

## **Ruolo e significato clinico della fosfodiesterasi 5 nel carcinoma mammario.**

Il carcinoma mammario è il tumore più diffuso nelle donne, rappresentando circa il 27% di tutti i tumori femminili diagnosticati. Nonostante l'aumento del tasso di sopravvivenza globale delle pazienti affette da tale neoplasia, la diffusione delle metastasi rimane ancora un problema clinico rilevante che incide sul tasso di mortalità. A tal proposito, uno dei principali obiettivi nella ricerca biomedica è l'identificazione di proteine direttamente coinvolte nei processi di tumorigenesi e di metastatizzazione. Tali proteine potrebbero rappresentare dei markers predittivi per identificare il carcinoma mammario invasivo e/o potenziali target per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento di tale neoplasia. Attualmente, nella ricerca della terapia antitumorale un promettente approccio terapeutico è rappresentato dalla modulazione dell'attività di specifiche fosfodiesterasi, come la fosfodiesterasi 5 (PDE5). La PDE5 è un enzima che, idrolizzando i legami fosfodiesterici 3',5' dei nucleotidi ciclici, riduce i livelli di cGMP, un secondo messaggero che, attivando specifiche vie di trasduzione del segnale (proteina chinasi G, canali ionici cGMP-dipendenti e specifiche PDEs), regola diversi aspetti dell'omeostasi cellulare sia in condizioni fisiologiche che patologiche. In diversi carcinomi umani, è stata riscontrata un'alterazione dei livelli di cGMP dovuta ad un aumento dell'espressione della PDE5, suggerendone un suo ruolo nel processo di tumorigenesi. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato come l'inibizione della PDE5, con il conseguente aumento dei livelli intracellulari di cGMP, induca apoptosi e arresto del ciclo cellulare in differenti linee cellulari tumorali. Tuttavia, nonostante tali studi, poco si conosce relativamente all'espressione della PDE5 e alla sua associazione con caratteristiche clinico-patologiche nei tumori mammari umani. Inoltre, manca una chiara comprensione dei meccanismi attraverso cui tale enzima possa contribuire alla progressione tumorale.

Nel presente lavoro di ricerca, abbiamo evidenziato come l'enzima PDE5 sia espresso diversamente nei diversi sottotipi molecolari di linee cellulari tumorali mammarie "in vitro" e di tessuti tumorali mammari "in vivo". In particolare, i risultati ottenuti hanno mostrato bassi livelli di espressione della PDE5 in cellule di carcinoma mammario appartenenti al sottotipo "Luminal A" (fenotipo tumorale correlabile ad una prognosi più favorevole), mentre più elevati livelli dell'enzima sono stati osservati nei sottotipi "HER2-type" e "triple-negative" correlati ad un fenotipo tumorale più aggressivo e ad una prognosi più sfavorevole. Per valutare il potenziale ruolo della PDE5 nell'influenzare il fenotipo tumorale sono stati generati cloni esprimenti stabilmente tale enzima nella linea cellulare MCF-7 classificabile come sottotipo Luminal A-like ed esprimente i più bassi livelli di PDE5. L'overespressione della PDE5 risulta in un significativo aumento della motilità e dell'invasività delle cellule MCF-7 ed il sildenafil, inibitore selettivo di tale enzima, è in grado di reversare questi effetti. Inoltre, l'analisi dell'espressione differenziale tra le cellule MCF-7 trasfettate stabilmente con il vettore vuoto e il plasmide di espressione della PDE5, mediante la metodica dell'RNA-Sequencing, ha individuato il movimento cellulare come il processo biologico maggiormente rappresentato ed i pathways mediati dalle Rho GTPasi, proteine coinvolte nei processi di trasformazione cellulare e disseminazione metastatica, come le vie di segnale più attive nei cloni overesprimenti la PDE5 (Rho A, Cdc42 e Rac pathways con activation z-score= 1.9, 1.342, 0.302, rispettivamente). A conferma dei dati ottenuti, saggi di immunoblotting e di GST-pulldown mostrano un aumento dei livelli di espressione e di attivazione delle proteine Rho, Cdc42 e Rac in cellule MCF-7 overesprimenti la PDE5. Aumentati livelli di fosforilazione degli effettori a valle di tali proteine, quali la chinasi LIMK, la Cofilina, la Miosina e c-Myc, sono stati anche evidenziati nei cloni overesprimenti la PDE5. In accordo con tali risultati, il trattamento con l'inibitore della

chinasi associata a Rho, Y-27632, riduce significativamente l'aumento della motilità e dell'invasività indotto dall'overespressione della PDE5 nelle cellule MCF-7. Infine, nell'ultima parte del presente lavoro di ricerca, è stato valutato il significato clinico dell'espressione dell'enzima PDE5 in pazienti affette da carcinoma mammario. Analisi di immunohistochimica hanno mostrato uno staining positivo per la PDE5 nell'85% dei tessuti tumorali esaminati (n=35) rispetto ai tessuti mammari non neoplastici (n=3). In accordo a quanto osservato "in vitro", è possibile notare una maggiore espressione dell'enzima nei tessuti derivanti da sottotipi tumorali "HER2-type" e "triple-negative" rispetto ai tumori appartenenti al sottotipo "Luminal B" e "Luminal A". Inoltre, una correlazione positiva è stata evidenziata con tumori con elevato grado istologico. Il significato clinico della PDE5 è stato ulteriormente supportato da analisi retrospettive (Metabric-project, n=1988, follow-up medio= 8 anni) che mostrano come l'overespressione di tale enzima sia associata ad una bassa sopravvivenza globale in pazienti affette da carcinoma mammario. Tale associazione risulta significativa anche in pazienti con carcinoma mammario recettore estrogenico (ER) -positivo, sottolineando il potenziale ruolo prognostico della PDE5 in tumori ER-positivi che esprimono bassi livelli dell'enzima rispetto ai tumori ER-negativi.

In conclusione, i risultati ottenuti dal presente lavoro di ricerca hanno identificato un nuovo ruolo della PDE5 nell'influenzare il fenotipo di cellule di carcinoma mammario e forniscono le prime evidenze per un suo significato clinico come marker prognostico negativo in pazienti affette da tale neoplasia. Inoltre, suggeriscono come la PDE5 potrebbe rappresentare un nuovo target terapeutico per l'inibizione della progressione tumorale mammaria. Tali risultati potrebbero avere una rapida traslabilità in studi clinici, in quanto gli inibitori della PDE5 sono farmaci già utilizzati per diverse patologie e caratterizzati da un buon profilo farmacocinetico e da un basso livello di tossicità.

**Supervisor:**

**Prof. Diego Sisci**



**Tutor:**

**Dott.ssa Ines Barone**



**Dottorando:**

**Dott.ssa Antonella Campana**

