



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in
Patologia osteo-oncologica
XXV ciclo anno 2010

**Fibroblasti associati al tumore: componenti principali
del microambiente tumorale in grado di promuovere
crescita ed invasione delle cellule tumorali**

Dott. Cirino Amato

Coordinatore
Prof. Giuseppe Tonini

Tutore
Prof. Vincenzo Denaro
Dott.ssa Maria Musumeci

08 Luglio 2013

INDICE

SOMMARIO

1 INTRODUZIONE

1.1 I tumori.....	pag 8
1.2 Il processo metastatico.....	10
1.3 Il microambiente tumorale.....	11
1.4 I fibroblasti associati al tumore.....	12
1.5 Tumore della prostata e microambiente.....	14
1.6 La localizzazione ossea.....	16
1.7 Le molecole segnale nel crosstalk tra tumore e stroma.....	17
1.8 Il <i>signaling</i> del TGF- β	19
1.9 Il <i>signaling</i> di STAT3.....	22

2 SCOPO DEL LAVORO

3 MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari e trattamento con TGF- β	30
3.2 Citofluorimetria e immunofluorescenza.....	30
3.3 Western Blotting.....	31
3.4 siRNA e inibizione di STAT3.....	32
3.5 Wound assay.....	32
3.6 Analisi statistica.....	33

4 RISULTATI

4.1 Pattern di espressione di proteine in CAF.....	35
4.2 Il TGF β modula proteine oncogeniche nei CAF.....	37
4.3 Il TGF- β aumenta l'attivazione dei CAF <i>up</i> -regolando il CD90.....	38
4.4 Stat-3 è attivato in fibroblasti associati al tumore.....	39
4.5 Il silenziamento di STAT3 nei CAF riduce la capacità di supporto dei CAF sulle cellule tumorali.....	41

6 DISCUSSIONE

7 BIBLIOGRAFIA

Tesi di dottorato in Patologia Osteoncoologica, di Cirino Amato,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 08/07/2013.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte

SOMMARIO

E' ormai noto che le cellule tumorali non agiscono da sole nella formazione del tumore ma sono in grado di intrecciare rapporti stretti con le cellule del microambiente. Quest'ultime costituiscono le cellule accessorie del tumore in grado di stimolare la crescita, la migrazione e la metastatizzazione delle cellule tumorali. I fibroblasti associati al tumore (CAF) rappresentano la maggioranza delle cellule nello stroma del tumore e sono stati proposti come bersaglio per la terapia antitumorale. Queste cellule contribuiscono allo sviluppo e alla progressione del cancro. Citochine secrete da cellule tumorali agiscono sulle cellule riceventi stromali che, a sua volta, rispondono con la produzione di fattori di crescita e angiocitochine. In tale scenario, il fattore di crescita trasformante (TGF- β) è un effettore molecolare importante nella mediazione della comunicazione tra cellule stromali e tumore. Il TGF- β è una citochina multifunzionale coinvolta in molti processi cellulari tra cui la proliferazione, la differenziazione durante lo sviluppo embrionale, l'adesione cellulare e la guarigione della ferita. La complessità biologica dell'attività del TGF- β viene ulteriormente evidenziata quando si considera un certo grado di tessuto-specificità. Anche se largamente studiato nelle malattie neoplastiche, l'attivazione del TGF- β nelle cellule stromali, che regolano la progressione del tumore, deve essere ancora completamente chiarito. Qui, abbiamo dimostrato che l'attività del TGF- β sui CAF della prostata porta ad un *up*-regolazione di un set di proteine oncogeniche.

La possibilità di identificare i CAF, attraverso marcatori specifici, può facilitare gli studi funzionali volti a scoprire il loro contributo nelle malattie neoplastiche. Studi recenti focalizzano la proteina di membrana CD90 (Thy-1) come un marcatore di una sotto popolazione di CAF. Esso è stato proposto come *biomarker* per l'isolamento dei CAF. Il CD90 è una glicoproteina di ancoraggio di 25-37 kDa coinvolta nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. È stato riportato che l'espressione del CD90

aumenta nello stroma del tumore della prostata rispetto a quella del tessuto normale o iperplasia prostatica benigna.

La famiglia del trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione (STAT) è coinvolta in una grande varietà di processi biologici come la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la progressione tumorale. STAT3 è stato classificato come un oncogene data la sua capacità di mediare la trasformazione oncogenica, ed è comunemente attivato nel cancro della prostata. Inoltre, elevati livelli della forma attiva fosforilata (pSTAT3) sono associati a fibrosi nel rene e polmone, mentre la sua inibizione attenua questa condizione. STAT3 viene attivato da varie citochine e fattori di crescita compreso il TGF- β , anche se gli effetti del TGF- β su STAT3 possono essere inibitori, la prevalenza di effetti attivatori o inibitori sembra essere tessuto specifica e dipendente dal contesto. Una volta fosforilato, STAT3 forma un di-dimero che trasloca nel nucleo dove si lega al DNA e regola diversi geni bersaglio, tra cui anche microRNA.

Qui, stiamo dimostrando che il TGF- β aumenta l'attivazione di STAT3 nei CAF, portando ad una generale up-regolazione di oncogeni bersaglio. Inoltre qui abbiamo dimostrato che l'inibizione di STAT3 tramite utilizzo di un inibitore specifico diminuisce la popolazione dei CAF e li rende meno "attivi". Tutto ciò si riflette in una riduzione della capacità di supporto dei CAF alla migrazione e proliferazione delle cellule tumorali.

Pertanto, sia l'inibizione farmacologica di STAT3 o del TGF- β può essere sfruttata anche per il *targeting* dei CAF limitando di conseguenza il supporto al tumore. Inoltre, l'identificazione di microRNA modulati da STAT3, in quei tumori in cui il TGF- β e STAT3 guidano il supporto al tumore mediato dai CAF può essere utile come test farmaco dinamico per monitorare l'inibizione efficace del *pathway* del TGF- β o di STAT3.

Tesi di dottorato in Patologia Osteoncoologica, di Cirino Amato,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 08/07/2013.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte

INTRODUZIONE

1.1 I tumori

Il numero di cellule che compongono un organismo deve necessariamente essere costante al fine di mantenere la dimensione, la struttura, la funzionalità peculiari di ogni tessuto. Ciò è garantito dalla regolazione molto fine della proliferazione cellulare e dalla morte cellulare. Tuttavia, se una cellula perde tale controllo, può acquisire la capacità di entrare in mitosi moltiplicandosi in modo indefinito nel tempo secondo una curva di crescita esponenziale. Inoltre, tale capacità viene trasmessa alle cellule figlie creando in questo modo una massa cellulare detta *tumore*.

I tumori che rimangono localizzati sono definiti benigni, mentre quelli che hanno la capacità di colonizzare l'intero organismo o un tessuto vengono detti maligni.

Nei tumori benigni le cellule sono morfologicamente simili al tessuto da cui originano, ma ne sono separate da una capsula fibrosa entro cui il clone cellulare si espande rispettando i limiti. Questo tipo di tumore può interferire con la normale funzione del tessuto in cui si trova localizzato e può secernere sostanze biologicamente attive (ormoni), può essere asportato chirurgicamente senza ulteriori conseguenze per il paziente (1).

I tumori maligni al contrario, non rimangono incapsulati dal connettivo e le cellule che li costituiscono sono in grado di invadere tessuti differenti. A tal fine, le cellule neoplastiche estendono delle propaggini citoplasmatiche che si protendono come le chele di un granchio, da cui l'uso comune del termine *cancro*. Le cellule cancerose inoltre sono in grado di raggiungere tessuti lontani dal tumore primario, sfruttando la circolazione sanguigna e/o linfatica, la contiguità tissutale oppure il dotto escretore di una ghiandola esocrina. Una volta raggiunto il tessuto bersaglio danno luogo a colonizzazioni secondarie definite *metastasi* (2).

I tumori maligni vengono classificati in due categorie principali sulla base della derivazione embrionale del tessuto: i carcinomi derivano dalla

proliferazione di cellule epiteliali, mentre i sarcomi originano dai tessuti connettivali o muscolari (1).

Quei tumori che non sono riconducibili ad una di queste due grandi categorie comprendono le varie leucemie ed i derivanti da cellule ematopoietiche e i tumori che originano dalle cellule del sistema nervoso.

Il grado di malignità di un tumore dipende dalle alterazioni casuali che una cellula somatica può subire. Se l'effetto della mutazione è letale, allora il clone cellulare viene perso e quindi il tumore non progredisce; se, al contrario, l'alterazione risulta essere selettivamente vantaggiosa per la proliferazione, si genera una sottopopolazione la quale, proliferando, tende a sostituirsi al clone originale e ad assumere progressivamente un comportamento più aggressivo.

Data la loro variegata origine, i tumori possono colpire qualsiasi essere umano, anche se per particolari tumori sono stati osservati differenti livelli di incidenza rispetto alla razza, gli stili di vita, al sesso e all'età dei soggetti colpiti. Il cancro al polmone, per esempio è diffuso con un'elevata frequenza nella popolazione afro-americana degli USA, mentre l'area geografica con incidenza più bassa sembra l'India. Il carcinoma della mammella si presenta ad alta frequenza nelle donne hawaiane, mentre è poco diffusa in Israele. Il melanoma è molto sviluppato in Australia, ma risulta a bassa frequenza in Giappone. È stato anche osservato che le popolazioni nomadi tendono a presentare con più elevata incidenza il cancro tipico del paese in cui si stanziano, suggerendo che la diversa incidenza riscontrata per i diversi tipi di tumore sia dovuta in larga parte a fattori ambientali oltreché ad una predisposizione genetica.

Tali osservazioni hanno permesso di ipotizzare che circa 80-90% dei tumori potrebbe essere evitata adottando uno stile di vita più salutare, sebbene risulti difficile individuare diversi fattori di rischio specifici così come i loro meccanismi d'azione.

