

Titolo: Regolazione della prolattina extracellulare e intracellulare sulla proliferazione cellulare e sul tasso di sopravvivenza attraverso la via GHR/JAK2/STAT3 nel NSCLC

Codice: PRL003

Autore: Chou et al.

Data: 2021

Rivista: Chemosphere 269:129625

Argomento: prolattina

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128604>

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653520327995?via%3Dihub>

Parole chiave: prolattina, recettore del GH, VEGF, tumore al polmone non a piccole cellule, JAK2, STAT3

Tumore: carcinoma polmonare

Traduzione: tradotte le sezioni "Introduzione" e "Discussione"

**Punti di interesse:** La prolattina (PRL) è un ormone polipeptidico secreto dalle cellule lattotropiche della ghiandola pituitaria anteriore. La PRL svolge un ruolo importante nello sviluppo della ghiandola mammaria e nell'allattamento. Nelle cellule tumorali, tuttavia, la PRL promuove la progressione del cancro al seno e alla prostata attraverso le sue interazioni con il suo recettore di membrana (PRLR). Sono stati studiati i meccanismi di segnalazione della PRLR nei tumori della mammella e della prostata e sono in studio anticorpi monoclonali che si legano e inibiscono recettore della prolattina. Sia il recettore dell'ormone della crescita (GHR) che il recettore della prolattina (PRLR) sono singole proteine transmembrana e hanno una struttura molecolare simile, contenente domini extracellulari, domini transmembrana e domini citoplasmatici. GH e prolattina hanno anche loro una struttura simile ed entrambi attivano il trasduttore di segnale Janus chinasi 2 (JAK2) e le vie di segnalazione dell'attivatore delle trascrizioni (STAT).

Janus chinasi 2 (comunemente chiamato JAK2) è un enzima citosolico (ovvero che si trova dentro la cellula), non recettoriale, in grado di trasferire il gruppo fosfato da ATP a un residuo di tirosina di una proteina (da qui il nome tirosin chinasi), processo chiamato fosforilazione. Questi enzimi fosforilanti, attivano o disattivano altri enzimi in una cellula, regolano molte funzioni come la crescita cellulare, la proliferazione, la differenziazione, l'adesione, la migrazione e l'apoptosi e sono componenti critici nella regolazione

Le proteine STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription - trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione) è una famiglia di proteine che mediano diversi processi dell'immunità cellula-mediata, proliferazione, apoptosi e differenziazione cellulare. Sono attivate principalmente tramite fosforilazione (e quindi da molecole tipo JACK2), dopo di che sono trasportate attivamente verso il nucleo per la trascrizione del DNA e la sintesi delle proteine.

È noto che i livelli di espressione di PRL nei pazienti con cancro del polmone sono correlati ai tassi di sopravvivenza e agli effetti terapeutici, indicando che alti livelli di PRL promuovono la progressione del cancro del polmone. Anche i livelli sierici di PRL elevati sembrano essere associati

alla gravità del cancro del polmone e di altre malattie polmonari. Tuttavia, il meccanismo della PRL nel promuovere la proliferazione delle cellule tumorali polmonari non è ancora chiaro. Il presente studio è il primo rapporto sugli effetti stimolatori della PRL sulle cellule NSCLC, che ha anche evidenziato che tale azione avviene attraverso l'attivazione del segnale JAK2/STAT3, tramite il recettore del GH (GHR), e non il recettore della prolattina (PRLR). Questa ricerca è stata condotta su linee cellulari di tumore al polmone non a piccole cellule (A549) che sono state trattate con prolattina. I risultati in breve sono stati i seguenti:

- La prolattina promuove la proliferazione delle cellule A549
- La prolattina aumenta i livelli di fosforilazione JAK2/STAT3 nelle cellule NSCLC (e quindi attiva determinati processi fosforilando altre molecole/enzimi)
- La prolattina aumenta l'espressione del gene per il fattore di crescita endotelio-vascolare (VEGF), e dei livelli di mRNA del VEGF erano GHR-dipendente
- Il silenziamento del GHR sopprime il livello di fosforilazione di JAK2/STAT3
- L'inibizione della prolattina intracellulare sopprime la proliferazione cellulare
- I livelli di espressione di prolattina, recettore del GH, e fattore di crescita endotelio-vascolare erano più alti nei tessuti tumorali polmonari rispetto ai tessuti normali

In più dettaglio:

**Prolattina extracellulare:** aumenta la proliferazione delle cellule NSCLC promuovendo le attività JAK2/STAT3 attraverso GHR, ma non tramite il recettore della prolattina (PRLR) come riportato per altri tumori. I livelli di proteina GHR erano più alti nei tessuti polmonari tumorali rispetto ai tessuti polmonari normali, un'osservazione che era correlata negativamente al tasso di sopravvivenza. Anticorpi monoclonali usati per neutralizzare le funzioni della recettore della prolattina nei tumori della mammella e della prostata, non sono adatti a pazienti con NSCLC.

