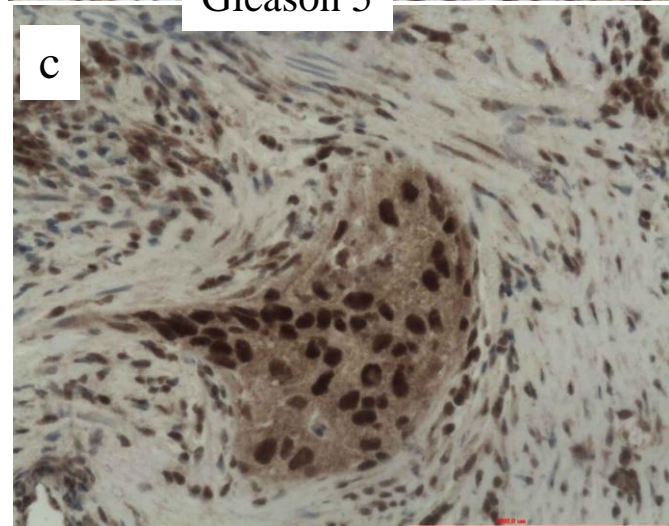
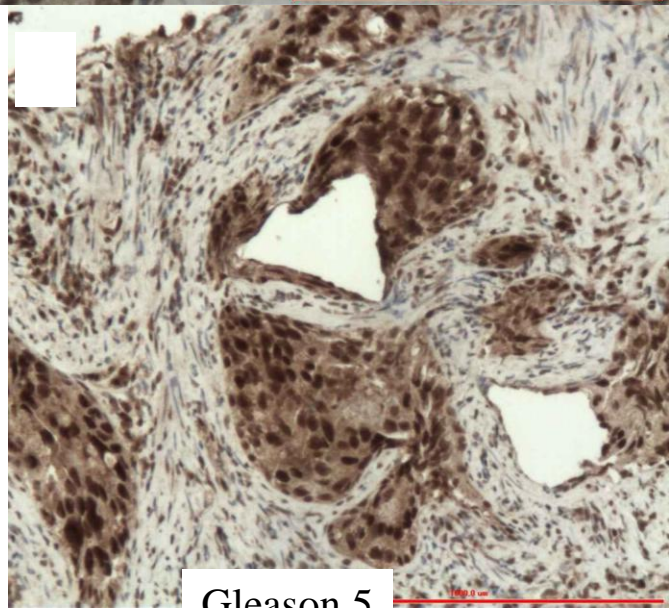


Figura 23 - Espressione di CA IX in tessuti benigni e tumorali prostatici. **a**: ghiandola normale e CP Gleason grade 3; **b, c**: CP di Gleason grade 5, a basso (b) e alto (c) ingrandimento.



DISCUSSIONE

Il CP è solitamente diagnosticato ad uno stadio precoce¹⁹⁴. Tuttavia anche fra i pazienti con diagnosi di malattia localizzata, la prognosi può essere molto diversa, con forme destinate alla metastatizzazione precoce e forme indolenti, scarsamente progressive. La diversa storia naturale della malattia dipende da diversi parametri biochimici e clinici. Uno dei fattori prognostici di maggiore affidabilità, universalmente accettato, è la stadiazione secondo Gleason¹⁸. Inoltre, la sensibilità agli androgeni rimane il determinante d'elezione per definire l'esito della malattia. Tuttavia, oltre alla dipendenza dagli androgeni e allo *status* del recettore androgenico, non sono ancora ben note le vie che, in prima battuta, definiscono la progressione tumorale. In una massa tumorale, la tensione di ossigeno cambia continuamente con l'alternarsi di periodi d'ipossia acuta e di ipossia cronica, in conseguenza dell'alterazione della struttura microvascolare. La massa tumorale risponde all'ipossia già quando la tensione di ossigeno scende al di sotto del 5%, ma si calcola che in alcune regioni del tumore, specie nella porzione centrale, la tensione di ossigeno può scendere al di sotto dell'1%.

Come in molti altri tumori solidi, l'ipossia gioca un ruolo centrale nella progressione e nello sviluppo del tumore prostatico. Regioni ipossiche sono state individuate in campioni di carcinoma prostatico umano, e maggiori livelli di ipossia sembrano correlarsi con un maggior grado di malignità¹⁰³. Il fattore di trascrizione HIF-1 α è sovra-espresso nel carcinoma prostatico in confronto al tessuto ghiandolare sano¹⁹⁵ e questo sembra essere un evento precoce nel processo di carcinogenesi, tanto da suggerire che HIF-1 α possa essere un biomarcatore di lesione premaligna, utile nella diagnosi differenziale con l'ipertrofia prostatica. Inoltre, in un modello di carcinoma prostatico umano *in vitro*, costituito dalla linea cellulare LNCaP, la sovra-espressione di HIF-1 α è in grado di aumentare la capacità invasiva delle cellule e favorirne la trasformazione da un fenotipo epiteliale ad un fenotipo mesenchimale¹⁹⁶. È noto dalla letteratura che nel carcinoma della prostata la differenziazione verso un fenotipo neuroendocrino è legata alla perdita dell'ormono-dipendenza e quindi ad una maggiore aggressività del tumore ed ad una prognosi più infausta. Uno studio recente¹⁹⁷ ha infatti

dimostrato che cellule di carcinoma prostatico trans-differenziate in un fenotipo neuroendocrino, impiantate in topi precedentemente castrati, sostengono la crescita di cellule androgeno-dipendenti impiantate nel fianco opposto. Le cellule neuroendocrine sembrano dunque capaci di supportare la crescita tumorale in modo paracrino, attraverso la secrezione di ormoni e fattori di crescita. In aggiunta, la presenza di cellule neuroendocrine all'interno della massa tumorale favorisce la selezione di cloni ormono-indipendenti.