1.2 Il processo metastatico

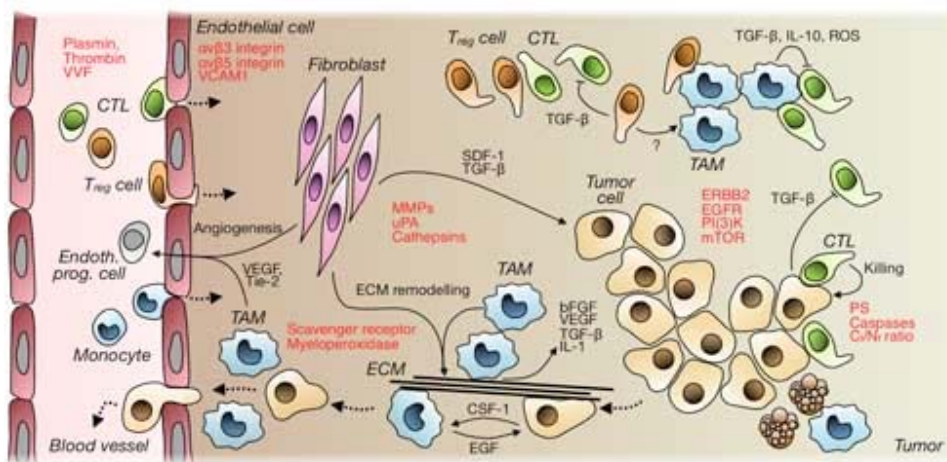
La metastasi è una colonia tumorale secondaria che si origina in seguito alla migrazione delle cellule neoplastiche dal focolaio primario ad altri organi anche molto distanti. Le cellule tumorali primarie sono dotate di una mobilità relativamente modesta e per migrare a grande distanza si servono delle correnti biologiche, linfa e sangue, permettendo così una distinzione tra metastasi linfogene e ematogene.

Nel primo caso delle metastasi linfogene le cellule tumorali si localizzano principalmente nei linfonodi regionali (RLNs), i quali fungono da barriera contro la diffusione delle cellule tumorali. Queste cellule possono raggiungere organi distanti solo in seguito al rilascio graduale nei dotti linfatici e poi nel circolo sanguigno. Questa sequenzialità di eventi è suggerita dal fatto che, in pazienti affetti da tumore e con linfonodi regionali contenenti cellule neoplastiche, l'asportazione chirurgica degli stessi, si correla con una diminuzione delle metastasi sistemiche ed un aumento della sopravvivenza. Le metastasi ematiche, al contrario, si creano per rilascio delle cellule tumorali direttamente nei vasi sanguigni ed interessano principalmente gli organi che svolgono funzione di filtro quali il fegato ed il polmone.

L'insorgenza e lo sviluppo della metastasi risulta essere il più grande ostacolo nelle terapie antitumorali, a causa sia dell'impossibilità di poter controllare la diffusione delle cellule neoplastiche sia di individuare precocemente la formazione dei foci secondari, anticipando così la manifestazione dei sintomi clinici, rendendo inefficiente la terapia chirurgica e/o farmacologica. Proprio per questo motivo la lotta contro il cancro si concentra soprattutto nello studio dei meccanismi coinvolti nella progressione tumorale per arrivare a bloccare almeno uno degli stadi che la determinano.

1.3 Il microambiente tumorale

Le cellule tumorali non agiscono sole nella formazione del tumore, ma collaborano con il microambiente circostante costituito da fibroblasti residenti, cellule endoteliali, periciti, leucociti e matrice extracellulare (3).



Da center for system biology

È ormai consolidato che lo stroma tumorale partecipa attivamente nell'evoluzione del tumore. Con l'invio di segnali chimici, i tumori possono cambiare il loro microambiente ed il microambiente può cambiare il tumore. Questa comunicazione (spesso chiamata cross-talk) tra un tumore e le cellule del microambiente è fondamentale nella formazione del tumore, nella crescita e nella progressione.

Grazie a queste nuove conoscenze, i ricercatori hanno cominciato a studiare i trattamenti anti tumorali tenendo conto come obiettivo sia il cancro e sia il microambiente circostante.

Approfondimenti in questo campo ci aiutano a capire la struttura di base delle reti di segnalazione cellulare e come i cambiamenti possono influenzare la trasmissione e il flusso di informazioni.

1.4 I fibroblasti associati al tumore

I fibroblasti si trovano in proporzioni diverse nel tessuto tumorale e costituiscono in molti casi la popolazione preponderante delle cellule dello stroma del tumore. Il termine " fibroblasti associati al cancro" (CAF) includono: le cellule con somiglianze con i fibroblasti, i miofibroblasti, i cui ruoli biologici e le proprietà differiscono notevolmente rispetto ai fibroblasti che derivano dai tessuti normali. I miofibroblasti sono identificabili per la loro espressione di α -actina del muscolo liscio (SMA). Essi sono rari nei tessuti epiteliali sani, sebbene alcuni tessuti, come il fegato e il pancreas, contengano un numero apprezzabile di cellule SMA-positive.

I miofibroblasti aumentano in abbondanza nelle ferite e si trovano anche in siti d'inflammatione cronica. Sebbene vantaggiosi per la riparazione dei tessuti, i miofibroblasti sono patologici nell'inflammatione cronica, contribuendo alle fibrosi osservate in tessuti come polmone, rene e fegato.

I miofibroblasti reclutati nei tessuti tumorali sono stati associati alla progressione del fenotipo tumorale, in particolare alla proliferazione delle cellule del cancro, all'angiogenesi e all'invasione e metastasi. Citochine secrete da cellule tumorali agiscono sulle cellule riceventi stromali che, a sua volta, rispondono con la produzione di fattori di crescita e angiocitochine. In questo contesto, il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) è un effettore molecolare importante nella mediazione della comunicazione tra cellule stromali e tumore (4-8). Studi recenti focalizzano la proteina di membrana CD90 (Thy-1) come un marcatore di una sotto popolazione di CAF. Il trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione (STAT3) viene attivato da varie citochine e fattori di crescita compreso il TGF- β , e in alcuni casi, elevati livelli della forma attiva fosforilata

(pSTAT3) sono associati a fibrosi nel rene e polmone, mentre la sua inibizione attenua questa condizione (9-14). La capacità dei CAF di promuovere il tumore è stata definita, in gran parte, mediante il co-inoculo, in topi, con cellule tumorali, e più recentemente in topi a rischio di tumore attraverso perturbazione genetica e farmacologica delle loro funzioni (15-20). Poiché secernono una varietà di elementi della matrice extracellulare e fattori di crescita e citochine, i CAF sono implicati nella formazione dello stroma desmoplastico che caratterizza molti carcinomi avanzati. Anche se la gamma completa di funzioni nella patogenesi tumorale da parte dei CAF rimane da chiarire. Ad oggi sembra chiaro che diversi tipi di cellule stromali sono importanti poiché contribuiscono attivamente alla formazione e alla resistenza ai diversi agenti chemioterapici. Infatti, potrebbe risultare di fondamentale importanza analizzare l'azione di agenti anti neoplastici in sistemi di co-coltura di cellule tumorali e fibroblasti associati al tumore, poiché queste cellule sono in grado di conferire resistenza e determinare il fallimento di alcune terapie.

I vari tipi di cellule stromali che costituiscono il microambiente tumorale possono derivare dal tessuto normale adiacente, il serbatoio più evidente di tali tipi di cellule. Tuttavia, negli ultimi anni, il midollo osseo è stato indicato come fonte di cellule stromali associate al tumore (21-22). Cellule staminali mesenchimali e progenitrici sono state trovate in tumori come transito dal midollo, dove possono differenziarsi in vari tipi ben caratterizzati di cellule stromali. Alcuni di queste cellule possono persistere anche in uno stato indifferenziato o parzialmente differenziato, esibendo le funzioni della loro progenie più differenziata.

La provenienza di cellule stromali dal midollo osseo è stata dimostrata utilizzando topi portatori di tumore in cui le cellule del midollo osseo e quindi la loro progenie disseminata sono selettivamente marcate con un gene *reporter* come la proteina fluorescente verde (GFP). Mentre è stato estensivamente dimostrato che le cellule immunitarie di tipo infiammatorio

derivano dal midollo osseo e recentemente che i progenitori di periciti e di vari sottotipi di CAF possono anche provenire dal midollo osseo, la prevalenza e l'importanza funzionale di progenitori endoteliali formanti la rete di vasi che circonda i tumori è attualmente irrisolto (21-24). L'insieme di queste diverse linee di evidenza indica che le cellule stromali associate al tumore possono derivare, per supportare il tumore in crescita, dalle cellule stromali preesistenti, dalla differenziazione in situ di cellule staminali progenitrici derivati dal tessuto normale, o tramite richiamo dal midollo osseo. Risulta, comunque, di notevole importanza chiarire e investigare quali segnali possano essere coinvolti nella migrazione e nella differenziazione di cellule accessorie al tumore e come questi segnali possono in qualche modo essere interrotti.

1.5 Tumore della prostata e microambiente

Il tumore alla prostata è la più comune neoplasia della popolazione maschile occidentale e la seconda causa di morte oncologica dopo il tumore al polmone (25). In particolare ogni anno in Italia fra i 40.000 e i 45.000 uomini sono colpiti dal tumore prostatico e 7.000 muoiono a causa di questo tumore (26).

Il microambiente tumorale comprende fibroblasti, muscolo liscio, nervi, vasi sanguigni, e componenti del sistema infiammatorio/immunitario. Mentre la muscolatura liscia è il tipo predominante di cellule stromali associato con l'acino normale della prostata, i fibroblasti e i miofibroblasti sono associati con le cellule tumorali e sono cellule di spicco della progressione del cancro (27,19). I CAF sono stati isolati da tessuto tumorale di pazienti affetti da cancro e sono elementi importanti per la crescita tumorale e nella progressione (28). Diversi studi suggeriscono che queste cellule vengono reclutate o attivate dopo una lesione e che tale stroma reattivo fornisce i segnali oncogenici che promuovono la tumorigenesi (29). Il ruolo del CAF

nella carcinogenesi è stato esaminato in alcuni studi in cui si è visto che sono in grado di promuovere carcinogenesi in BPH1, una linea di cellule epiteliali della prostata (30,31).