**Fattore di crescita endotelio vascolare (VEGF):** la prolattina esogena ha portato ad una sovraespressione del VEGF e che questo era GHR-dipendente. Infatti livelli di proteina GHR più elevati hanno portato a livelli più elevati di VEGF. Inoltre, c'erano correlazioni positive tra i livelli di espressione di PRL intracellulare, GHR e VEGF nei campioni clinici analizzati.

**Prolattina intracellulare:** lo studio dimostra che la PRL è secreta dalle cellule NSCLC e che un livello di prolattina più elevato nei tessuti tumorali rispetto ai tessuti normali era associato a bassi tassi di sopravvivenza. Ci sono anche relazioni positive tra i livelli di espressione proteica di PRL, o GHR e VEGF. Abbattendo la prolattina intracellulare, sono diminuiti la fosforilazione di JAK2/STAT3 e i livelli proteici delle proteina del recettore del GHR e del VEGF.

Gli autori concludono che alti livelli di espressione sia di PRL che di GHR causano uno scarso tasso di sopravvivenza nei pazienti con cancro del polmone. Prolattina e recettore del GH sono bersagli importanti per la soppressione della proliferazione cellulare NSCLC.

## Riassunto

**Lo stress aumenta la concentrazione di prolattina sierica (PRL). L'iperprolattinemia è associata a una prognosi sfavorevole nei pazienti con cancro del polmone, ma il meccanismo d'azione della PRL non è chiaro. Gli obiettivi di questo studio erano (i) indagare il meccanismo di azione del recettore PRL nelle cellule NSCLC (ii) misurare se la PRL fosse secreta dalle cellule NSCLC e il suo meccanismo di stimolazione in vitro e in vivo. Abbiamo scoperto che la proliferazione cellulare era aumentata dopo il trattamento di una dose farmacologica di PRL nelle cellule A549, che attraverso la regolazione del recettore dell'ormone della crescita (GHR) e a valle della via JAK2/STAT3/VEGF. Tutte le cellule NSCLC nel presente studio hanno secreto PRL ed espresso GHR, ma non PRLR. L'inibizione del livello della proteina GHR ha portato a diminuire la proliferazione cellulare indotta da PRL. La PRL è stata rilevata nel terreno di coltura delle cellule NSCLC. Il blocco della PRL intracellulare ha regolato negativamente le attività della proteina JAK2/STAT3 e i livelli di**

**proteine GHR e VEGF.. Inoltre, il blocco della PRL intracellulare ha ridotto la proliferazione cellulare e la capacità di formare colonie. Nei tessuti del cancro del polmone, i livelli di PRL, GHR e VEGF erano più alti nei tessuti tumorali rispetto ai tessuti normali e le espressioni proteiche di queste tre proteine sono correlate positivamente, rispettivamente. Alti livelli di espressione sia di PRL che di GHR causano uno scarso tasso di sopravvivenza nei pazienti con cancro del polmone. Presi insieme, i nostri risultati hanno suggerito che la PRL extracellulare e intracellulare fosse coinvolta nella proliferazione cellulare attraverso GHR. I risultati in vitro e in vivo dicono che GHR e PRL sono obiettivi importanti per la soppressione della proliferazione cellulare NSCLC, che potrebbe migliorare il tasso di sopravvivenza nei pazienti con NSCLC.**

## **Introduzione**

Il cancro del polmone è una delle principali cause di morte per cancro in tutto il mondo (Siegel et al., 2017). La maggior parte (80-85%) dei pazienti con cancro del polmone appartiene al tipo di cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC), che include i sottotipi di carcinoma a cellule squamose, adenocarcinoma e carcinoma a grandi cellule (Ettinger et al., 2015).