Per studiare il ruolo dell'ipossia cronica nella progressione del carcinoma della prostata abbiamo utilizzato cellule di carcinoma prostatico umano androgeno-dipendente, le LNCaP, che abbiamo sottoposto ad ipossia (3% di ossigeno) per periodi prolungati (fino a due settimane). La ridotta tensione di ossigeno, utilizzata nei nostri esperimenti, è stata sufficiente ad attivare una risposta ipossica, come dimostrato dall'attivazione del fattore di trascrizione ipossia-dipendente, HIF-1 α .

Il nostro studio dimostra che l'esposizione di cellule di carcinoma prostatico a livelli moderati di ipossia cronica, induce la trans-differenziazione delle cellule in senso neuroendocrino. Infatti i marcatori di differenziazione neuroendocrina quali l'enolasi neuronale specifica (NSE), le tubuline della classe beta3 (β 3-tubulina), la cromogranina A (CGA) e il fattore di trascrizione pro-neuronale neurogenina (Ngn) 3, sono marcatamente aumentati nelle cellule esposte a bassa tensione di ossigeno; tale fenomeno non è soltanto una risposta acuta e transitoria, ma un effetto che si prolunga nel tempo.

Di recente è stato dimostrato che, in alcuni tipi di tumore, grazie all'espressione di HIF-1 α e HIF-2 α , l'ipossia attiva il segnale mediato dai recettori Notch, facilitando la trascrizione genica legata all'interazione fra NIC e CBF¹⁸³. In cellule progenitrici endoteliali, basse tensioni di ossigeno inducono la trascrizione del ligando di Notch, Delta-like 4, e la successiva attivazione del segnale mediato da Notch 1, con trascrizione dei geni target HEY-1 e HEY-2. L'attivazione di questa via di segnale sembra sia responsabile della differenziazione delle cellule progenitrici verso un fenotipo endoteliale maturo¹⁹⁸. Pertanto, è possibile che Notch rappresenti uno degli effettori dell'ipossia anche nel corso dello sviluppo di una massa tumorale. Questa ipotesi ha trovato già una conferma nello studio del melanoma: Bedogni *et al.* hanno dimostrato che l'ipossia attiva la via di segnale intracellulare mediata dal recettore Notch 1 in vari modelli cellulari di melanoma,

attraverso la stabilizzazione del fattore HIF-1 α , e che tale attivazione è responsabile del mantenimento della proliferazione cellulare e del conferimento alla cellula tumorale di una maggior resistenza all'apoptosi¹⁹⁹. Anche i ben noti effetti della bassa tensione di ossigeno sulla capacità invasiva e di metastatizzazione dei tumori solidi sarebbero stati attribuiti, almeno in parte, alla via di segnale di Notch, in grado di tradurre lo stimolo ipossico in transizione epitelio-mesenchimale (EMT), con aumento di mobilità ed invasività¹⁸⁵.

Quando abbiamo testato l'effetto dell'ipossia sulla via di segnale di Notch nel nostro modello sperimentale di carcinoma prostatico, abbiamo rilevato una inattesa e marcata down-regolazione della trascrizione e traduzione dei recettori Notch 1 e Notch 2, mentre i livelli di Notch 3 risultavano non modificati in maniera significativa (il recettore Notch 4 era espresso in quantità trascurabile nelle nostre cellule). Anche i ligandi, dei quali i più rappresentati a livello di RNA messaggero erano Jagged 1 e Jagged 2, mostravano una netta riduzione in ipossia rispetto alla normossia. Inoltre, cellule LNCaP esposte al 3% di ossigeno, riducevano l'espressione di mRNA per HES-1 e HEY-1, due noti geni target di Notch 1 e Notch 2, il che dimostra che alla riduzione della trascrizione dei due recettori corrisponde una riduzione della loro attivazione.

Per quanto riguarda Notch 3, abbiamo dimostrato che, al contrario di Notch 1 e 2, l'ipossia induce attivazione del recettore. Ulteriori studi saranno necessari per comprendere a pieno la funzione biologica di Notch 3 nel carcinoma prostatico. E' riportato in letteratura che i geni target attivati da Notch 3 sono diversi da quelli attivati da Notch 1 e 2²⁰⁰, il che spiega la down-regolazione di HES-1 ed HEY-1 osservata nel nostro sistema sperimentale anche a fronte di una attivazione di Notch 3.

Il recettore Notch è uno dei maggiori regolatori dello sviluppo neuronale, attraverso il ben noto meccanismo dell'inibizione laterale, dove una cellula che si differenzia verso la linea neuronale esprime fattori di trascrizione della famiglia Ngn che, a loro volta, inducono l'espressione dei ligandi di Notch. L'espressione dei ligandi attiva i recettori Notch sui neuroblasti adiacenti, portando alla trascrizione dei geni HES che inibiscono la differenziazione neuronale. Questo meccanismo mantiene le cellule in uno stato indifferenziato: pertanto le cellule che si trovano in prossimità dei neuroblasti appena formati, non vanno incontro a differenziazione neuronale e mantengono uno stato pluripotente. È stato

dimostrato che HES-1 in particolare gioca un ruolo centrale nel sopprimere la differenziazione delle cellule staminali neuronali²⁰¹²⁰².

Recentemente alcuni studi hanno avanzato l'ipotesi che la via di segnale di Notch sia implicata anche nella determinazione del destino delle cellule pancreatiche esocrine ed endocrine, con un meccanismo simile all'inibizione laterale: le cellule che vanno verso una differenziazione endocrina esprimono Ngn3 e forzano le cellule vicine a non adottare un fenotipo endocrino²⁰³; queste diventeranno le cellule esocrine del pancreas.