Oltre la chirurgia o la radioterapia, la terapia ormonale è una delle modalità principali di trattamento. Per gli uomini con malattia metastatica, la chemioterapia fornisce un significativo vantaggio di sopravvivenza. Di conseguenza, nuove opzioni di trattamento sono state attivamente proposte per estendere la sopravvivenza dei pazienti affetti da cancro metastatico. Tuttavia recentemente si è aperta una nuova visione del cancro che considera come componente molto importante le cellule del microambiente tumorale che forniscono sia il supporto e favoriscono probabilmente la capacità migratoria delle cellule tumorali. E' ad oggi noto che le cellule del microambiente tumorale conferiscono resistenza alle cellule tumorali e di conseguenza molte terapie risultano inefficaci. Risulta utile approfondire le conoscenze su quali cellule partecipano attivamente alla progressione tumorale, quindi isolare queste cellule e valutare la resistenza conferita alle cellule tumorali. E' comune la ricerca di una terapia efficace per il carcinoma metastatico della prostata. Considerare il microambiente come target terapeutico evidenzia nuove opzioni di trattamento e offre prospettive future di terapia del cancro alla prostata.

Le interazioni tumore-stroma sono fondamentali per lo sviluppo della prostata normale e la progressione neoplastica della prostata. È stato dimostrato che lo stroma fibromuscolare e i fibroblasti stromali svolgono un ruolo regolatore durante lo sviluppo della prostata e nella carcinogenesi prostatica. In diversi studi è stato dimostrato che il mesenchima del seno urogenitale (UGM) o fibroblasti stromali embrionali o adulti guidano la crescita dell'epitelio urogenitale (UGE) e del cancro della prostata (32-36). Alcuni studi indicano che il *signaling* degli androgeni proveniente dallo stroma è critico per lo sviluppo e la differenziazione dell'epitelio prostatico normale (37). La partecipazione dei fibroblasti stromali della prostata nella

progressione del cancro, è stato dimostrato utilizzando modelli cellulari di ricombinazione (35,38,39). Specificamente, la progressione del cancro della prostata da androgeno-dipendente a androgeno-indipendente e l'acquisizione del fenotipo metastatico all'osso o ai tessuti molli può essere raggiunto attraverso interazioni cellulari tra cellule tumorali e fibroblasti stromali organo-specifici incluso cellule stromali di prostata o ossee nel topo *in vivo* o quando in interazione in sistemi di co-coltura tridimensionale (40-43). Questi risultati, considerati nel loro insieme, hanno sottolineato l'importanza del ruolo del microambiente stromale tumorale nella progressione del cancro alla prostata e di conseguenza hanno ampliato le conoscenze per cui la terapia risulta fondamentale quando viene considerata come *co-targeting* tumorale e stromale.

Cellule stromali che circondano le cellule tumorali, inclusi i fibroblasti stromali, cellule endoteliali e cellule infiammatorie nei siti metastatici hanno dimostrato di esercitare un'azione direttiva sulle cellule tumorali modulando reciprocamente la crescita delle cellule cancerose e la loro migrazione, invasione e metastasi. Perdite di connessione nella funzione delle cellule stromali o di osso e interruzione della loro comunicazione con le cellule tumorali potrebbe avere un impatto significativo nella crescita e la progressione del cancro alla prostata. La ricerca futura sui mediatori specifici e le vie di segnalazione cellulare che regolano la comunicazione reciproca cellulare tra le cellule tumorali e il loro microambiente potrebbe ulteriormente cambiare in modo significativo la nostra capacità conoscitiva sulla formazione del cancro e la sua progressione in metastasi.

1.6 La localizzazione ossea

Il carcinoma prostatico è caratterizzato da una particolare propensione a metastatizzare a livello scheletrico. Più dell'80% dei pazienti con malattia metastatica presenta lesioni secondarie scheletriche (26).

Le metastasi ossee da tumore della prostata sono causa di importanti complicanze (SRE: Skeletal Related Events), con conseguente peggioramento della qualità di vita ed incremento della mortalità (44). Gli eventi scheletrici correlati sono l'ipercalcemia maligna, il dolore osseo, le fratture patologiche e le compressioni midollari spinali che il più delle volte necessitano di trattamento radioterapico e chirurgico. Gli SREs peggiorano la qualità di vita dei pazienti e aumentano significativamente il rischio di morte.

L'efficacia della terapia delle metastasi ossee viene misurata in base alla capacità di ridurre l'incidenza e/o ritardare la comparsa degli SRE, come dimostrato mediante obiettivi specifici di efficacia in ambito di studi randomizzati di fase III (45). La qualità di vita deve comunque essere sempre considerato un obiettivo prioritario nel misurare l'efficacia di qualunque terapia, in particolare per i trattamenti palliativi.

Nel carcinoma prostatico con metastasi ossee è stata da tempo dimostrata una correlazione tra sopravvivenza e l'estensione della disseminazione scheletrica all'esordio.

La parola metastasi non deve essere considerata come sinonimo di condanna a breve tempo, ma sinonimo di malattia con dignità autonoma e problematiche terapeutiche multidisciplinari ed aspettativa di vita a volte lunga.

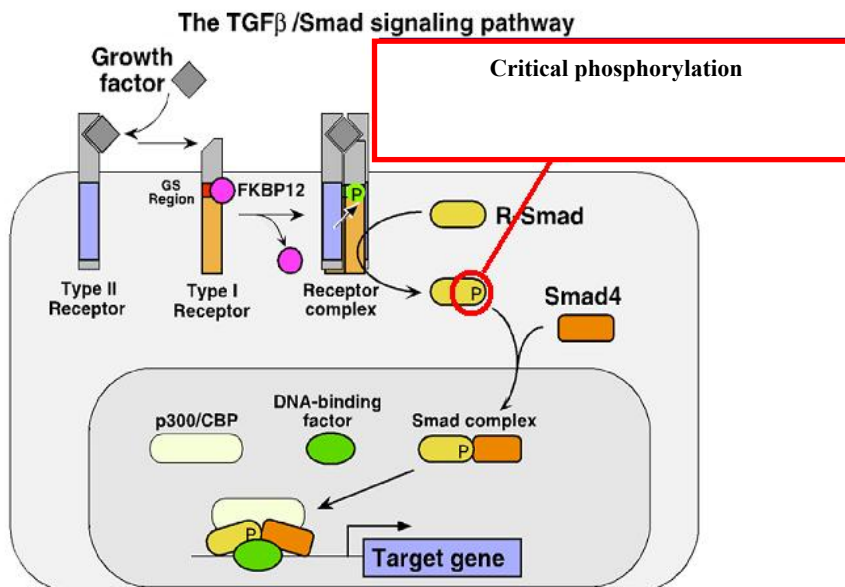
1.7 Le molecole segnale nel crosstalk tra tumore e stroma

La convinzione che le cellule tumorali sono i dittatori unici di se stessi è stato rivisto. Al suo posto sono state evidenziate le principali caratteristiche delle cellule tumorali, vale a dire l'autosufficienza nei segnali di crescita, l'insensibilità ai segnali anticrescita e di auto-rinnovamento, l'evasione dell'apoptosi, l'illimitato potenziale di riproducibilità, l'angiogenesi, l'invasione e metastasi, risultato dei segnali eterotipici delle cellule tumorali

con il loro microambiente (3). Ma come fanno le cellule tumorali a influenzare le cellule normali e ad abbandonare le loro attività omeostatiche e sostenere la natura neoplastica del tumore? Ovviamente, ci deve essere un metodo di comunicazione tra le cellule tumorali e il loro microambiente. La diafonia dinamica tra cellule tumorali e le cellule normali nel microambiente è un punto cruciale nella progressione della malattia. Un modo di comunicazione cellulare è attraverso la secrezione di molecole di segnale autocrine e paracrine. I CAF presentano notevoli differenze nei profili di espressione genica rispetto alla loro controparte normale ed è stato dimostrato che la loro presenza può predire la progressione del cancro della prostata (46). E' stato, dimostrato il ruolo dei fattori solubili stromali come VEGF, bFGF, HGF / SF, TGF- β , IGF-1, IL-6 e KGF, e la loro interazione con i recettori presenti sulle cellule tumorali. Questi studi evidenziano le interazioni bidirezionali e la co-evoluzione di tumore-stroma nella progressione del cancro (47-48). Le terapie che mirano a bloccare molti dei fattori stromali sono state testate in modelli preclinici e in studi clinici per eliminare o ritardare la progressione del cancro alla prostata e altri tumori solidi verso il fenotipo metastatico. Recentemente è stato messo in luce che le molecole secrete non si limitano più a citochine, chemochine, fattori di crescita e molecole proteiche, ma ora includono anche piccoli RNA, chiamati microRNA (miRNA) (49). Essi sono regolatori pleiotropici di espressione genica che regolano diversi processi cellulari normali e giocano un ruolo nella progressione della malattia, in particolare nel cancro. Sono spesso disregolati nel cancro, con conseguente alterata espressione che in alcuni casi è stata correlata con gli esiti clinici dei pazienti. Inoltre, una serie di studi recenti hanno messo in luce l'uso dei miRNA come biomarcatori non invasivi per la diagnosi e la prognosi del cancro. Tuttavia, la comprensione delle interazioni cellulari nel microambiente attraverso lo studio dei miRNA differenzialmente espressi è appena iniziata ed è tutta da chiarire.