La chirurgia e la chemioterapia sono utilizzate nel trattamento della maggior parte dei pazienti affetti da cancro del polmone nelle fasi iniziali. Tuttavia, la chirurgia, la chemio e la radioterapia hanno scarsi risultati nei pazienti con carcinoma polmonare metastatico. Per migliorare il trattamento, è importante identificare un buon bersaglio terapeutico. Rapporti recenti hanno evidenziato che, oltre al fumo, anche l'inquinamento atmosferico e le malattie endocrine sono fattori di rischio per il cancro del polmone. Uno dei fattori che determinano i disturbi endocrini è l'inquinamento ambientale (Luderer et al., 2004). I livelli di ormoni sierici, come PRL, ormone follicolo-stimolante, ormone luteinizzante, testosterone ed estradiolo, sono significativamente alterati nei pazienti con cancro del polmone rispetto agli individui sani (Recchione et al., 1983). I tessuti tumorali della maggior parte dei pazienti con cancro del polmone esprimono l'mRNA della PRL e questi pazienti hanno un basso tasso di sopravvivenza rispetto ai pazienti PRL-negativi (Le Bescont et al., 2015). Il livello sierico di PRL è un marker diagnostico nei pazienti con cancro del polmone. (Nolen et al., 2011). Tuttavia, non è stata riportata alcuna relazione chiara tra l'espressione del gene del recettore della prolattina (PRLR) e il tasso di sopravvivenza dei pazienti con cancro del polmone (Le Bescont et al., 2015). È stato suggerito che l'associazione di PRL con tumori polmonari più aggressivi potrebbe non avvenire attraverso l'azione di PRLR (Le Bescont et al., 2015), ma i tipi di recettori di membrana presi di mira da PRL nel carcinoma polmonare sono sconosciuti. PRL è un ormone polipeptidico secreto dalle cellule lattotrope della ghiandola pituitaria anteriore. La PRL svolge un ruolo importante nello sviluppo della ghiandola mammaria e nell'allattamento (Freeman et al., 2000). Nelle cellule tumorali, tuttavia, la PRL promuove la progressione del cancro al seno e alla prostata attraverso le sue interazioni con la PRLR (Jacobson et al., 2011). Sono stati studiati i meccanismi di segnalazione della PRLR sui tumori della mammella e della prostata e uno studio di fase I su LFA102, un anticorpo monoclonale che si lega e inibisce il PRLR, è stato utilizzato nei pazienti (Damiano et al., 2013; Agarwal et al., 2016). Sia il recettore dell'ormone della crescita (GHR) che il recettore della prolattina (PRLR) sono singole proteine transmembrana e hanno una struttura molecolare simile, contenente domini extracellulari, domini transmembrana e domini citoplasmatici (Goffin e Kelly, 1996). Sia GH che prolattina hanno anche una struttura simile ed entrambi attivano il trasduttore di segnale Janus chinasi 2 (JAK2) e le vie di segnalazione dell'attivatore delle trascrizioni (STAT). Tuttavia, il meccanismo della PRL nel promuovere la proliferazione delle cellule tumorali polmonari non è ancora chiaro, in particolare, non è stato studiato il meccanismo di attivazione intracellulare della proliferazione cellulare indotta da PRL nel NSCLC.

A nostra conoscenza, il presente studio è il primo rapporto sugli effetti stimolatori della PRL sulle cellule NSCLC durante l'attivazione del segnale JAK2/STAT3 attraverso il recettore del GH (GHR), ma non il recettore della prolattina (PRLR). Questo è anche un primo rapporto sulla regolazione della via JAK2/STAT3 da parte della PRL intracellulare nelle cellule NSCLC. I nostri dati

supportano la proposta che l'asse PRL-GHR potrebbe diventare molecole bersaglio per la strategia terapeutica del cancro del polmone.

## **Discussione**

È noto che i livelli di espressione di PRL nei pazienti con cancro del polmone sono correlati ai tassi di sopravvivenza e agli effetti terapeutici (Caponnetto et al., 2017; Le Bescont et al., 2015; Recchione et al., 1983; Bhatavdekar et al., 1994 ), indicando che alti livelli di PRL promuovono la progressione del cancro del polmone. Anche i livelli sierici di PRL sono elevati e sembrano essere associati alla gravità del cancro del polmone e di altre malattie polmonari (Pinto-Plata et al., 2007; Akbas et al., 2010, Terasaki et al., 2010; Chen et al., 2005).

Quindi, la PRL potrebbe essere un potenziale marcatore diagnostico e bersaglio terapeutico per il cancro del polmone. Pertanto, nel presente studio sono stati studiati l'attivazione del recettore da parte della PRL e le modifiche dei segnali e delle proteine dopo l'azione della PRL.