Possiamo pertanto ipotizzare che quanto osservato nel nostro sistema sperimentale si avvicini al meccanismo descritto nello sviluppo della ghiandola pancreatica e dunque che esista una correlazione fra trans-differenziazione neuroendocrina delle cellule di carcinoma prostatico in ipossia e attenuazione del segnale mediato dai recettori Notch 1 e Notch 2. Infatti, quando abbiamo trattato le cellule LNCaP con un inibitore della γ -secretasi, il DAPT, in condizioni di normossia, l'espressione dei marcatori di neurodifferenziazione è aumentata in maniera significativa. Di conseguenza si può ipotizzare che la modulazione della via di segnale di Notch, che si identifica con la down-regolazione in ipossia dell'espressione di Notch 1 e Notch 2 e con l'attivazione di Notch 3, possa essere responsabile del cambiamento verso un fenotipo neuroendocrino. In effetti, nonostante che il recettore Notch 3 sia stato studiato in maniera molto più limitata dei recettori Notch 1 e Notch 2, è riportato in letteratura che, in alcuni contesti cellulari, l'attivazione di Notch 3 sia legata all'inibizione di Notch 1, grazie ad un meccanismo di "sequestro" da parte della porzione attiva di Notch 3 (NIC3), dei fattori nucleari che regolano la trascrizione dei geni target di Notch 1²⁰⁴. Quindi nel nostro sistema sperimentale, l'attivazione di Notch 3 in ipossia potrebbe convergere con la down-regolazione di Notch 1 e Notch 2 per assicurarne silenziamento funzionale.

Se è vero che la modulazione del segnale di Notch agisce sulla neurodifferenziazione delle cellule di carcinoma prostatico come descritto nello sviluppo della ghiandola pancreatica, allora la down-regolazione del fattore di trascrizione HES-1 è il segnale che dà origine al programma di transdifferenziazione cellulare. In effetti, quando abbiamo infettato le cellule di carcinoma prostatico con un costrutto virale codificante per una forma dominante negativa di HES-1, abbiamo osservato una sovra-regolazione dei marcatori di

neurodifferenziazione. Alla luce di questi risultati, possiamo dunque suggerire che l'attenuazione della via di segnale mediata dai recettori Notch 1 e 2 in ipossia, con down-regolazione del gene target HES-1, sia il principale responsabile dello switch neuroendocrino nelle cellule LNCaP.

Questi dati ampliano le nostre conoscenze alla differenziazione neuroendocrina del carcinoma prostatico e sono in accordo con alcune osservazioni preliminari presenti in letteratura. In oltre 80 campioni di CP umano, raggruppati in base al livello di espressione di GCA, la proteina achaete-scute homolog-1 (hASH-1), che è regolata negativamente dalla via di segnale di Notch, è risultata più espressa in campioni con maggior differenziazione neuroendocrina²⁰⁵.

Diverse pubblicazioni indicano che le cellule neuroendocrine del CP non esprimono il recettore androgenico¹⁹². Quando le cellule LNCaP sono cresciute in ipossia, si apprezza un'importante sotto-regolazione del recettore androgenico. Abbiamo potuto anche constatare, mediante saggi funzionali, che le cellule LNCaP stimulate con DHT, in ipossia, non mostrano il vantaggio proliferativo che acquisiscono quando vengono stimulate in condizioni di normossia. In tale scenario è possibile che l'attenuazione della via di segnale di Notch registrata in ipossia, possa promuovere non solo la NED ma anche indurre la riduzione dell'espressione del recettore androgenico, promuovendo l'ormono-indipendenza. Coerentemente con il nostro modello, l'espressione dell'AR sembrerebbe avere un profilo speculare rispetto all'espressione dei recettori Notch 1 e Notch 3. In tal senso, cellule LNCaP infettate con il NIC1, condizione in cui non viene attivato il programma di NED, mostrano livelli di mRNA del recettore androgenico aumentati, suggerendo una diretta correlazione fra i due.

Dati ancora preliminari, ottenuti nel nostro laboratorio, suggeriscono che esiste una correlazione (inversa) anche fra espressione del Notch 3 e recettore androgenico. Infatti, cellule KO per Notch 3 mostrano una sovra-regolazione del recettore androgenico. È ancora sotto studio se all'aumento di quantità del recettore corrisponda, anche qualitativamente, un ripristino dell'attività segnalatoria recettoriale.

Come mostrato dal nostro studio, cellule LNCaP silenziate per il Notch 3 non solo perdono il vantaggio proliferativo indotto dall'ipossia, ma proliferano in misura minore anche in normossia. Tuttavia, tali risultati sono evidenti nella linea LNCaP, mentre nelle cellule androgeno-indipendenti PC-3 e DU145, l'attivazione

di Notch 3 è massima sia normossia che ipossia, e l'ipossia non comporta un ulteriore vantaggio proliferativo. Ciò suggerisce che la presenza di un recettore Notch 3 attivato possa spingere il tumore verso un fenotipo più aggressivo.

In uno studio recente¹⁸⁸ è stato estratto ed analizzato il trascrittoma di 70 prostatectomie radicali, al fine di stilare differenze nel profilo genico dei diversi pazienti affetti da CP. Il gene Notch 3 è stato individuato essere fra i 10 geni correlati alle recidive. Nel nostro studio abbiamo trovato che, oltre all'espressione del gene, anche la proteina correla con i tessuti provenienti da tumori più aggressivi e che in questi casi l'espressione risulta essere nucleare.

L'attivazione di Notch 3 in ipossia sembra essere guidata da cambi conformazionali a carico di microdomini lipidici di membrana. L'analisi effettuata mediante microscopia confocale e frazionamento delle membrane cellulari ha dimostrato che in condizioni di basse tensioni d'ossigeno la composizione dei raft lipidici si modifica profondamente, forse anche grazie alla modificazione del contenuto di colesterolo di membrana, e il recettore Notch 3 trasloca dalle porzioni non-raft in quelle raft, dove risiede l'enzima γ -secretasi. In tali compartimenti avviene quindi il clivaggio e l'attivazione del dominio intracitoplasmatico (NIC) del Notch 3, che può traslocare nel nucleo attivando il programma trascrizionale.