1.8 Il *signaling* del TGF- β

Il fattore di crescita trasformante beta (TGF β) è coinvolto in molti processi cellulari tra cui la crescita cellulare, la differenziazione cellulare, l'apoptosi, l'omeostasi cellulare e altre funzioni cellulari. Nonostante la vasta gamma di processi cellulari che il TGF β regola, il meccanismo è relativamente semplice. La superfamiglia di ligandi TGF β si legano ad un recettore di tipo II, che recluta e fosforila il recettore di tipo I. Il recettore di tipo I fosforila i fattori SMADs (R-SMADs) che possono legarsi con SMAD4. Complessi R-SMAD/SMAD4 si accumulano nel nucleo dove agiscono come fattori di trascrizione e partecipano alla regolazione dell'espressione dei geni bersaglio (50).



Il TGF- β può sia indurre che sopprimere la differenziazione e la tumorigenesi in modo dose-dipendente e legato al contesto (51). La perdita del recettore del TGF- β di tipo II (TGF β R2) è stata osservata nello stroma di oltre il 60% dei pazienti con cancro alla prostata (52). Cambiamenti nell'attività del recettore del TGF- β in sottopopolazioni fibroblastiche possono avere effetti profondi sulla morfologia dell'epitelio adiacente. Studi in vitro hanno dimostrato che il TGF- β stimola la differenziazione fenotipica dei fibroblasti in miofibroblasti (53) e regola l'espressione di componenti della matrice extracellulare (54). Inoltre, l'iniezione sottocutanea di TGF- β è sufficiente ad indurre una reazione stromale caratterizzata dalla differenziazione delle cellule stromali in miofibroblasti, una maggiore produzione di collagene, e stimolazione dell'angiogenesi (55, 56). Elevati livelli di TGF- β stimolano la crescita tumorale in vivo (57-60). Il TGF- β è sovraespresso in molti tumori umani, compreso il carcinoma prostatico (61-63), e sembra probabile che l'aumento di questo fattore promuova la formazione di stroma reattivo pro-tumorigenico.

L'eccessiva e prolungata produzione di TGF- β è stata implicata in varie malattie fibroproliferative, come la sclerodermia, sclerosi epatica e fibrosi polmonare interstiziale (64-67). Studi su cheloidi e cicatrici ipertrofiche hanno anche mostrato un'aumentata espressione del TGF- β in queste lesioni (68). Soprattutto, l'espressione del TGF- β è elevato in carcinomi e malattie proliferative tra cui l'iperplasia prostatica benigna, il cancro della prostata e la prostatite (69-72). Inoltre, ciascuno di questi disturbi è associato con infiammazione, proliferazione e rimodellamento del tessuto alterato.

In tessuti normali per esempio, il TGF- β esercita un effetto anti-proliferativo ed apoptotico su cellule epiteliali, inoltre facilita le interazioni tra fibroblasti e cellule epiteliali per sopprimere ulteriormente l'iniziazione del cancro (53). Paradossalmente, in tumori avanzati le proprietà anti neoplastiche del TGF- β non sono evidenti anzi esso diventa un fattore significativo

nell'indurre la transizione epitelio mesenchima, che di solito è associata con la progressione del cancro (73). Quindi in breve sembra che il TGF- β abbia un effetto inibitorio sull'epitelio normale e invece nelle cellule tumorali intervenga bloccando l'arresto del ciclo cellulare inducendo la transizione epitelio-mesenchima, che di solito è associata con il cancro. L'azione del TGF- β sembra essere critica per il mantenimento della biologia stromale e dei tessuti portando ad un'omeostasi complessiva. Alcuni studi hanno dimostrato che un'elevata espressione di Wnt3a, in fibroblasti dove il recettore β -2 del TGF- β non funziona, stimola la crescita tumorale (52). Studi più recenti hanno dimostrato che un mix di fibroblasti con il recettore del TGF- β non funzionante e di fibroblasti con il recettore intatto portavano ad un'induzione maggiore dell'adenocarcinoma (74,75). Alcuni studi precedenti hanno dimostrato che cellule stromali/fibroblasti promuovono angiogenesi tumorale quando inoculate in topi insieme a cellule umane di cancro della prostata, mentre il co-inoculo con cellule stromali *null* per il TGF- β comporta una ridotta massa tumorale e una diminuita angiogenesi (76-79). Questo è coerente con molte relazioni che dimostrano che il TGF- β può stimolare l'angiogenesi, alterare la sorveglianza immunitaria, e indurre le cellule stromali tumorali a secernere fattori di crescita e proteine della matrice (80). Di conseguenza, la differenza nell'attività del TGF- β e la funzione nei tessuti normali e tumorali è complicata e talvolta può sembrare paradossale.

Il TGF- β regola anche le funzioni chiave del sistema immunitario che influenzano la promozione del tumore. Va notato che il TGF- β 1 è un fattore chiave rilasciato dalle piastrine nei siti di lesione, dove regola sia le risposte infiammatorie e l'angiogenesi (81,82). Il TGF- β può compromettere le vie di segnale più note e mediare una rapida modulazione delle cellule immunitarie ospite con funzione chemiotattica, e indurre fibrosi. Anche in questo caso, il TGF- β mostra molteplici funzioni che possono sembrare paradossali. Storicamente, il TGF- β è stato conosciuto per essere

chemoattrattivo per le cellule immunitarie, in particolare monociti e neutrofili (83). Considerando che tali popolazioni cellulari sono fondamentali per il mantenimento di un ambiente relativamente asettico durante la guarigione della ferita primaria nei tessuti normali, studi sul microambiente tumorale suggeriscono che il compartimento mieloide genera, quando stimolato, la migrazione di macrofagi associati al tumore (TAM) che hanno un ruolo nel promuovere la crescita del tumore e delle metastasi (84,85). Nello sviluppo del cancro della prostata, l'iperespressione del TGF- β 1 è stato osservato nei siti iniziali del carcinoma alla prostata ed è associato ed è stato associato a difetti di integrità degli acini prostatici (86). Il processo di adattamento in cui fibrosi e infiammazione coordinano e partecipano alla formazione ed alla progressione tumorale ha aperto la strada a nuove conoscenze nell'ambito della patogenesi del tumore che diventa un evolversi di connessioni che coinvolgono moltissimi tipi di cellule diverse tra di loro ma tutte indirizzate a supportare le cellule tumorali. In particolare il ruolo del TGF- β nei meccanismi dell'omeostasi ad esso correlato sono importanti per comprendere il ruolo di questo fattore nella progressione del tumore della prostata. La comprensione di queste interazioni è importante per lo sviluppo di nuovi bersagli terapeutici che volgano a una terapia mirata che colpisca non solo le cellule tumorali ma anche lo stroma circostante.

1.9 Il *signaling* di STAT3

L'attivatore della trasduzione del segnale e della trascrizione (STAT) è regolato da diversi fattori di crescita e citochine ed è solitamente rapido e transitorio, a causa di specifici meccanismi di feedback negativo. L'attivazione anormale, dovuto ad esempio alla segnalazione sbilanciata o a

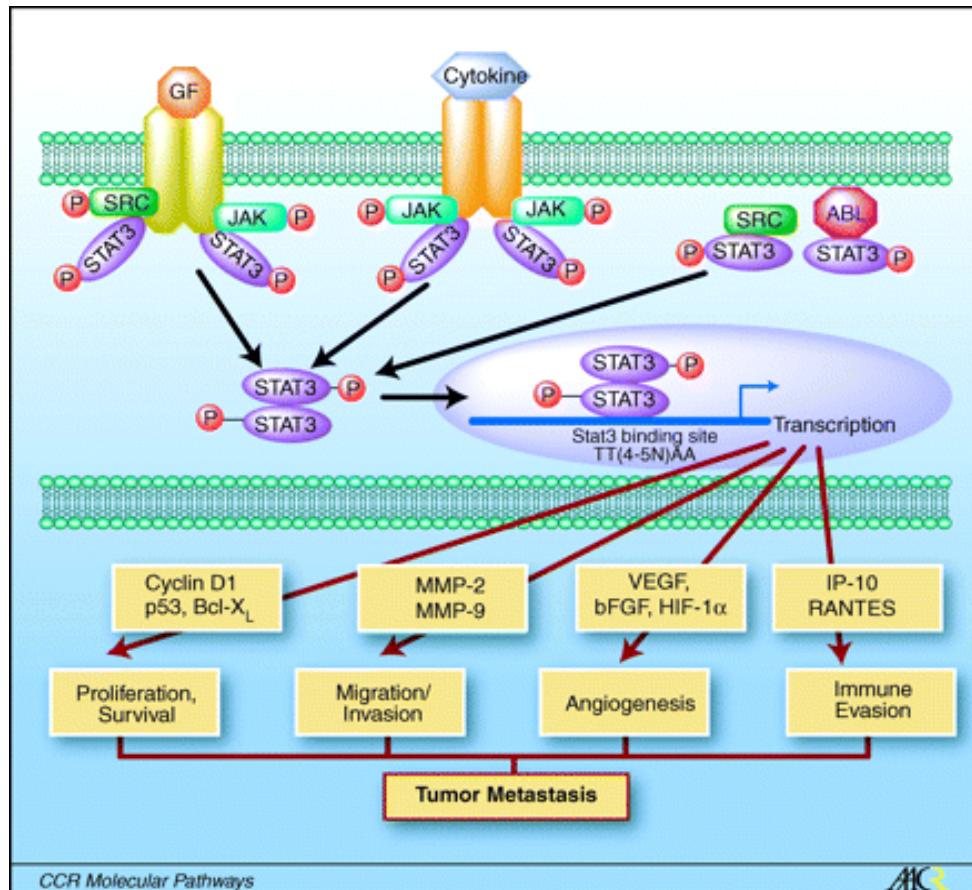
livelli alterati di entrambi gli STATs specifici o i loro regolatori negativi, spesso portano a condizioni patologiche quali infiammazione cronica, risposte immunitarie difettose o cancro (87).

