

Espressione differenziale di proteine associate allo sviluppo della chemio e termo-resistenza in linee cellulari chemioresistenti di carcinoma pancreatico umano

A. Urbani¹, J. Poland², G. Federici^{3,4}, S. Bernardini^{3,4}, C. Di Ilio¹, P. Sinha⁵ and M. Schnölzer⁶

¹Laboratorio di Biochimica Analitica, Centro Studi sull'Invecchiamento (Ce.S.I.), Dipartimento di Scienze Biomediche, Facoltà di Medicina, Università di Chieti e Pescara, Chieti, Italy

²Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Universitätsklinikum Charité, Berlin, Germany

³Laboratorio di Biochimica Clinica, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù – IRCCS, Roma, Città del Vaticano

⁴Laboratorio di Biochimica Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Roma "Tor Vergata"

⁵Institut für medizinische und Chemische Labordiagnostik, Landeskrankenhaus Klagenfurt, Klagenfurt, Austria

⁶Zentrale Proteinanalytik, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, Germany

Premesse

La resistenza ad agenti chemioterapici di cellule tumorali è uno dei problemi principali che si verificano durante la terapia palliativa. A causa dell'insorgere di tale resistenza la chemioterapia è frequentemente associata a trattamenti con terapia radiante e termo terapia. Le relazioni molecolari tra quest'ultima e la chemioresistenza non sono ancora chiare e rappresentano lo scopo di questa ricerca. A tale fine abbiamo impiegato l'uso di tecniche di proteomica per identificare le proteine differenzialmente espresse durante l'insorgere della termoresistenza in linee cellulari farmaco resistenti isolate da carcinoma pancreatico umano. Risultati preliminari di questa analisi evidenziano una sovra-espressione della glutatione S-transferasi M3, associata alle linee cellulari termo-resistenti piuttosto che a quelle chemio-resistenti. Questo profilo di espressione, specifico di questa isoforma, potrebbe suggerire un inaspettato nuovo ruolo funzionale della glutatione S-transferasi M3 nei meccanismi di protezione da stress termico.

Introduzione

I tumori gastrointestinali, i quali includono tumori gastrici e pancreatici, sono spesso naturalmente re-

sistenti a molti farmaci anticancro. Inoltre, questi tumori sviluppano facilmente una farmaco resistenza acquisita che include il classico fenotipo della multi-farmaco resistenza più nota come MDR (Multi Drug Resistance). Tale fenomeno è accompagnato dalla sintesi di glicoproteina-P un trasportatore di membrana ATP dipendente della famiglia dei trasportatori ABC (1,2). Fenotipi di resistenza atipica non-MDR sono stati descritti per varie linee cellulari neoplastiche, tuttavia i meccanismi molecolari responsabili di tale resistenza non sono stati ancora completamente identificati (3,4). Al fine di eludere tale farmaco resistenza la terapia con droghe anti-neoplastiche è stata spesso combinata con altri protocolli terapeutici. L'associazione con terapia ipertermica è stata praticata con buon successo in vari sistemi sperimentali di tumore ed anche in caso di pazienti con cancro avanzato (5-6). Tuttavia il successo di questa terapia combinata può essere fortemente limitato dall'insorgere di una tolleranza termica delle cellule tumorali. Al fine di studiare i meccanismi molecolari responsabili di tale termo resistenza in rapporto con la farmaco resistenza acquisita in linee cellulari di carcinoma pancreatico abbiamo studiato il profilo di espressione differenziale di proteine mediante tecniche di elettroforesi bidimensionale, spettrometria di massa MALDI-TOF e di bioinformatica.

Metodi

Le linee cellulari impiegate in questo lavoro sono state isolate dal Dr. Hermann Lange presso l'Ospedale "La Charit " di Berlino e rese chemioresistenti verso la daunorubicina o verso il mitoxantrone prima di essere portate in condizioni di coltura iper-termiche 39.5° C. La scelta dei due farmaci citostatici impiegati   dovuta al tipo specifico di farmaco resistenza che inducono, infatti, mentre la daunorubicina tende ad indurre una resistenza MDR classica, il mitoxantrone induce una forma di farmaco resistenza atipica non dipendente dalla sovra-espressione di glicoproteina-P (7).

