

**Titolo:** L'espressione e attivazione selettiva dei sottotipi dei recettori della somatostatina induce l'arresto del ciclo cellulare in cellule cancerose - Expression and selective activation of somatostatin receptor subtypes induces cell cycle arrest in cancer cells

**Codice:** SSTR001

**Autore:** Zou Y., et al.

**Data:** 2019

**Rivista:** Oncology Letters 17: 1723-1731

**Argomento:** SSTR

**Accesso libero:** si

**DOI:** 10.3892/ol.2018.9773

**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6341781/>

**Parole chiave:** cancro al seno, somatostatina, analoghi somatostatina, recettori somatostatina, dimerizzazione, arresto del ciclo cellulare

**Tumore:** carcinoma mammario

**Traduzione:** parziale, semplificata

**Punti di interesse:** tutti e 5 i sottotipi di recettori della somatostatina sono espressi anche se in forma variabile in campioni di tessuto di cancro al seno. Con il ligando (analogo della somatostatina) avvengono processi di eterodimerizzazione che attivano il recettore, inducendo la traslocazione citoplasmatica del dimero, indicando il significato funzionale della dimerizzazione del recettore. La dimerizzazione e quindi l'attivazione del recettore porta a inibizione di proliferazione cellulare. La dimerizzazione del recettore tra sottotipi SSTR potrebbe essere un meccanismo generale per la segnalazione SSTR. Inoltre, il cross-talk tra SSTR e altri recettori associati accoppiati con proteine G può essere fondamentale per gli SSTR per conferire i loro effetti specifici nei vari tessuti/cellule

## **Riassunto**

**I recettori della somatostatina (SSTRs) sono recettori di membrana plasmatica accoppiati con proteine G che sono espressi in tessuti normali e tumorali. L'attivazione di SSTRs provoca spesso l'inibizione della proliferazione cellulare e quindi gli analoghi della somatostatina (SSA) sono stati utilizzati nel trattamento del cancro. Tuttavia, i risultati variabili del trattamento SSA sono stati considerati come le conseguenze della perdita di espressione di SSTRs e/o effetti specifici del sottotipo di recettore. Nel presente studio, sono stati studiati i modelli di espressione di SSTR in 160 tessuti tumorali della mammella, e sono stati ulteriormente caratterizzati i meccanismi di attivazione di SSTR e l'influenza sulla proliferazione cellulare.**

**I risultati hanno dimostrato che tutti e cinque i sottotipi SSTR sono espressi a livelli variabili nei tessuti tumorali, con l'istanza di massima espressione positiva determinata per SSTR1 e SSTR4, con livelli di espressione positiva nel 90,0 e 71,3% dei tessuti tumorali, rispettivamente. Immunofluorescenza e co-immunoprecipitazione ha rivelato l'eterodimerizzazione SSTR1/SSTR4, che è stata aumentata in risposta all'attivazione del recettore utilizzando il sottotipo specifico SSA L-803087.**

**La traslocazione di SSTR1/SSTR4 dimeri SSTR1/SSTR4 nel citoplasma al momento dell'attivazione del recettore è stato anche osservato. Inoltre, è stato identificato utilizzando citometria a flusso che co-espressione e l'attivazione di SSTR1 e SSTR4 in MDA-MB-435S cellule ha portato ad una diminuzione della proporzione di cellule in fase S. I risultati del presente studio hanno rivelato che SSTR1 e SSTR4 sono i sottotipi SSTR più frequentemente**

## **espressi nel cancro al seno, e che l'arresto del ciclo cellulare è stato mediato da SSTR1/SSTR4 dimerizzazione / attivazione.**

### Introduzione

I recettori della somatostatina (SST) (SSTR) sono recettori di membrana plasmatica accoppiata con proteine G con due forme di peptidi SST, SS-14 e SS-28, come loro leganti naturali (1). I due peptidi prodotti dalle cellule SST agiscono rispettivamente come neurotrasmettitori o regolatori paracrino/autocrini, attraverso cinque diversi sottotipi di SSTR umani (SSTR1-5), codificati da cinque distinti geni SSTR segregati sui cromosomi 14, 16, 17, 20 e 22, rispettivamente (2). L'attivazione di SSTR comporta spesso l'inibizione della proliferazione e della secrezione cellulare (3). E' generalmente accettato che tutti e cinque i sottotipi SSTR sono coinvolti nella inibizione del percorso adenilato ciclasti-ciclico adenosina 3'5'-monofosfato e stimolare la proteina tirosina fosfatasi (3).

Tuttavia, una serie di effetti dimostrato selettività sottotipo sottotipo, e la segnalazione sottotipo specifico è stato anche riportato (4,5).