Tra i membri della famiglia STAT, STAT3, data una forte correlazione con la tumorigenesi, è spesso considerato un oncogene. Infatti, questo fattore è il punto di convergenza di molte vie di segnale attivate da citochine, fattori di crescita ed oncogeni e di conseguenza è risultato essere costitutivamente attivo in una vasta gamma di tumori e linee cellulari trasformate. In particolare, l'attivazione costitutiva di STAT3 è stata riportata in circa il 70% dei tumori solidi ed ematologici, compreso il mieloma multiplo, linfomi e leucemie, cancro al seno, cancro della testa e del collo, cancro alla prostata, carcinoma ovarico, melanoma, carcinoma renale e carcinoma coloretale (88).

STAT3 guida la proliferazione, l'evasione dall'immunosorveglianza, l'angiogenesi ma anche, paradossalmente, interviene bloccando l'invasività tumorale e il processo metastatico (88). L'ampia varietà di diversi tumori in cui l'attività di STAT3 è essenziale suggerisce che questo fattore può svolgere ruoli diversi nella tumorigenesi, non tutti ancora ben chiariti. Così, un numero crescente di studi sono in corso per rispondere alle domande senza risposta riguardo il ruolo di STAT3 e il suo valore potenziale come bersaglio terapeutico per combattere il cancro.

La famiglia della citochina IL-6 è un gruppo di citochine pleiotropiche prodotte da una varietà di cellule in risposta a stimoli infiammatori. I suoi effetti sono mediati attraverso l'interazione con il suo recettore IL-6R β . L'attivazione di questo recettore risulta nel reclutamento e nella fosforilazione del fattore di trascrizione STAT-3, che induce un programma genico coinvolto nella differenziazione e proliferazione cellulare. Inoltre l'aumento di IL-6 riflette anche l'aumento di altri biomarcatori che riflettono processi nocivi, come il fattore di necrosi tumorale alfa, interleuchine 8 e

18, YKL-40, proteina C reattiva (89). STAT3 è associato con una varietà di processi biologici.



CCR molecular pathway da AACR

Quando attivato STAT3 (pSTAT3) forma dimeri e trasloca al nucleo dove si lega al DNA e regola diversi geni bersaglio (90). Induce l'espressione di geni multipli compreso il TGF β 1 (10) e il PDGF (91,92).

Dati attuali suggeriscono che la fibrosi si sviluppa inizialmente come normale guarigione delle ferite, anche se vi è una progressione della stessa nella malattia cronica senza risoluzione, suggerendo che il controllo di processi intracellulari, che si verificano durante la guarigione della ferita, sono in un certo senso disturbati. Il tumore è considerato tutt'oggi una ferita

senza cicatrice, questo comporta che i fenomeni di fibrosi assumono un fenomeno pro-tumorigenico in questo contesto, partecipando attivamente alla progressione tumorale. Ne consegue che capire se e come questo controllo viene perso è la chiave per prevenire e trattare questa condizione. Elevati livelli di pSTAT3 sono associati alla fibrosi in differenti tessuti (93,94,95) e nello stroma associato al melanoma (96). Diversi approcci sono stati sviluppati per silenziare STAT3. In particolare, S3I-201, uno specifico inibitore di STAT3, proposto nella fibrosi renale, ha abrogato l'espressione di α -actina del muscolo liscio e fibronectina, che sono marker di miofibroblasti e ha attenuato l'accumulo di matrice extracellulare e la proliferazione dei fibroblasti interstiziali nei topi UUO. Inoltre il numero di infiltrazione di neutrofili e monociti interstiziali e l'espressione di mRNA di citochine proinfiammatorie (inclusi il fattore di necrosi tumorale- α , l'interleuchina-1, la molecola di adesione intercellulare-1, e mcp1) nel rene ostruito sono stati ridotti ad un livello basale da S3I-201 (14).

Il partenolide è un sesquiterpene lattone che si trova naturalmente nella pianta Partenio (*Tanacetum parthenium*), dal quale prende il nome. L'inibizione farmacologica di STAT3 determinata dal partenolide, ha effetti favorevoli, attraverso l'attenuazione dell'attivazione dei fibroblasti, sul sovraccarico di pressione indotto dall'ipertrofia ventricolare sinistra (97). Anche se ancora poco studiato, sembra chiaro che l'aumento di STAT3 potrebbe partecipare non solo alla progressione del tumore stimolando le cellule tumorali e facendole diventare più aggressive ma interviene anche nella modulazione dello stroma associato al tumore favorendo un microambiente attivo. Di conseguenza la sua inibizione potrebbe risultare in una terapia ad ampio raggio in grado di inibire il *crosstalk* tra tumore e stroma.

SCOPO DEL LAVORO

Le ricerche effettuate sono partite dall'ipotesi che poiché nel tumore della prostata vi è un'alterata espressione e attivazione di STAT3, probabilmente un meccanismo correlato potrebbe avvenire nello stroma associato al tumore. Inoltre, STAT3 è coinvolto nelle fibrosi tissutali, e la sua inibizione riduce l'attivazione dei fibroblasti associati al tumore. In particolare, si è supposto che anche nei CAF STAT3 potesse risultare attivato e questo correla con l'aumento di una serie di oncoproteine che caratterizzano il fenotipo miofibroblastico, già descritti implicati nella patogenesi del carcinoma della prostata. Allo scopo di verificare questa ipotesi si è proceduto all'analisi dei livelli di espressione di STAT3 in fibroblasti isolati da tessuti di carcinoma prostatico. E' noto che il TGF- β è una proteina chiave nell'attivazione e differenziamento dei fibroblasti in miofibroblasti, cellule chiamate anche CAF, identificate come cellule attive che supportano la crescita e partecipano nella progressione tumorale. In questo contesto, noi abbiamo supposto che la regolazione di moltissime proteine bersaglio potesse essere legato a questa citochina. Infatti, abbiamo visto un conseguente incremento dell'espressione di proteine *target* aumentati anche nelle cellule tumorali, scoprendo un filo comune tra le cellule del microambiente e quelle tumorali.

Inoltre abbiamo valutato dopo trattamento dei CAF con TGF- β un'aumentata espressione di un *master gene*, STAT3, già noto in grado di modulare l'espressione di molte proteine e microRNA. Abbiamo messo a punto, per confermare i nostri dati, un silenziamento specifico di STAT3 tramite oligo siRNA e tramite un inibitore specifico, S3I-201. Abbiamo visto una notevole riduzione delle capacità di supporto dei CAF nei confronti delle cellule tumorali in termine di migrazione. Lo studio approfondito del microambiente tumorale e delle possibili interazioni nel carcinoma prostatico conferma la possibilità che la valutazione dei meccanismi molecolari che regolano entrambe le cellule dovrebbe

effettivamente essere valutato nella scelta di un'efficace terapia anti-tumorale.

MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari e trattamento con TGF- β

I campioni prostatici sono stati ottenuti con consenso informato da pazienti sottoposti a prostatectomia radicale presso il Dipartimento di Urologia dell'Ospedale San Giovanni Bosco di Torino. I campioni tumorali sono stati presi dalla zona periferica dei lobi della prostata, quelli di tessuto sano dalla zona di transizione della parte basale; la natura di ciascun campione è stata confermata da successiva analisi da parte dell'anatomopatologo.

I tessuti sono stati dissociati meccanicamente con l'uso di forbicine ed enzimaticamente con 2 mg/ml di collagenasi II (Gibco). Per isolare i fibroblasti, le colture sono state trattate per 1-2' con tripsina diluita al 50% con PBS: le cellule epiteliali crescono in aree compatte e si staccano più difficilmente dei fibroblasti. Quindi, questi ultimi sono stati isolati e mantenuti in coltura con DMEM supplementato con penicillina/streptomina, glutammina e siero bovino fetale. Le cellule isolate sono state trattate con 5ng/mL di TGF- β (Prepotech) a diversi tempi. Le cellule PC3 sono state coltivate utilizzando il mezzo RPMI 1640 con penicillina/streptomina, glutammina e siero bovino fetale.

3.2 Citofluorimetria e immunofluorescenza

Per determinare la purezza e la qualità dei fibroblasti isolati, le cellule sono state marcate con anticorpi specifici per Thy-1/CD90 (BD), α -SMA (Sigma Aldrich) e vimentina, (Cell Signaling Technology).

Per le analisi di citofluorimetria a flusso, le incubazioni con gli anticorpi primari e secondari coniugati con FITC (Dako, 1:20) sono state eseguite a 4°C per 1 ora. Le cellule sono state preventivamente fissate con

paraformaldeide 2% per 20' a temperatura ambiente ed i campioni sono stati analizzati con FACSCanto (BD).

Per le analisi di immunofluorescenza le cellule centrifugate su vetrino sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 10' e permeabilizzate con Triton 0.2% per 5'. Prima dell'incubazione con l'anticorpo primario, i siti di legame non specifici sono stati occupati dal trattamento con PBS-1%BSA. Successivamente i vetrini sono stati incubati con gli anticorpi primari e poi con i secondari fluorescenati. Tutte le incubazioni sono state realizzate per 1 hr a temperatura ambiente. Le cellule sono state trattate con DAPI per colorare i nuclei di blu.