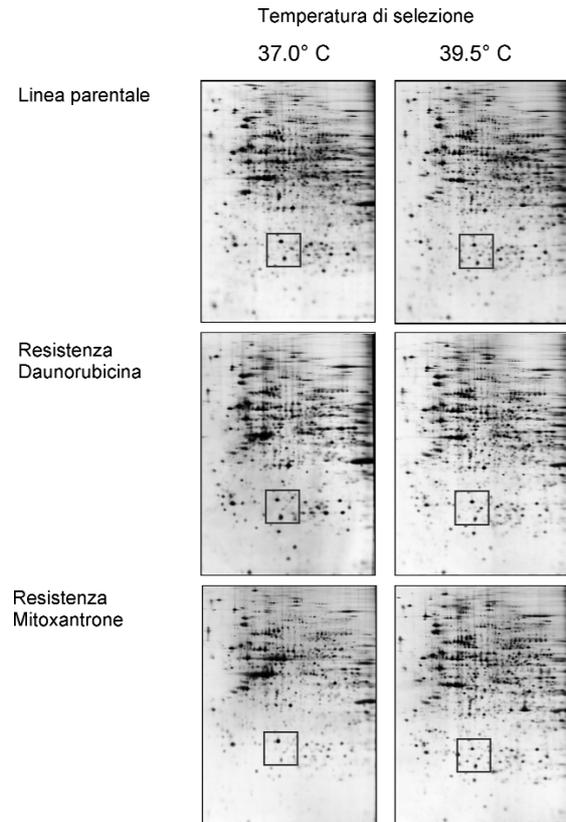
Tabella I . Linee cellulari impiegate in questo studio.

Linea cellulare	Chemio resistenza	Termo resistenza
EPP85-181	-	-
EPP85-181 tr	-	+
EPP85-181 RDB	Daunorubicina	-
EPP85-181 RDB tr	Daunorubicina	+
EPP85-181 RNOV	Mitoxantrone	-
EPP85-181 RNOV tr	Mitoxantrone	+

Le sei linee cellulari descritte brevemente nella Tabella I sono state impiegate in questo studio. Le cellule sono state frazionate secondo la procedura di Celis *et al.* (8) usando il sistema Iso-Dalt (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) per la separazione elettroforetica bidimensionale. Le proteine totali sono state rilevate mediante colorazione con nitrato di argento utilizzando una camera di reazione per lo sviluppo contestuale di dodici gel (9). Tale sistema permette di ridurre la variabilit  sperimentale connessa con lo sviluppo della colorazione con nitrato di argento rendendo pi  robusti i risultati di comparazione del livello di espressione di una determinata proteina. A tal fine tre gel bidimensionali per ogni singola linea cellulare sono stati realizzati e le immagini da questi ricavati sono state utilizzate per realizzare una singola immagine-media (master-set) la quale   stata utilizzata per la ricerca in banche dati e per la comparazione del profilo di espressione. L'analisi delle immagini   stata realizzata mediante il sistema PDQuest (Biorad, Hercules, CA, USA). Il margine di espressione differenziale di una determinata proteina   stato fissato in una differenza di intensit  di colorazione di quattro volte. Le proteine con diversi profili di espressione nelle diverse linee cellulari sono state identificate mediante comparazione dei master-sets con il database sui cheratinociti di Celis disponibile via internet presso il sito <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. Le bande che non sono potute essere identificate direttamente mediante questo database sono state analizzate mediante spettrometria di massa e massa-massa MALDI-TOF. I campioni sono stati escissi dal gel di poliaccrilammi-

de e sottoposti a digestione con tripsina; i peptidi così ottenuti sono stati purificati mediante trattamento con resina a fase inversa C18 (Millipore, ZipTip) ed analizzati su di uno strumento MALDI-TOF-MS Bruker Reflex IV equipaggiato con una piattaforma di analisi SCOUT ed estrazione ritardata degli ioni. L'identificazione dei campioni proteici   stata ottenuta mediante analisi delle masse a singola carica dei

Figura 1: 2D-PAGE delle proteine espresse in linee cellulari di carcinoma pancreatico non farmaco resistenti, con farmaco resistenza classica MDR alla daunorubicina e con farmaco resistenza atipica non-MDR al mitoxantrone.



digesti triptici con il software ProFound disponibile presso la Rockefeller University, New York, ricercando nella banca dati non ridondante della NCBI (<http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>). I risultati di questa procedura sono stati confermati attraverso l'analisi dei prodotti di frammentazione di uno o pi  peptidi per campione. Gli ioni a singola carica, derivanti dal decadimento laser indotto (LID), sono stati comparati verso il database umano della NCBI mediante il software MSprospector, UCSF. Questa analisi permette di confermare la proposta sequenza peptidica ottenuta da ProFound mediante una procedura di *de novo* sequenziamento dei frammenti.