Nei pazienti con cancro del polmone, la prevenzione delle metastasi, la proliferazione cellulare e l'angiogenesi sono le principali strategie terapeutiche (Wakelee et al., 2014). Abbiamo scoperto che un dosaggio farmacologico ma non una concentrazione fisiologica di PRL induceva la proliferazione cellulare (Fig. 1). Questi risultati erano simili ai dati clinici come segue. I livelli sierici di PRL aumentano di circa dieci volte in gravidanza (Hu et al., 2018) e durante la gravidanza, le metastasi si verificano frequentemente nei pazienti con cancro del polmone (Boussios et al., 2013; Iliaz et al., 2014). Le scarse risposte terapeutiche nelle pazienti con cancro del polmone in gravidanza hanno portato a prognosi infausta e basso tasso di sopravvivenza dopo la terapia (Azim et al., 2010; Boussios et al., 2013). Queste osservazioni cliniche suggeriscono che una concentrazione farmacologica o anormalmente elevata di livelli sierici di PRL potrebbe indurre la progressione del cancro del polmone.

È stato riportato che la PRL aumenta la proliferazione delle cellule T47D, una linea cellulare di cancro al seno, e aumenta i livelli proteici di fosfo-STAT1, STAT3 e STAT5 (Llovera et al., 2000). Considerando che, G129R-hPRL, un antagonista della PRL, inibisce la proliferazione cellulare e i livelli proteici di fosfo-STAT1, STAT3, STAT5 (Llovera et al., 2000). Queste osservazioni suggeriscono che la sotto-espressione delle STAT fosse coinvolta nella proliferazione cellulare. Un fenomeno simile è stato ampiamente riportato per il cancro alla prostata (Neilson et al., 2007). Nelle cellule MDA-MB-435, un'altra linea cellulare di cancro al seno umano, la sovraespressione di PRL aumenta i livelli di proteina PRLR e accelera la crescita cellulare (Liby et al., 2003). Questi rapporti sottolineano che sia la PRL extracellulare che intracellulare hanno effetti di promozione in cellule di cancro al seno tramite PRLR, come mostrato dai nostri risultati nelle cellule di cancro ai polmoni. I dati qui riportati hanno mostrato che la somministrazione di PRL ha aumentato la proliferazione cellulare e i livelli proteici di fosfo-JAK2/STAT3 nelle cellule A549. Al contrario, il silenziamento di GHR ha portato a livelli di proteina fosfo-JAK2 e VEGF sotto-regolati. I nostri risultati suggeriscono fortemente che la PRL extracellulare aumenta la proliferazione delle cellule NSCLC e promuove le attività JAK2/STAT3 attraverso GHR, ma non la PRLR come precedentemente riportato nei tumori al seno e alla prostata (Jacobson et al., 2011). I nostri risultati suggeriscono che il GHR può essere un nuovo importante indice di strategia terapeutica nel NSCLC rispetto al fatto che la PRLR sia l'obiettivo terapeutico della progressione tumorale leader della PRL nei tumori della mammella e della prostata. Nei nostri campioni clinici, i livelli di proteina GHR erano più alti nei tessuti tumorali polmonari rispetto ai tessuti polmonari normali, un'osservazione che era correlata negativamente al tasso di sopravvivenza. Questa proposta suggerisce inoltre che l'anticorpo monoclonale LFA102, che è stato utilizzato per neutralizzare le funzioni della PRLR nei tumori della mammella e della prostata, non sembra adatto a pazienti con NSCLC che avevano alti livelli di PRL.

È stato riportato che il gene che produce VEGF, gene regolato da STAT3, può promuovere l'angiogenesi nel NSCLC (Wakelee et al., 2014). Goldhar et al. hanno scoperto che l'induzione di VEGF da parte della PRL era PRLR-dipendente in cellule epiteliali mammarie di topo e la somministrazione di PRL ha portato alla trascrizione di VEGF (Goldhar et al., 2005). Nel NSCLC,