3.3 Western Blotting

Per le analisi di Western Blotting i campioni proteici sono stati preparati risospendendo le cellule in una soluzione di lisi contenente Tris/HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 200 mM, 1%NP40 e una combinazione di inibitori di proteasi e fosfatasi (Protease e Phosphatase Inhibitor Cocktails I and II della Sigma-Aldrich). La lisi è stata fatta avvenire per 30' in ghiaccio e i residui cellulari non proteici sono stati sedimentati con una centrifugazione a 13.000 rpm per 10'. La concentrazione delle proteine è stata determinata con saggio Bradford (Biorad) ed uguali quantità di campioni sono state separate per elettroforesi in SDS su gel al 10% di poliacrilamide e quindi trasferite su filtri di nitrocellulosa (Amersham). I siti di legame non specifici sono stati bloccati mediante incubazione di 1 ora con TBS/0.2% Tween contenente 5% di latte scremato in polvere (Biorad). Le membrane sono poi state incubate per tutta la notte a 4° C con i seguenti anticorpi primari diluiti in TBS/0.2% Tween con 5% BSA: anti-osteopontina (1:500) (Chemicon), anti-BCL2 (1:1000), anti pSTAT3 (Cell Signaling Technology), anti-CCND1 (1:500), anti-WNT3A (1:200), anti-pERK (1:1000), anti FGF-2 (1:500), anti FGFR1 (1:500) (Santa Cruz) e anti α -SMA (1:1000)(Sigma-Aldrich). Per la

normalizzazione delle quantità proteiche caricate, i filtri sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente con anti- β -actina o anti- β -tubulina (acquistati dalla Sigma-Aldrich), nucleolina (Santa Cruz) e LDH (Santa Cruz). Dopo ciascuna incubazione con l'anticorpo primario i filtri sono stati lavati più volte con TBS/0.2% Tween e incubati per 1 ora a temperatura ambiente con anti-immunoglobuline di topo o di coniglio (Amersham, 1:4.000) coniugate a HRP. Il segnale della perossidasi è stato rilevato con gli appositi substrati per la reazione di chemiluminescenza (Pierce).

3.4 siRNA e inibizione di STAT3

Per esplorare il meccanismo di STAT3 abbiamo messo a punto la trasfezione di oligo siRNA per STAT3 (Qiagen) in cellule CAF utilizzando come agente transfettante l' HiPerFect (Qiagen). Brevemente, gli oligo siRNAs sono stati complessati con il reagente HiPerFect, secondo le istruzioni della casa madre in Opti-MEM (Invitrogen).

Poiché il siRNA di STAT3 non ha avuto effetti molto forti, l'inibizione di STAT3 è stata anche effettuata utilizzando un inibitore specifico S3I-201 a concentrazione finale di 100 μ M (selleckchem). Le cellule sono state raccolte e sono state esaminate per western blot per analizzare l'efficienza della trasfezione. I mezzi condizionati sono stati, inoltre, raccolti per gli esperimenti di wound assay.

3.5 Wound assay

Le cellule PC3 sono state piastrate fino ad arrivare a confluenza, una ferita (*wound*) è stata effettuata in maniera da creare uno spazio che le cellule, come noto, sono in grado di cucire, migrando, la ferita. Le cellule sono state trattate come controllo con mezzo con siero allo 0,5%, con mezzo

condizionato prodotto dai CAF incubati con RPMI 0,5% di siero per 48h. Inoltre è stato anche prodotto il mezzo condizionato dai CAF dove STAT3 era stato silenziato o inibito. Per vedere gli effetti dei fattori prodotti dai CAF sono state fotografate (4X) le immagini a tempo 0, cioè al momento della ferita e a 12h dopo lo stimolo (Nikon). L'esperimento è stato ripetuto 3 volte.

3.6 Analisi statistica

Tutti i dati sono presentati come media \pm deviazione standard degli esperimenti effettuati. Le immagini sono rappresentative dei risultati medi ottenuti.

Tesi di dottorato in Patologia Osteoncológica, di Cirino Amato,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 08/07/2013.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte

RISULTATI

4.1 Pattern di espressione di proteine in CAF

Abbiamo dissociato campioni di tessuto tumorale da pazienti con carcinoma della prostata e isolato cellule CAF primarie e la loro controparte normale (NAF). I CAF sono solitamente caratterizzati mediante l'espressione di α -actina del muscolo liscio (α -SMA) e per il loro fenotipo miofibroblastico, tipico delle cellule che partecipano alla cicatrizzazione delle ferite. Abbiamo caratterizzato la purezza dei CAF mediante analisi citofluorimetrica e immunofluorescenza attraverso il rilevamento di marcatori specifici (Figura 1).

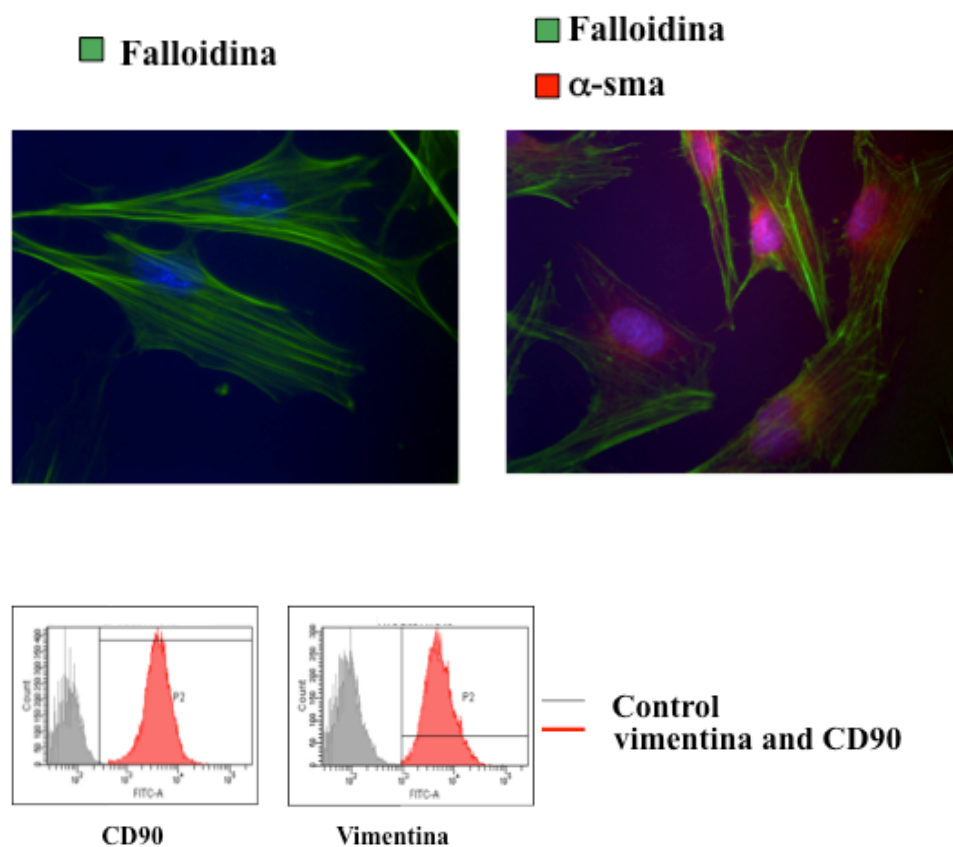


Figura 1. Caratterizzazione dei fibroblasti. Analisi di falloidina e α -SMA in immunofluorescenza. Il colore blu indica la colorazione DAPI nucleare. Analisi citofluorimetrica di CD90 e vimentina.

Inoltre, abbiamo analizzato 8 cloni di CAF mediante western blot per FGF-2, FGFR1, BCL2 e pERK, tutte proteine oncogene spesso *up*-regolate nelle cellule tumorali, e il marcatore dei CAF l' α -SMA. Abbiamo osservato una concordanza tra l'espressione del marcatore CAF α SMA e le oncoproteine BCL-2, FGF-2, FGFR1 e pERK (Figura 2). L'incremento di queste proteine nei CAF indica che queste cellule possono essere dotate di una maggiore capacità di supporto-tumorale rispetto ai NAF.

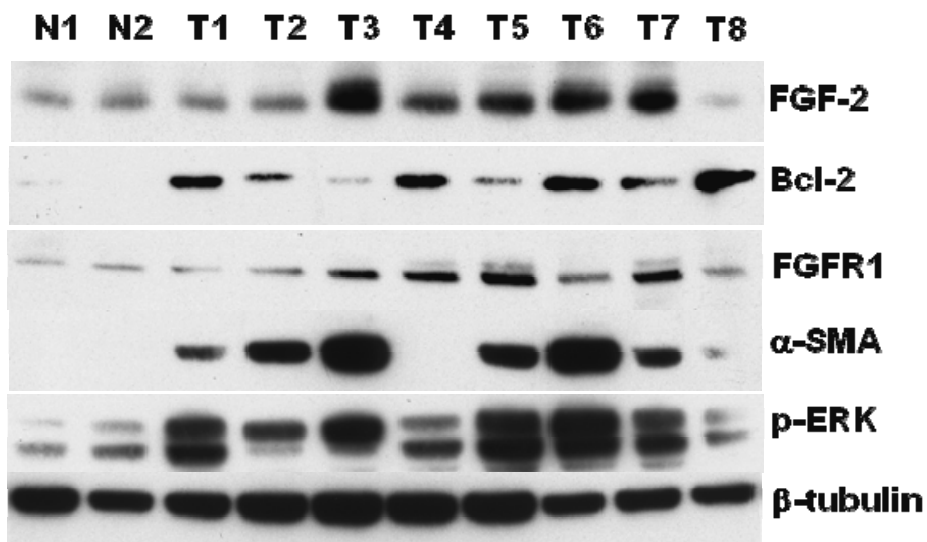


Figure 2: I CAF esprimono oncoproteine e marker di attivazione. Analisi tramite Western blotting di FGF-2, BCL-2, FGFR1, α SMA e pERK in NAFs (N1-N2) e CAFs (T1-T8) isolate da tessuto normale e da carcinoma prostatico. La β tubulina è usata come normalizzatore.