Risultati e Discussione

Nella Figura 1 sono riportate la comparazione dei gel bidimensionali mettendo principalmente in luce

Figura 2: Ingrandimento dell'area di interesse nelle 2D-PAGE

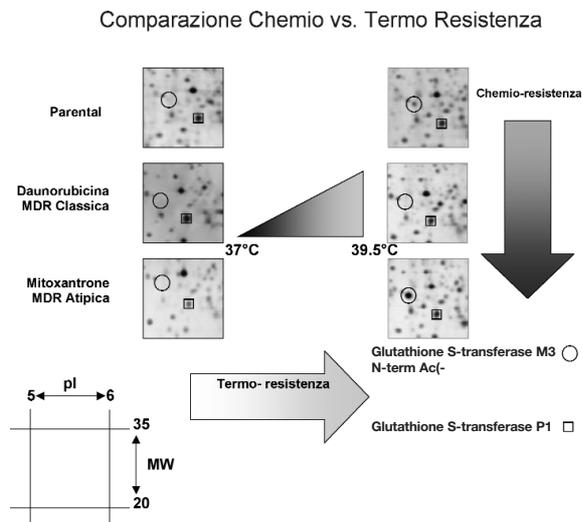
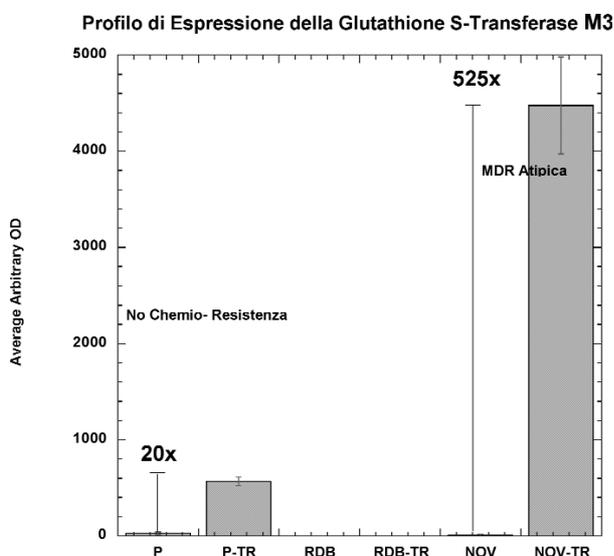


Figura 3: A) Modulazione dei livelli di GST M3 nelle linee cellulari di studio.



le differenze di espressione proteica nelle linee cellulari chemo e termo tolleranti. L'interpretazione dei profili di espressione ottenuti non è ancora completata tuttavia abbiamo notato il limitato numero di proteine che subiscono una differente espressione nell'insorgere della termoresistenza nella linea cellulare con farmaco resistenza classica MDR in rispetto alle altre due linee non resistenti e con farmaco resistenza atipica non-MDR. In questa breve comunicazione discuteremo le differenze riportate nel piccolo riquadro evidenziato, contenente i pesi molecolari apparenti tra 35-20 kDa e l'intervallo di pH da 5 a 6. In questa area (Fig. 2), abbiamo potuto identificare due differenti isoforme della glutathione S-transferasi (GST) umane la M3 (GST M3) e la P1 (GST P1). Le glutathione S-trasferasi sono enzimi attivi nella detossificazione di composti xenobiotici con atomi di carbonio particolarmente

Figura 3: B) Modulazione dei livelli di GST P1 nelle linee cellulari di studio.

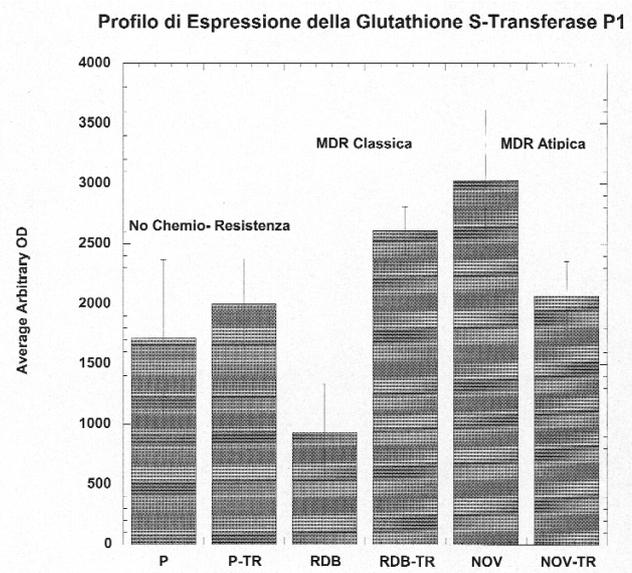
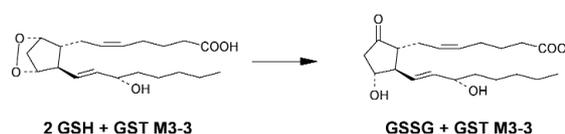


Figura 4: Possibile meccanismo di sintesi della PGE₂ da parte delle GST M2-M2 ed M3-M3.