il modo in cui la PRL regola il VEGF rimane poco chiaro. Qui, abbiamo scoperto che la sovraregolazione esogena indotta da PRL della proteina VEGF e dei livelli di mRNA era GHR-dipendente; livelli di proteina GHR più elevati hanno portato a livelli più elevati di VEGF promossi da PRL. Inoltre, c'erano correlazioni positive tra i livelli di espressione di PRL intracellulare, GHR e VEGF nei campioni clinici analizzati. I nostri dati implicano che gli alti livelli di PRL intracellulare e GHR possono essere utilizzati come nuovi marcatori diagnostici nel cancro del polmone, e questi marcatori sono positivamente correlati con la regolazione del VEGF. Ci sono molti biomarcatori oggi per gli adenocarcinomi che consentono terapie mirate e se i livelli di PRL sono alti qui, può essere un utile marcatore alternativo nelle cliniche e uno più economico. Il microambiente tumorale gioca un ruolo importante nella sopravvivenza delle cellule tumorali contro la risposta immunitaria. I livelli intracellulari di PRL sono anche un fattore importante nella progressione del cancro del polmone attraverso azioni autocrine o paracrine. Nitz et al. ha scoperto che alcune linee cellulari di cancro al seno secernono PRL e che ciò è correlato alla proliferazione cellulare (Nitze et al., 2013). Nelle cellule T47D, la sovraespressione di PRL ha aumentato la secrezione di PRL, ma ha ridotto il livello proteico di PRLR e la proliferazione cellulare (Nitze et al., 2013).

Abbiamo anche esplorato gli effetti della secrezione di PRL sulle funzioni cellulari, nelle cellule CL1-0 dopo aver silenziato la PRL intracellulare. I risultati hanno mostrato che la PRL era secreta dalle cellule NSCLC e che un livello di proteina PRL più elevato nei tessuti tumorali rispetto ai tessuti normali era associato a bassi tassi di sopravvivenza. C'erano anche relazioni positive tra i livelli di espressione proteica di PRL, o GHR e VEGF. Quando i livelli intracellulari di PRL sono stati abbattuti, i livelli di fosforilazione di JAK2/STAT3 e il livello proteico di GHR/VEGF sono stati regolati, fornendo prove di un meccanismo molecolare che coinvolge JAK2/STAT3. Le osservazioni sulla proliferazione cellulare sottoregolata e la capacità di formazione di colonie cellulari implicano che la PRL autocrina o paracrina influenzi la proliferazione cellulare attraverso la segnalazione GHR/ JAK2/STAT3, che quindi porta a bassi tassi di sopravvivenza nei pazienti con cancro del polmone. Quindi, il presente studio ha suggerito una strategia per ottenere un migliore tasso di sopravvivenza del paziente con cancro del polmone attraverso la soppressione della PRL sia sierica che intracellulare.

È noto che la PRL attiva la segnalazione JAK2/STAT5 e quindi promuove la crescita e la sopravvivenza cellulare nel cancro al seno (Damiano e Wasserman, 2013). Nel presente studio, i livelli di fosfoJAK2 e fosfoSTAT3, ma non di fosfo-STAT5 (dati non mostrati), sono aumentate dopo il trattamento con PRL. STAT5 è riportato correlato all'anti-apoptosi (Sanchez-Ceja et al., 2006). L'aumento delle attività di STAT3 e STAT5 porta a una prognosi sfavorevole nel NSCLC (Sanchez-Ceja et al., 2006; Harada et al., 2014). Nonostante i rapporti per il cancro del polmone (Sanchez-Ceja et al., 2006; Harada et al., 2014), i nostri dati suggeriscono che l'attività di STAT3, non di STAT5, era correlata alla promozione della proliferazione delle cellule NSCLC.

## **Conclusioni**

Sulla base della nostra osservazione, questo è un primo studio sulla delucidazione del meccanismo di promozione indotta da PRL della proliferazione delle cellule NSCLC tramite l'attivazione della via di segnalazione JAK2/STAT3 attraverso GHR. Questo lavoro ha anche mostrato che la PRL è una parte importante del sistema endocrino e la sua secrezione in combinazione con GHR, potrebbe essere un altro indizio di biomarcatori per alcuni pazienti con NSCLC. I livelli della proteina GHR sono stati ridotti dopo aver abbattuto la PRL intracellulare, che ha anche ridotto significativamente l'attività di JAK2 e STAT3 e l'espressione di VEGF. Abbiamo trovato un nuovo meccanismo d'azione della PRL sul cancro del polmone e sul suo microambiente, che potrebbe spiegare gli scarsi tassi di sopravvivenza riportati nei pazienti con cancro del polmone PRL-positivi. I livelli di PRL autocrino e GHR potrebbero diventare bersagli terapeutici nei pazienti con NSCLC.