I risultati dell'analisi dei recettori Notch nel CP potrebbero suggerire la possibilità di terapie adiuvanti Notch-mirate, specie nelle forme refrattarie alla castrazione. Negli ultimi anni sono in via di sviluppo terapie atte a bloccare la via di segnale mediata dai recettori Notch attraverso l'uso di inibitori più o meno selettivi delle γ -secretasi²⁰⁶. Tuttavia occorre studiare in maniera approfondita i differenti ruoli esercitati dai diversi recettori Notch. Se, infatti, l'inibizione di Notch 3 può contrastare l'insorgenza di tumori più aggressivi, inibire al contempo i Notch 1 e 2 potrebbe, portare ad un maggior grado di NED, di per sé motivo di progressione tumorale.

Infine, valutare l'espressione del Notch 3 in biopsie di PC localizzato, potrebbe rivelarsi utile per identificare quei tumori con una prognosi peggiore che richiedono terapie più aggressive.

BIBLIOGRAFIA

1. Komiya, A., *et al.* Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int J Urol* **16**, 37-44 (2009).
2. Wheather, P. *Istologia e anatomia microscopica : testo atlante*, (Ambrosiana, Milano, 2001).
3. Haas, G.P., Delongchamps, N., Brawley, O.W., Wang, C.Y. & de la Roza, G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* **15**, 3866-3871 (2008).
4. Bonadonna, G. *Medicina Oncologica*, (Elsevier Masson, Milano, 2007).
5. Inghelmann, R., *et al.* Regional estimates of prostate cancer burden in Italy. *Tumori* **93**, 380-386 (2007).
6. Crocetti, E., Ciatto, S., Buzzoni, C. & Zappa, M. Prostate cancer incidence rates have started to decrease in central Italy. *J Med Screen* **17**, 50-51.
7. Gronberg, H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* **361**, 859-864 (2003).
8. P. Gallo, G.D.A. *Anatomia Patologica, La sistematica*, (UTET, 2008).
9. Giovannucci, E., Liu, Y., Platz, E.A., Stampfer, M.J. & Willett, W.C. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* **121**, 1571-1578 (2007).
10. W. G. Nelson, A.M.D.M., W. B. Isaacs. Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* **4**, 366-381 (2003).
11. Gann, P.H., *et al.* Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* **59**, 1225-1230 (1999).
12. Dagnelie, P.C., Schuurman, A.G., Goldbohm, R.A. & Van den Brandt, P.A. Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *BJU Int* **93**, 1139-1150 (2004).
13. Pandey, M. & Gupta, S. Green tea and prostate cancer: from bench to clinic. *Front Biosci (Elite Ed)* **1**, 13-25 (2009).

14. Smith, J.R., *et al.* Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**, 1371-1374 (1996).
15. Brooks, J.D., *et al.* CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 531-536 (1998).
16. Mariuzzi, G.M. *Anatomia Patologica con correlazioni anatomo-cliniche*, (Piccin, 2006).
17. Balk, S.P., Ko, Y.J. & Bubley, G.J. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* **21**, 383-391 (2003).
18. Gleason, D.F. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* **23**, 273-279 (1992).
19. L. Sobin, M.G., e C. Wittekind. *TNM Classification of Malignant Tumors*. (ed. Wiley-Blackwell) (2009).
20. Christofori, G. New signals from the invasive front. *Nature* **441**, 444-450 (2006).
21. van der Pluijm, G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone* **48**, 37-43 (2011).
22. Kwok, W.K., *et al.* Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* **65**, 5153-5162 (2005).
23. Dionigi, R. *Chirurgia*, (Masson, Milano, 2006).
24. Minelli, A., Bellezza, I., Conte, C. & Culig, Z. Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer? *Biochim Biophys Acta* **1795**, 83-91 (2009).
25. Jemal, A., *et al.* Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* **57**, 43-66 (2007).
26. Bokov, A., Chaudhuri, A. & Richardson, A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* **125**, 811-826 (2004).
27. Feng, Z., Hu, W., Rajagopal, G. & Levine, A.J. The tumor suppressor p53: cancer and aging. *Cell Cycle* **7**, 842-847 (2008).
28. Yamamoto, H., Schoonjans, K. & Auwerx, J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol* **21**, 1745-1755 (2007).
29. Huffman, D.M., *et al.* SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res* **67**, 6612-6618 (2007).

30. Mehraein-Ghomi, F., *et al.* JunD mediates androgen-induced oxidative stress in androgen dependent LNCaP human prostate cancer cells. *Prostate* **68**, 924-934 (2008).
31. Hendriksen, P.J., *et al.* Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer. *Cancer Res* **66**, 5012-5020 (2006).
32. Sampson, N., Untergasser, G., Plas, E. & Berger, P. The ageing male reproductive tract. *J Pathol* **211**, 206-218 (2007).
33. Raynaud, J.P. Testosterone deficiency syndrome: treatment and cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol* **114**, 96-105 (2009).
34. Bruckheimer, E.M. & Kyprianou, N. Bcl-2 antagonizes the combined apoptotic effect of transforming growth factor-beta and dihydrotestosterone in prostate cancer cells. *Prostate* **53**, 133-142 (2002).
35. Bao, B.Y., Ting, H.J., Hsu, J.W. & Lee, Y.F. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* **122**, 2699-2706 (2008).
36. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
37. Bhowmick, N.A., *et al.* TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* **303**, 848-851 (2004).
38. Olumi, A.F., *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* **59**, 5002-5011 (1999).
39. Stewart, D.A., Cooper, C.R. & Sikes, R.A. Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol* **2**, 2 (2004).
40. Dean, J.P. & Nelson, P.S. Profiling influences of senescent and aged fibroblasts on prostate carcinogenesis. *Br J Cancer* **98**, 245-249 (2008).
41. Hansson, J. & Abrahamsson, P.A. Neuroendocrine pathogenesis in adenocarcinoma of the prostate. *Ann Oncol* **12 Suppl 2**, S145-152 (2001).
42. di Sant'Agnese, P.A. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* **70**, 254-268 (1992).
43. Abrahamsson, P.A. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer* **6**, 503-519 (1999).