Attività PGE₂ sintasi della isoforma GST M3



te reattivi, elettrofili. Il meccanismo di detossificazione sfrutta una reazione di coniugazione nucleofila del tiolo del glutatione sul sito elettrofilo (10). La molecola così coniugata è più facilmente solubile in acqua e può essere portata fuori dalla cellula mediante le proteine di membrana della famiglia delle MRP (Multi-drug Resistant Protein). In particolare l'isoforma P1 è stata descritta essere espressa specificamente in molti tessuti neoplastici. Nella linea di adenocarcinoma del pancreas termo resistente abbiamo evidenziato la sovra-espressione di circa venti volte della GST M3 (Fig. 3A). Questa proteina, come risulta dai dati di massa MALDI-TOF (non presentati), è presente nella sua forma con l'N-terminale acetilato ed è, inoltre, sovra espressa di circa 525 volte quando la linea cellulare resistente al mitoxantrone viene resa termoresistente. È interessante notare che questo polipeptide non è assolutamente sovra-regolato nelle linee chemo resistenti, in particolare non viene espresso affatto nelle linee resistenti alla daunorubicina. In contrasto con il profilo di espressione della isoforma M3 la GST P1 non presenta alcun significativo incremento dei propri livelli di espressione (Fig. 3B) né in funzione dello sviluppo della chemo resistenza né della termo-tolleranza. Questa evidenza suggerisce che il ruolo della GST M3 è specifico di questa isoforma e certamente non condiviso dalla GST P1. La GST M3 è una isoforma specifica del tessuto cerebrale e

dei testicoli, tuttavia il suo ruolo funzionale in rispetto alle altre isoforme della stessa classe M rimane ancora oscuro (11). Inoltre il gene codificante per questo enzima ha un orientamento invertito rispetto alle altre isoforme di questa classe presenti nello stesso cluster genico. Questa configurazione potrebbe essere alla base di un meccanismo differenziale di regolazione genica di questa specifica isoforma (11).

Il coinvolgimento nella resistenza termica della isoforma M3 di glutatione transferasi non è stata ancora investigata e rappresenta uno dei risultati preliminari più interessanti di questo studio. Recentemente Beuckmann *et al.* (12) hanno riportato la presenza di una attività PGE₂ sintasica della GST M3-M3 ed M2-M2 espresse in sistemi ricombinanti eterologhi (Fig. 4). Questa attività catalitica, fino ad ora peculiare di queste due isoforme, potrebbe essere coinvolta proprio in un meccanismo di risposta allo stress termico mediante modulazione dei livelli di prostaglandine.

L'analisi dei profili e la dissezione di queste evidenze all'interno del contesto fisiologico della cellula sono assolutamente necessari al completamento di questo studio ed alla validazione di alcune delle ipotesi presentate in questo lavoro.

Bibliografia

1. Johnstone RW, Ruefli AA, Tainton KM, Smyth MJ. A role for P-glycoprotein in regulating cell death. *Leuk Lymphoma* 2000; 38:1-11
2. Monceviute-Eringiene E. Evolutionary malignant resistance of cells to damaging factors as common biological defence mechanism in neoplastic development. Review of conception. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19:335-48.
3. Nooter K, Stoter G. Molecular mechanisms of multi-drug resistance in cancer chemotherapy. *Pathol Res Pract* 1996; 192:768-80
4. Moscow JA, Cowan KH. *J Natl Cancer Inst* 1988;80: 14-20.
5. Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia* 2001; 17:1-18.
6. Rau B, Wust P, Tilly W, Gellermann J, Harder C, Riess H, et al. Preoperative radiochemotherapy in locally advanced or recurrent rectal cancer: regional radiofrequency hyperthermia correlates with clinical parameters. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48:381-91
7. Sinha P, Poland J, Schnolzer M, Celis JE, Lage H. Characterization of the differential protein expression associated with thermoresistance in human gastric carcinoma cell lines. *Electrophoresis* 2001; 22:2990-3000
8. Celis JE, Ratz G, Basse B, Lauridsen JB, Celis A. High resolution two-dimensional gel electrophoresis of Proteins: Isoelectric Focusing (IEF) and Non-equilibrium pH Gradient Electrophoresis (NEPHGE). San Diego, CA: Academic press; 1998.
9. Sinha P, Poland J, Schnolzer M, Rabilloud T. A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2001; 1:835-40.
10. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11:265-83
11. Patskovsky YV, Huang MQ, Takayama T, Listowsky I, Pearson WR. Distinctive structure of the human GSTM3 gene-inverted orientation relative to the mu class glutathione transferase gene cluster. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361:85-93.
12. Beuckmann CT, Fujimori K, Urade Y, Hayaishi O. Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem Res* 2000; 25:733-8.