Ad esempio, SSTR1, 2, 4 e 5 spesso interferiscono con la via della proteina chinasi mitogena attiva per modulare la proliferazione cellulare, mentre SSTR3 è stato indicato per avere un maggiore potenziale di indurre l'apoptosi (6,7). Inoltre, a causa di più SSTRs essere frequentemente espresso nella stessa cellula, e l'esistenza di dimerizzazione indotta da ligandi proposto per i recettori G-proteine accoppiate, si ipotizza che SSTRs sono funzionalmente ridondanti e agiscono di concerto (8,9).

I livelli di espressione degli SSTRs sono stati determinati in più tessuti umani così come nella maggior parte dei tipi di tumore neuroendocrino e non endocrino, incluso il carcinoma epatocellulare, il cancro al pancreas e il cancro al seno (10-17). L'attivazione di SSTR nei tumori che esprimono SSTR si traduce spesso in una marcata inibizione della proliferazione delle cellule tumorali attraverso attività indirette di inibizione della secrezione dell'ormone della crescita e l'attività diretta attraverso vie di segnalazione SSTR (18). Pertanto, gli analoghi SST e SST (SSA) con una migliore stabilità metabolica sono stati frequentemente utilizzati nel trattamento dei tumori SSTR-positivi (19-22). Tuttavia, i risultati terapeutici dei trattamenti SSA variavano notevolmente a causa della perdita di espressione degli SSTR, dei diversi modelli di espressione degli SSTR e delle ragioni non pienamente comprese (4,23-25).

Nel presente studio, i livelli di espressione dei cinque diversi sottotipi di SSTR sono stati determinati in 160 campioni primari di tumore duttale del seno utilizzando l'immunoistologia. Tutti e cinque i sottotipi SSTR sono stati espressi nei tessuti tumorali. I livelli di espressione di SSTR1 e SSTR4 sono stati rilevati rispettivamente nel 90,0 e nel 71,3% dei tessuti tumorali. I livelli di espressione di SSTR1 e SSTR4 sono stati determinati per essere associati negativamente con la differenziazione delle cellule tumorali, ma erano indipendenti dall'età del paziente e dalla fase tumorale. SSTR1 e SSTR4 sono stati successivamente sovraespressi in colture di cellule MDA-MB-435S, che hanno precedentemente dimostrato di esibire una diminuzione dell'espressione endogena di SSTR (26). La potenziale interazione di SSTR1 e SSTR4 è stata analizzata utilizzando l'immunofluorescenza e la co-immunoprecipitazione. I SSTRs iperespressi sono stati poi attivati con il sottotipo specifico SSA L-803087, che è stato precedentemente identificato per mostrare un'elevata affinità di legame selettivo con SSTR1 e SSTR4 (27). L'influenza dell'espressione dei recettori e l'attivazione sulla proliferazione cellulare è stata ulteriormente studiata utilizzando la citometria a flusso. I risultati del presente studio hanno indicato una eterodimerizzazione indotta da ligandi di SSTR1 e SSTR4, e il significato funzionale della dimerizzazione del recettore nella regolazione della proliferazione cellulare. Le indagini future sulla dimerizzazione dei recettori tra altri sottotipi SSTR e il conseguente effetto sulla proliferazione cellulare forniranno preziosi riferimenti per la selezione di casi di cancro al seno adatti per il trattamento di SSA.

### Discussione

SST è un peptide naturale inibitore ed esercita le sue azioni anti-secretarie/anti-proliferative tramite SSTR, che sono state determinate per essere onnipresenti nei tessuti normali e tumorali. A causa

degli effetti anti-proliferativi della segnalazione SSTR, sono stati sviluppati e spesso utilizzati come trattamento complementare nei farmaci post-chirurgici per un certo numero di tipi di cancro (1), analoghi strutturalmente simili a SST che hanno una maggiore emivita e sono recettori-sottotipo-selettivi. Tuttavia, numerosi studi clinici hanno riportato l'insensibilità al trattamento con SSA e la mancanza di benefici è stata considerata una conseguenza della perdita di espressione degli SSTR (30). Inoltre, erano disponibili informazioni limitate sui modelli di espressione dettagliata degli SSTR in grandi studi clinici. Inoltre, i meccanismi molecolari alla base dell'attivazione dei recettori e l'interazione tra SSTR e altri percorsi di segnalazione sono stati raramente studiati, per quanto ci è dato sapere.