44. Bonkhoff, H. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Suppl* **8**, 18-22 (1998).
45. Rumpold, H., *et al.* Neuroendocrine differentiation of human prostatic primary epithelial cells in vitro. *Prostate* **53**, 101-108 (2002).
46. Cohen, R.J., Gleason, G., Haffjee, Z. & Afrikan, D. Prostatic carcinoma: histological and immunohistological factors affecting prognosis. *Br J Urol* **66**, 405-410 (1990).
47. di Sant'Agnese, P.A. Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol* **23**, 287-296 (1992).
48. Daneshmand, M.L.Q., Jacek Pinski. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer *Cancer Therapy* **3**, 383-396 (2005).
49. di Sant'Agnese, P.A. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: an update. *Prostate Suppl* **8**, 74-79 (1998).
50. Abrahamsson, P.A. & di Sant'Agnese, P.A. Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *J Androl* **14**, 307-309 (1993).
51. Cox, M.E., Deeb, P.D., Lakhani, S. & Parsons, S.J. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res* **59**, 3821-3830 (1999).
52. Yuan, T.C., Veeramani, S. & Lin, M.F. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* **14**, 531-547 (2007).
53. Bonkhoff, H., Stein, U. & Remberger, K. Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Hum Pathol* **26**, 167-170 (1995).
54. Sun, Y., Niu, J. & Huang, J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res* **1**, 148-162 (2009).
55. Sciarra, A., *et al.* Neuroendocrine differentiation in human prostate tissue: is it detectable and treatable? *BJU Int* **91**, 438-445 (2003).
56. Casella, R., *et al.* Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. *J Urol* **160**, 406-410 (1998).

57. Palmgren, J.S., Karavadia, S.S. & Wakefield, M.R. Unusual and underappreciated: small cell carcinoma of the prostate. *Semin Oncol* **34**, 22-29 (2007).
58. Tarjan, M. Prognostic significance of focal neuroendocrine differentiation in prostate cancer: cases with autopsy-verified cause of death. *Indian J Urol* **26**, 41-45 (2010).
59. Abrahamsson, P.A. Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl* **6**, 3-8 (1996).
60. Wang, Q., Horiatis, D. & Pinski, J. Interleukin-6 inhibits the growth of prostate cancer xenografts in mice by the process of neuroendocrine differentiation. *Int J Cancer* **111**, 508-513 (2004).
61. Yuan, T.C., *et al.* Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocr Relat Cancer* **13**, 151-167 (2006).
62. Shen, R., *et al.* Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. *Urol Oncol* **3**, 67-75 (1997).
63. Wang, Q., Horiatis, D. & Pinski, J. Inhibitory effect of IL-6-induced neuroendocrine cells on prostate cancer cell proliferation. *Prostate* **61**, 253-259 (2004).
64. Chiao, J.W., Hsieh, T.C., Xu, W., Sklarew, R.J. & Kancherla, R. Development of human prostate cancer cells to neuroendocrine-like cells by interleukin-1. *Int J Oncol* **15**, 1033-1037 (1999).
65. Kim, J., Adam, R.M. & Freeman, M.R. Activation of the Erk mitogen-activated protein kinase pathway stimulates neuroendocrine differentiation in LNCaP cells independently of cell cycle withdrawal and STAT3 phosphorylation. *Cancer Res* **62**, 1549-1554 (2002).
66. Danza, G., *et al.* Notch signaling modulates hypoxia-induced neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* **10**, 230-238 (2012).
67. Qi, J., *et al.* Siah2-dependent concerted activity of HIF and FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype and neuroendocrine prostate tumors. *Cancer Cell* **18**, 23-38 (2010).

68. Deng, X., *et al.* Ionizing radiation induces neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells in vitro, in vivo and in prostate cancer patients. *Am J Cancer Res* **1**, 834-844 (2011).
69. Deng, X., *et al.* Ionizing radiation induces prostate cancer neuroendocrine differentiation through interplay of CREB and ATF2: implications for disease progression. *Cancer Res* **68**, 9663-9670 (2008).
70. Johannessen, M. & Moens, U. Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Front Biosci* **12**, 1814-1832 (2007).
71. Wu, C. & Huang, J. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *J Biol Chem* **282**, 3571-3583 (2007).
72. Xiao, D., Qu, X. & Weber, H.C. GRP receptor-mediated immediate early gene expression and transcription factor Elk-1 activation in prostate cancer cells. *Regul Pept* **109**, 141-148 (2002).
73. Festuccia, C., *et al.* In vitro regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *Int J Cancer* **75**, 418-431 (1998).
74. Nagakawa, O., Ogasawara, M., Murata, J., Fuse, H. & Saiki, I. Effect of prostatic neuropeptides on migration of prostate cancer cell lines. *Int J Urol* **8**, 65-70 (2001).
75. Ritchie, C.K., Thomas, K.G., Andrews, L.R., Tindall, D.J. & Fitzpatrick, L.A. Effects of the calcitropic peptides calcitonin and parathyroid hormone on prostate cancer growth and chemotaxis. *Prostate* **30**, 183-187 (1997).
76. Grobholz, R., *et al.* Correlation between neovascularisation and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract* **196**, 277-284 (2000).
77. Smith, P.C., Hobisch, A., Lin, D.L., Culig, Z. & Keller, E.T. Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 33-40 (2001).
78. Bonkhoff, H., Wernert, N., Dhom, G. & Remberger, K. Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate* **19**, 91-98 (1991).