4.2 Il TGF β modula proteine oncogeniche nei CAF

Il TGF- β è coinvolto nella progressione del cancro e nelle interazioni tumore-stroma. Secreto anche dalle cellule tumorali, il TGF- β agisce sui fibroblasti conferendo loro proprietà tumorigeniche. Esso rappresenta quindi un importante mediatore dell'attivazione e del mantenimento del fenotipo miofibroblastico. Per dimostrare questo meccanismo, abbiamo trattato i CAF con TGF- β e abbiamo osservato una parallela up-regolazione di proteine quali osteopontina, FGF-2, BCL-2, FGFR-1, Wnt3a e CCND1 (Figura 3) e il marcatore dei CAF α -SMA. Pertanto, il TGF- β regola l'espressione di proteine che potrebbero essere coinvolte nella comunicazione con le cellule tumorali ed inoltre potrebbero conferire ai fibroblasti delle caratteristiche pro tumorigeniche e mediare in questo modo anche la migrazione delle cellule tumorali.

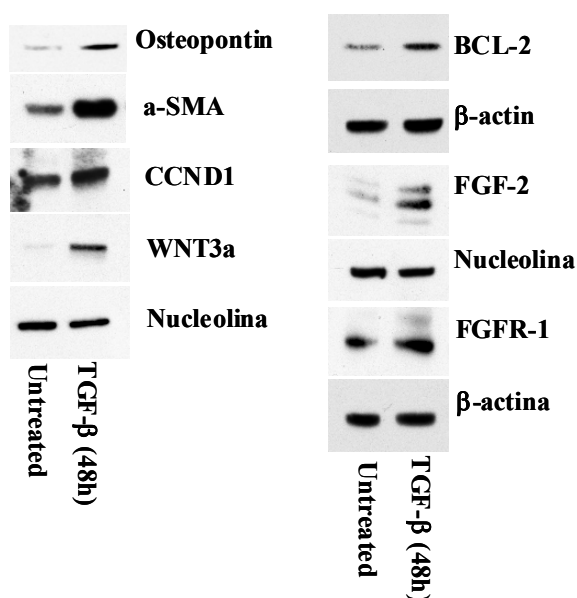


Figura 3. Il TGF- β aumenta proteine oncogeniche nei CAF Western blotting di osteopontina, α -SMA, CCND1, WNT3a, BCL-2, FGF-2 e

FGFR1 in CAFs trattati con TGF- β (5ng/ml) dopo 48h dalla stimolazione.
Nucleolina e β -actina sono stati usati come controlli interni.

4.3 Il TGF- β aumenta l'attivazione dei CAF *up*-regolando il CD90

Come recentemente pubblicato, l'espressione del CD90 risulta elevata nello stroma associato al tumore della prostata rispetto a quello del tessuto normale o derivante da iperplasia prostatica benigna, infatti il CD90 è stato proposto come marcatore CAF (4,5). Poiché il TGF- β è coinvolto nel *crosstalk* tumore-stroma e nella differenziazione dei miofibroblasti, abbiamo studiato se la stimolazione del TGF- β partecipasse nell'attivazione dell'immunofenotipo tipico dei CAF. L'analisi citofluorimetrica dimostra un'aumentata espressione del CD90 in CAF dopo il trattamento con il TGF- β (Figura 4).

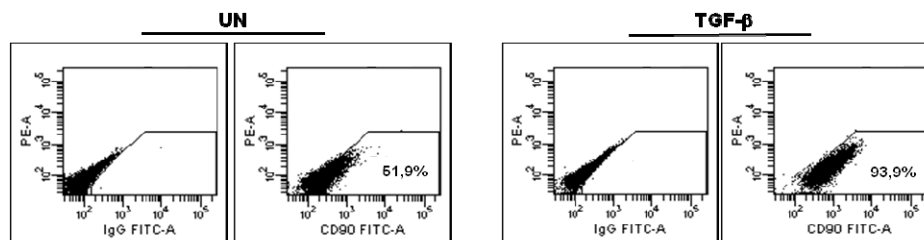


Figure 4. Il TGF- β aumenta l'espressione del CD90. Analisi citofluorimetrica di CD90 in CAFs trattate con la citochina TGF- β (5ng/ml) per 48h. UN= Non trattato

4.4 STAT-3 è attivato in fibroblasti associati al tumore

Poiché STAT3 è implicato in una fibrosi avanzata e la sua attività è stata collegata con la stimolazione del TGF- β , abbiamo studiato STAT3 come possibile link molecolare responsabile di mediare una serie di proteine legate ad un fenotipo più aggressivo. Abbiamo osservato un'attivazione di STAT3 in quasi tutti i CAF valutati (8 cloni) rispetto ai NAF (figura 5).

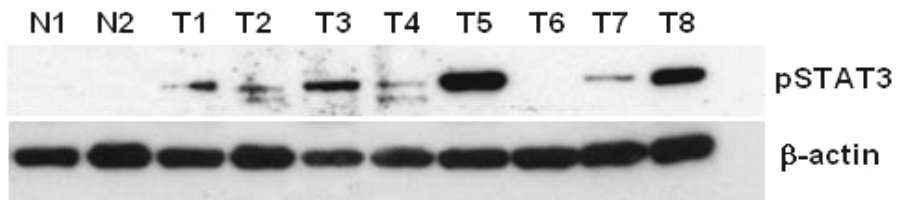


Figura 5. STAT-3 fosforilato è *over-espesso* nei CAF. Western blotting di pSTAT3 in NAF (N1; N2) e CAF (T1-T8). La β actina è stata usata come controllo interno.

Inoltre, l'attivazione di STAT3 è stata osservata dopo stimolazione dei CAF con TGF- β (figura 6).



Figura 6. Il TGF- β induce l'attivazione di Stat-3 in CAF. Western blotting di pSTAT3 in CAF trattati con TGF- β (5ng/ml) per 48h. La β actina è stata usata come controllo interno.

Al fine di studiare gli effetti di STAT3 nei CAF, abbiamo silenziato il gene mediante l'utilizzo di oligo siRNA e inibito la fosforilazione di STAT3 e la dimerizzazione, necessaria per l'attivazione del *signaling* tramite l'utilizzo di un inibitore specifico, S3I-201. Il migliore effetto lo abbiamo avuto con l'inibitore e abbiamo valutato quindi i livelli di espressione di α -SMA e pERK, trovandoli diminuiti in correlazione con il probabile ruolo di STAT3 nell'attivazione dei CAF.

La valutazione dell' α -SMA anche per immunofluorescenza ha confermato i dati per western blot. In particolare le cellule sono sembrate riacquistare il fenotipo fibroblastico perdendo la caratteristica forma stellata.

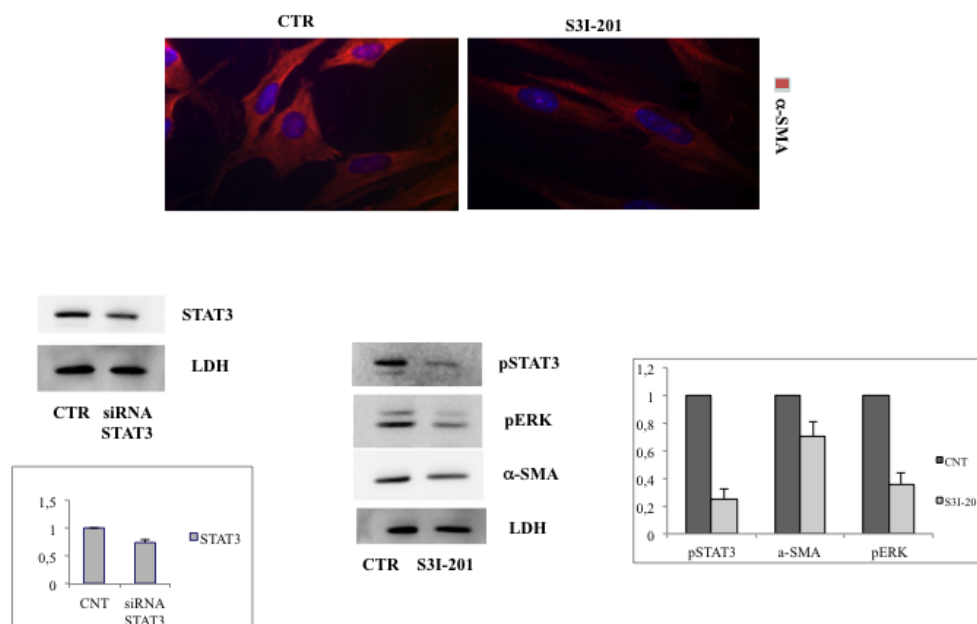


Figura 7. Stat-3 è potenzialmente responsabile dell'attivazione dei CAF.

Stat 3 è stato silenziato tramite siRNA o inibito con l'S3I-201 e analizzato α -SMA per immunofluorescenza e STAT3 e pSTAT3 per western blotting insieme a pERK e α -SMA. LDH è stato usato come normalizzatore.

4.5 Il silenziamento di STAT3 nei CAF riduce la capacità di supporto dei CAF sulle cellule tumorali

Per dimostrare se effettivamente l'aumentata attivazione di STAT3 nei CAF sia responsabile dell'attivazione di queste cellule e di conseguenza potenzialmente di aumentare anche la loro capacità di supporto, abbiamo inibito il fattore di trascrizione nei CAF e valutato una serie di parametri.

Poiché è noto che i CAF sono in grado di aumentare la migrazione di cellule tumorali ed in particolare la linea cellulare PC3 che viene da una metastasi ossea abbiamo prodotto i mezzi condizionati in CAF con e senza inibizione di STAT3.

I risultati dimostrano tramite *wound assay* che l'inibizione di STAT3 riduce la capacità migratoria delle PC3 stimolata invece dai CAF rispetto al controllo.