Nel presente studio, è stato studiato il modello di espressione dei cinque sottotipi SSTR in 160 tessuti primari di tumore duttale del seno. I risultati hanno dimostrato che tutti e cinque i sottotipi di SSTR sono stati espressi a livelli variabili nei tessuti del cancro al seno. L'istanza di espressione positiva dei sottotipi SSTR era più alta per SSTR1, seguita da SSTR4, SSTR5, SSTR3 e poi SSTR2. In contrasto con uno studio precedente (31) che indicava che SSTR2 e SSTR3 erano i sottotipi più frequentemente espressi, i livelli di espressione delle proteine SSTR2 e SSTR3 sono stati rilevati solo nel 34,4 e 41,9%, rispettivamente, dei tessuti del tumore al seno nel presente studio. Inoltre, i livelli di espressione delle SSTRs sono stati associati negativamente con la differenziazione del tumore ed erano indipendenti dall'età del paziente. I livelli di espressione positiva di tutti e cinque i SSTRs sono stati diminuiti in tessuti tumorali ben differenziati. Tranne che per SSTR1, i risultati hanno anche indicato che i casi di espressione positiva di SSTR2-4 sono aumentati nelle cellule ER o PR-negative. Questo risultato può non riflettere alcuna associazione tra SSTR e livelli di espressione ER/PR, in quanto può essere una coincidenza di diminuzione dei livelli di espressione di entrambi in cellule tumorali scarsamente differenziate.

Tuttavia, potrebbe essere una vera e propria regolazione dell'espressione SSTR da parte dei recettori ormonali, poiché la secrezione ormonale inibita da SST e l'espressione SSTR1/2 regolata in modo diverso da tamoxifen/estradiolo, come riportato in precedenza (32). Inoltre, studi precedenti hanno dimostrato l'associazione dell'espressione dei sottotipi SSTR e dell'ER nel cancro al seno e negli adenomi pituitari non funzionanti (33,34). La regolamentazione dettagliata dell'espressione SSTR e la potenziale interazione tra SSTR e recettori ormonali richiedono ulteriori indagini.

A causa del modello di espressione degli SSTR nei tessuti del tumore al seno, la potenziale dimerizzazione dei recettori tra i sottotipi SSTR più frequentemente espressi è stata ulteriormente studiata utilizzando l'immunofluorescenza. Le cellule MDA-MB-435S sono state originariamente caratterizzate come una linea cellulare del tumore al seno e sono state successivamente identificate per essere contaminate in modo incrociato con le cellule del melanoma M14 (35). Tuttavia, a causa della loro espressione endogena negativa di SSTR, le cellule MDA-MB-435S sono state selezionate per l'analisi della potenziale interazione tra SSTR1 e SSTR4 in vitro, per eliminare l'interferenza di altri sottotipi di SSTR endogeno. L'immunofluorescenza con microscopia confocale ha rivelato un'associazione della distribuzione cellulare di SSTR1 e SSTR4 sovraespressi.

Inoltre, la distribuzione associata di SSTR1 e SSTR4 è stata significativamente aumentata al momento dell'attivazione del recettore, indicando la dimerizzazione del recettore come meccanismo di attivazione del recettore. L'interazione diretta tra SSTR1 e SSTR4 è stata ulteriormente confermata utilizzando la co-immunoprecipitazione, che ha anche indicato che la dimerizzazione del recettore è stato in particolare indotto dal sottotipo specifico SSA L-803087. Inoltre, invece della distribuzione plasmatica predominante associata alla membrana plasmatica, L-803087 ha indotto la traslocazione citoplasmatica di SSTR1/SSTR4, indicando il significato funzionale della dimerizzazione del recettore.

La potenziale influenza della dimerizzazione SSTR1/SSTR4 indotta da SSA sulla proliferazione cellulare è stata ulteriormente studiata. Utilizzando la citometria a flusso, i risultati del presente studio hanno indicato che la sovraespressione di SSTR1 e SSTR4 ha avuto un'influenza limitata sulla proliferazione cellulare, rispetto alle cellule di controllo trasfettate con il vettore solo. Tuttavia, la proliferazione delle cellule che sovraesprimono SSTR1 e SSTR4 è stata significativamente inibita su recettore-sottotipo specifico SSA, L-803087, l'attivazione, indicando che l'inibizione della

proliferazione cellulare è stata mediata dalla dimerizzazione del recettore / attivazione. La dimerizzazione del recettore è stata identificata come comune per i recettori accoppiati alle proteine G (36). Dimerizzazioni sono state dimostrate tra sottotipi SSTR, come SSTR5 dimerizzato con SSTR1 e SSTR2, ma non SSTR4, così come tra SSTR e altri recettori accoppiati alle proteine G, tra cui il recettore del fattore di crescita epidermico e  $\beta$  1 -recettore adrenergico (8,20,37-39). A causa dei risultati del presente studio e dei dati precedenti, è stato proposto che la dimerizzazione del recettore tra sottotipi SSTR potrebbe essere un meccanismo generale per la segnalazione SSTR (8,20,37-39).

Inoltre, il cross-talk tra SSTR e altri recettori associati accoppiati con proteine G può essere fondamentale per SSTR per conferire i loro effetti specifici di tipo cellulare. Ulteriori indagini sull'interazione tra altri sottotipi SSTR e la loro funzione saranno utili per comprendere gli effetti cellulari specifici del sottotipo e i meccanismi dei percorsi di segnalazione SSTR, che saranno utili per ottimizzare il trattamento SSA e la selezione dei pazienti adatti al trattamento SSA.