79. Grobholz, R., *et al.* Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Hum Pathol* **36**, 562-570 (2005).
80. Helpap, B. & Kollermann, J. Immunohistochemical analysis of the proliferative activity of neuroendocrine tumors from various organs. Are there indications for a neuroendocrine tumor-carcinoma sequence? *Virchows Arch* **438**, 86-91 (2001).
81. Lee, S.O., Chun, J.Y., Nadiminty, N., Lou, W. & Gao, A.C. Interleukin-6 undergoes transition from growth inhibitor associated with neuroendocrine differentiation to stimulator accompanied by androgen receptor activation during LNCaP prostate cancer cell progression. *Prostate* **67**, 764-773 (2007).
82. Hansson, J., Bjartell, A., Gadaleanu, V., Dizeyi, N. & Abrahamsson, P.A. Expression of somatostatin receptor subtypes 2 and 4 in human benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *Prostate* **53**, 50-59 (2002).
83. Vainas, G., *et al.* The role of somatostatin analogues in complete antiandrogen treatment in patients with prostatic carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* **16**, 119-126 (1997).
84. Sciarra, A., *et al.* Somatostatin analogues and estrogens in the treatment of androgen ablation refractory prostate adenocarcinoma. *J Urol* **172**, 1775-1783 (2004).
85. Dizeyi, N., *et al.* Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. *Prostate* **59**, 328-336 (2004).
86. Abdul, M., Anezinis, P.E., Logothetis, C.J. & Hoosein, N.M. Growth inhibition of human prostatic carcinoma cell lines by serotonin antagonists. *Anticancer Res* **14**, 1215-1220 (1994).
87. Molina, B.P. *Fisiologia Endocrina*, (McGraw-Hill Companies, 2004).
88. Isaacs, J.T. Prostate stem cells and benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **68**, 1025-1034 (2008).
89. Chen, Y., *et al.* Expression of G1 cyclins, cyclin-dependent kinases, and cyclin-dependent kinase inhibitors in androgen-induced prostate proliferation in castrated rats. *Cell Growth Differ* **7**, 1571-1578 (1996).
90. Niu, Y., *et al.* Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12182-12187 (2008).

91. Berger, R., *et al.* Androgen-induced differentiation and tumorigenicity of human prostate epithelial cells. *Cancer Res* **64**, 8867-8875 (2004).
92. Bonaccorsi, L., *et al.* Androgen receptor expression in prostate carcinoma cells suppresses alpha6beta4 integrin-mediated invasive phenotype. *Endocrinology* **141**, 3172-3182 (2000).
93. Wright, M.E., Tsai, M.J. & Aebbersold, R. Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* **17**, 1726-1737 (2003).
94. Ghafar, M.A., *et al.* Acute hypoxia increases the aggressive characteristics and survival properties of prostate cancer cells. *Prostate* **54**, 58-67 (2003).
95. Stewart, G.D., *et al.* The relevance of a hypoxic tumour microenvironment in prostate cancer. *BJU Int* **105**, 8-13 (2010).
96. Graeber, T.G., *et al.* Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379**, 88-91 (1996).
97. Butterworth, K.T., *et al.* Hypoxia selects for androgen independent LNCaP cells with a more malignant geno- and phenotype. *Int J Cancer* **123**, 760-768 (2008).
98. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-732 (2003).
99. Semenza, G.L. Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci* **1177**, 2-8 (2009).
100. Brahimi-Horn, C. & Pouyssegur, J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* **93**, E73-80 (2006).
101. Jiang, Y.G., *et al.* Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Int J Urol* **14**, 1034-1039 (2007).
102. Movsas, B., *et al.* Hypoxia in human prostate carcinoma: an Eppendorf PO₂ study. *Am J Clin Oncol* **24**, 458-461 (2001).
103. Vaupel, P., Kelleher, D.K. & Hockel, M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* **28**, 29-35 (2001).

104. McKenzie, S., Sakamoto, S. & Kyprianou, N. Maspin modulates prostate cancer cell apoptotic and angiogenic response to hypoxia via targeting AKT. *Oncogene* **27**, 7171-7179 (2008).
105. Shabsigh, A., *et al.* Biomarker analysis demonstrates a hypoxic environment in the castrated rat ventral prostate gland. *J Cell Biochem* **81**, 437-444 (2001).
106. Park, S.Y., *et al.* Hypoxia increases androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Cancer Res* **66**, 5121-5129 (2006).
107. Mabeesh, N.J., Willard, M.T., Frederickson, C.E., Zhong, H. & Simons, J.W. Androgens stimulate hypoxia-inducible factor 1 activation via autocrine loop of tyrosine kinase receptor/phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**, 2416-2425 (2003).
108. Horii, K., *et al.* Androgen-dependent gene expression of prostate-specific antigen is enhanced synergistically by hypoxia in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* **5**, 383-391 (2007).
109. Overgaard, J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* **25**, 4066-4074 (2007).
110. Lai, E.C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-973 (2004).
111. Yin, L., Velazquez, O.C. & Liu, Z.J. Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* **80**, 690-701 (2010).
112. Tien, A.C., Rajan, A. & Bellen, H.J. A Notch updated. *J Cell Biol* **184**, 621-629 (2009).
113. Kopan, R. & Ilagan, M.X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216-233 (2009).
114. Komatsu, H., *et al.* OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *PLoS Biol* **6**, e196 (2008).
115. Hukriede, N.A. & Fleming, R.J. Beaded of Goldschmidt, an antimorphic allele of Serrate, encodes a protein lacking transmembrane and intracellular domains. *Genetics* **145**, 359-374 (1997).
116. Hukriede, N.A., Gu, Y. & Fleming, R.J. A dominant-negative form of Serrate acts as a general antagonist of Notch activation. *Development* **124**, 3427-3437 (1997).

117. de Celis, J.F. & Bray, S.J. The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* **127**, 1291-1302 (2000).
118. Miele, L. Notch signaling. *Clin Cancer Res* **12**, 1074-1079 (2006).
119. Roy, M., Pear, W.S. & Aster, J.C. The multifaceted role of Notch in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 52-59 (2007).
120. Aster, J.C., Pear, W.S. & Blacklow, S.C. Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol* **3**, 587-613 (2008).
121. Gordon, W.R., Arnett, K.L. & Blacklow, S.C. The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci* **121**, 3109-3119 (2008).
122. Fortini, M.E. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* **16**, 633-647 (2009).
123. Hicks, C., *et al.* Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol* **2**, 515-520 (2000).
124. Rand, M.D., *et al.* Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol Cell Biol* **20**, 1825-1835 (2000).
125. Raya, A., *et al.* Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. *Nature* **427**, 121-128 (2004).
126. Kadesch, T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 506-512 (2004).
127. Kuroda, K., *et al.* Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* **18**, 301-312 (2003).
128. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776 (1999).
129. Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. & Fortini, M.E. Notch signaling. *Science* **268**, 225-232 (1995).
130. Wang, Z., Li, Y., Banerjee, S. & Sarkar, F.H. Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Lett* **279**, 8-12 (2009).
131. Duncan, A.W., *et al.* Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* **6**, 314-322 (2005).

132. Lowell, S., Jones, P., Le Roux, I., Dunne, J. & Watt, F.M. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* **10**, 491-500 (2000).
133. Ohishi, K., *et al.* Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1. *Blood* **95**, 2847-2854 (2000).
134. Masuya, M., *et al.* The soluble Notch ligand, Jagged-1, inhibits proliferation of CD34+ macrophage progenitors. *Int J Hematol* **75**, 269-276 (2002).
135. He, Y. & Pear, W.S. Notch signalling in B cells. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 135-142 (2003).
136. Cheng, P., Nefedova, Y., Miele, L., Osborne, B.A. & Gaborilovich, D. Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood* **102**, 3980-3988 (2003).
137. Yamada, T., *et al.* Regulation of osteoclast development by Notch signaling directed to osteoclast precursors and through stromal cells. *Blood* **101**, 2227-2234 (2003).
138. Tang, S.C., Jeng, J.S., Lee, M.J. & Yip, P.K. Notch signaling and CADASIL. *Acta Neurol Taiwan* **18**, 81-90 (2009).
139. Oda, T., *et al.* Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* **16**, 235-242 (1997).
140. Samejima, H., *et al.* Screening for Alagille syndrome mutations in the JAG1 and NOTCH2 genes using denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test* **11**, 216-227 (2007).
141. Kwon, S.M., Alev, C. & Asahara, T. The role of notch signaling in endothelial progenitor cell biology. *Trends Cardiovasc Med* **19**, 170-173 (2009).
142. Sharma, V.M., Draheim, K.M. & Kelliher, M.A. The Notch1/c-Myc pathway in T cell leukemia. *Cell Cycle* **6**, 927-930 (2007).
143. Gridley, T. Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**, R9-13 (2003).
144. Ichihara, E., Kiura, K. & Tanimoto, M. Targeting angiogenesis in cancer therapy. *Acta Med Okayama* **65**, 353-362.

145. Hellstrom, M., *et al.* Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776-780 (2007).
146. Weng, A.P., *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269-271 (2004).
147. Ma, S.K., Wan, T.S. & Chan, L.C. Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. *Hematol Oncol* **17**, 91-105 (1999).
148. Lee, S.Y., *et al.* Mutations of the Notch1 gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: analysis in adults and children. *Leukemia* **19**, 1841-1843 (2005).
149. Gallahan, D. & Callahan, R. Mammary tumorigenesis in feral mice: identification of a new int locus in mouse mammary tumor virus (Czech II)-induced mammary tumors. *J Virol* **61**, 66-74 (1987).
150. Santagata, S., *et al.* JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Res* **64**, 6854-6857 (2004).
151. Gray, G.E., *et al.* Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* **154**, 785-794 (1999).
152. Cuevas, I.C., *et al.* Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer Res* **65**, 5070-5075 (2005).
153. Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C.M., Carcangiu, M.L. & Artavanis-Tsakonas, S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6414-6418 (1995).
154. Miyamoto, Y., *et al.* Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* **3**, 565-576 (2003).
155. Nickoloff, B.J., Osborne, B.A. & Miele, L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* **22**, 6598-6608 (2003).
156. Haruki, N., *et al.* Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer Res* **65**, 3555-3561 (2005).
157. Ross, A.E., *et al.* Gene expression pathways of high grade localized prostate cancer. *Prostate* **2011**, 21373 (2011).

158. Ciofani, M. & Zuniga-Pflucker, J.C. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol* **6**, 881-888 (2005).
159. MacKenzie, F., Duriez, P., Wong, F., Nosedà, M. & Karsan, A. Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-Jkappa-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* **279**, 11657-11663 (2004).
160. Ronchini, C. & Capobianco, A.J. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol* **21**, 5925-5934 (2001).
161. Murata, K., *et al.* Hes1 directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27Kip1. *Mol Cell Biol* **25**, 4262-4271 (2005).
162. Nicolas, M., *et al.* Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* **33**, 416-421 (2003).
163. Wang, J., *et al.* Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* **28**, 17-28 (2010).
164. Weijzen, S., *et al.* Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* **8**, 979-986 (2002).
165. Wang, Y.C., *et al.* Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res* **70**, 4840-4849 (2010).
166. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549-555 (2002).
167. Nefedova, Y., Cheng, P., Alsina, M., Dalton, W.S. & Gabrilovich, D.I. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood* **103**, 3503-3510 (2004).
168. Morimura, T., *et al.* Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells. *J Biol Chem* **275**, 36523-36531 (2000).
169. Romer, S., Saunders, U., Jack, H.M. & Jehn, B.M. Notch1 enhances B-cell receptor-induced apoptosis in mature activated B cells without affecting

- cell cycle progression and surface IgM expression. *Cell Death Differ* **10**, 833-844 (2003).
170. Zweidler-McKay, P.A., *et al.* Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood* **106**, 3898-3906 (2005).
 171. Talora, C., Sgroi, D.C., Crum, C.P. & Dotto, G.P. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev* **16**, 2252-2263 (2002).
 172. Thelu, J., Rossio, P. & Favier, B. Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing. *BMC Dermatol* **2**, 7 (2002).
 173. Panelos, J., *et al.* Photoexposure discriminates Notch 1 expression in human cutaneous squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* **21**, 316-325 (2008).
 174. Sriuranpong, V., *et al.* Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* **61**, 3200-3205 (2001).
 175. Fan, X., *et al.* Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* **64**, 7787-7793 (2004).
 176. Croquelois, A., *et al.* Inducible inactivation of Notch1 causes nodular regenerative hyperplasia in mice. *Hepatology* **41**, 487-496 (2005).
 177. Wang, X.D., *et al.* Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol* **290**, 66-80 (2006).
 178. Wang, X.D., Shou, J., Wong, P., French, D.M. & Gao, W.Q. Notch1-expressing cells are indispensable for prostatic branching morphogenesis during development and re-growth following castration and androgen replacement. *J Biol Chem* **279**, 24733-24744 (2004).
 179. Leong, K.G. & Gao, W.Q. The Notch pathway in prostate development and cancer. *Differentiation* **76**, 699-716 (2008).
 180. Shou, J., Ross, S., Koeppen, H., de Sauvage, F.J. & Gao, W.Q. Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res* **61**, 7291-7297 (2001).

181. Zhang, Y., *et al.* Down-regulation of Jagged-1 induces cell growth inhibition and S phase arrest in prostate cancer cells. *Int J Cancer* **119**, 2071-2077 (2006).
182. Bin Hafeez, B., *et al.* Targeted knockdown of Notch1 inhibits invasion of human prostate cancer cells concomitant with inhibition of matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator. *Clin Cancer Res* **15**, 452-459 (2009).
183. Gustafsson, M.V., *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* **9**, 617-628 (2005).
184. Pear, W.S. & Simon, M.C. Lasting longer without oxygen: The influence of hypoxia on Notch signaling. *Cancer Cell* **8**, 435-437 (2005).
185. Sahlgren, C., Gustafsson, M.V., Jin, S., Poellinger, L. & Lendahl, U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6392-6397 (2008).
186. Chen, J., Imanaka, N., Chen, J. & Griffin, J.D. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br J Cancer* **102**, 351-360 (2010).
187. Lockwood, C.J., *et al.* Regulation of interleukin-6 expression in human decidual cells and its potential role in chorioamnionitis. *Am J Pathol* **177**, 1755-1764 (2010).
188. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y. & Phipps, M.L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* **71**, 1842-1849 (1997).
189. Chen, Y., *et al.* Oxygen concentration determines the biological effects of NOTCH-1 signaling in adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* **67**, 7954-7959 (2007).
190. Gupta, A., *et al.* Neuroendocrine differentiation in the 12T-10 transgenic prostate mouse model mimics endocrine differentiation of pancreatic beta cells. *Prostate* **68**, 50-60 (2008).
191. Jensen, J., *et al.* Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* **24**, 36-44 (2000).
192. Bonkhoff, H., Stein, U. & Remberger, K. Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic

- human prostate. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **423**, 291-294 (1993).
193. Smyth, L.G., *et al.* Carbonic anhydrase IX expression in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **13**, 178-181 (2010).
 194. Schroder, F.H., *et al.* Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* **360**, 1320-1328 (2009).
 195. Zhong, H., *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59**, 5830-5835 (1999).
 196. Luo, Y., *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostatecancer cells. *Chin Med J (Engl)* **119**, 713-718 (2006).
 197. Jin, R.J., *et al.* NE-10 neuroendocrine cancer promotes the LNCaP xenograft growth in castrated mice. *Cancer Res* **64**, 5489-5495 (2004).
 198. Diez, H., *et al.* Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp Cell Res* **313**, 1-9 (2007).
 199. Bedogni, B., Warneke, J.A., Nickoloff, B.J., Giaccia, A.J. & Powell, M.B. Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development. *J Clin Invest* **118**, 3660-3670 (2008).
 200. Beatus, P., Lundkvist, J., Oberg, C., Pedersen, K. & Lendahl, U. The origin of the ankyrin repeat region in Notch intracellular domains is critical for regulation of HES promoter activity. *Mech Dev* **104**, 3-20 (2001).
 201. Kageyama, R., Ohtsuka, T. & Kobayashi, T. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* **134**, 1243-1251 (2007).
 202. Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H. & Imayoshi, I. Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 733-740 (2009).
 203. Habener, J.F., Kemp, D.M. & Thomas, M.K. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* **146**, 1025-1034 (2005).

204. Beatus, P., Lundkvist, J., Oberg, C. & Lendahl, U. The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* **126**, 3925-3935 (1999).
205. Rapa, I., *et al.* Human ASH1 expression in prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *Mod Pathol* **21**, 700-707 (2008).
206. Yin, L., Velazquez, O.C. & Liu, Z.J. Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* **80**, 690-701 (1016).