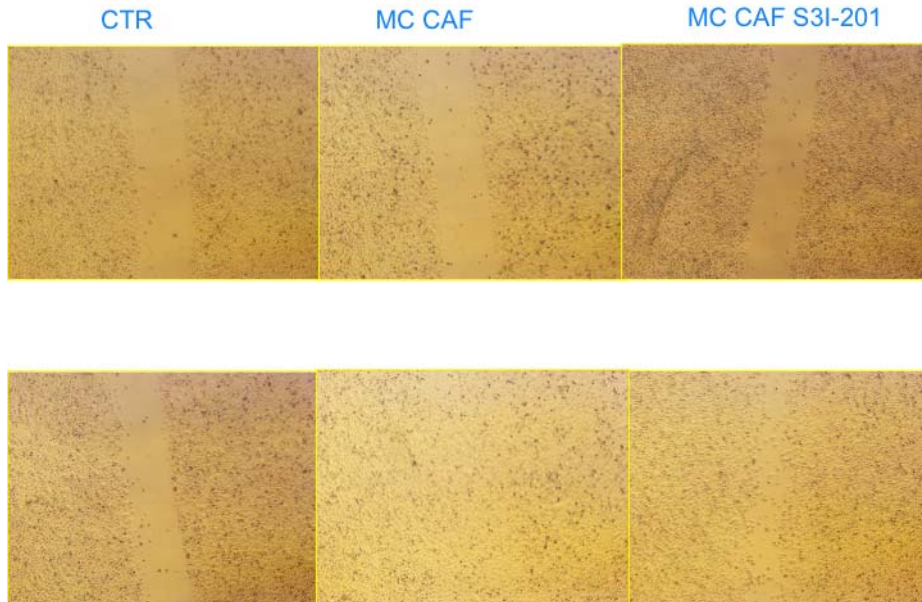


Figure 8: wound assay delle PC3. Le cellule PC3 aumentano la loro migrazione riuscendo a coprire tutta la cicatrice quando stimolate con i fattori secreti dai CAF (MC CAF). Questo diminuisce quando STAT3 è inibito nei CAF (MC CAF S3I-201).

Pertanto, stiamo cercando di chiarire un circuito molecolare associato alla maggiore capacità di supporto al tumore dei CAF dimostrando che l'attivazione dei CAF è correlata con il TGF- β e soprattutto con STAT3 ed il fenotipo CD90, portando ad un generale *up*-regolazione di un insieme di oncoproteine (Figura 9) in grado di stimolare le cellule tumorali nella migrazione e capacità metastatica e nella loro capacità di modulazione delle cellule tumorali.

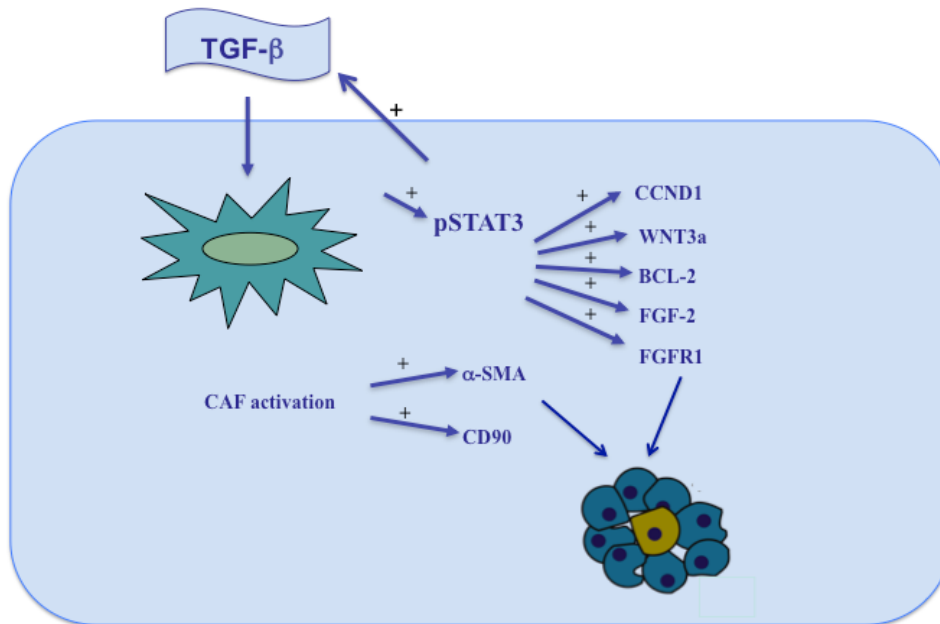


Figura 9. Schema rappresentativo del circuito molecolare dell'azione del TGF-β sui CAF. La figura ricapitola i dati presentati nello studio. + = *up*-regolazione; - = *down*-regolazione.

Tesi di dottorato in Patologia Osteoncológica, di Cirino Amato,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 08/07/2013.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte

DISCUSSIONE

Le cellule tumorali sono in grado di modulare il microambiente circostante, e la natura bidirezionale del *crosstalk* tumore-stroma promuove un rimodellamento di entrambi i compartimenti, portando in fine all'acquisizione di tratti metastatici. Nonostante l'eterogeneità che caratterizza lo stroma tumorale, è ampiamente accettato che i fibroblasti associati al tumore svolgono un ruolo chiave nell'evoluzione biologica dei tumori. Abbiamo isolato i CAF dal tessuto tumorale della prostata ed abbiamo valutato una serie di proteine oncogeniche rispetto ai fibroblasti isolati dal tessuto sano. Tra queste proteine abbiamo analizzato Bcl2, FGF-2, FGFR1, CCND1 che risultano aumentati nei CAF, dimostrando così che lo stroma esprime proteine in comune con le cellule cancerose. In particolare, la nostra attenzione si è focalizzata sul TGF- β , essendo una delle citochine principali che regolano la comunicazione tra cellule tumorali e stromali. Dopo la stimolazione dei CAF con TGF- β , abbiamo osservato mediante citometria a flusso un aumento del marcatore CD90, una molecola che caratterizza una popolazione attiva di fibroblasti nel cancro della prostata. Esso è considerato, nella prostata, uno dei marker che identificano la componente stromale associata al tumore. Pertanto, il TGF- β rilasciato dalle cellule cancerose istruisce i fibroblasti ad assumere il fenotipo CAF, e li aiuta a mantenere questo stato attivato. Come risultato, abbiamo trattato i fibroblasti con il TGF- β e valutato le proteine oncogene analizzate precedentemente ed inoltre Wnt-3a e l'osteopontina, molto importante nei segnali tra le cellule dimostrando che un fenotipo attivo correla con questo profilo di proteine e con un aumento di STAT3, un potente *master gene* in grado di regolare a livello nucleare l'espressione di un vastissimo pattern di proteine. Infatti, STAT3 è attivato attraverso la stimolazione da parte di fattori di crescita e non viene normalmente influenzato da mutazioni attivanti. Lesina et al (98) hanno dimostrato che STAT3 è attivo sia nelle cellule stromali sia in quelle tumorali. Inoltre, il TGF- β e STAT3 non sono

solo critici per la progressione del cancro, ma condividono anche alcune attività biologiche nel processo fibrotico e sono coinvolti nell'*immuno-escape* dei tumori (99). Pertanto, noi poniamo STAT3 come possibile responsabile dell'attivazione e regolazione dei CAF e supponiamo che la sua repressione potrebbe essere in grado di interrompere il crosstalk tra tumore e stroma. Dopo stimolazione con il TGF- β , abbiamo osservato che i CAF esprimono maggiori livelli di STAT3, suggerendo così un ruolo di questa proteina nell'identificare una cellula attiva in grado di regolare l'espressione di diversi segnali molecolari e soprattutto supportare le cellule tumorali. Abbiamo silenziato STAT3 con l'utilizzo di oligo siRNA con una bassa efficienza e di un inibitore specifico di STAT3, l'S3I-201 con un ottimo risultato notando una riduzione dell' α -SMA e di p-ERK. Inoltre le cellule sembrano riprendere una forma fibroblatica perdendo la caratteristica forma stellata. Inoltre abbiamo dimostrato una riduzione della migrazione stimolata dai fattori secreti dai fibroblasti, dovuto probabilmente ad una riduzione nelle capacità di supporto.

Stiamo quindi cercando di valutare il fenotipo e il secretoma dei CAF quando STAT3 viene inibito, per capire quali segnali vengono bloccati.

In conclusione, come proposto nella Figura 10, i risultati suggeriscono che il TGF- β aumenta la capacità dei CAF di supportare la crescita e la migrazione delle cellule tumorali in una maniera STAT3-mediata, portando ad un aumento di espressione di una serie di oncoproteine. Poiché sia gli antagonisti del TGF- β e di STAT3 sono in fase di sviluppo clinico, noi qui proponiamo queste molecole per una terapia, mirata ed efficace, contro sia il compartimento tumorale che quello stromale.

Tesi di dottorato in Patologia Osteoncoologica, di Cirino Amato,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 08/07/2013.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte

Tesi di dottorato in Patologia Osteoncológica, di Cirino Amato,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 08/07/2013.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte

BIBLIOGRAFIA

- 1- Ruff –Jannison S, ZhongZ et al. Epidermal growth factor and lipopolysaccharide activate STAT3 transcription factor in mouse liver. *J Biol Chem* 1994;269(35):21933-5.
- 2- Gazzaniga PP, Ferroni Pet al “Identification of blood leukotrienes in classical migraine.” *HEADACHE* 1987;27(4):211-5.
- 3- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
- 4- Pascal LE, Goo YA, Vêncio RZ, Page LS, Chambers AA, Liebeskind ES, Takayama TK, True LD, Liu AY. Gene expression down-regulation in CD90+ prostate tumor-associated stromal cells involves potential organ-specific genes. *BMC Cancer*.2009 ;9:317.
- 5- Zhao H, Peehl DM. Tumor-promoting phenotype of CD90hi prostate cancer-associated fibroblasts. *Prostate*.2009 ;69(9):991-1000.
- 6- Verona EV, Elkahloun AG, Yang J, Bandyopadhyay A, Yeh IT, Sun LZ. Transforming growth factor-beta signaling in prostate stromal cells supports prostate carcinoma growth by up-regulating stromal genes related to tissue remodeling. *Cancer Res*.2007 ;67(12):5737-46.
- 7- Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 2000;257:180-9.
- 8- Lieubeau B, Garrigue L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. The role of transforming growth factor beta 1 in the fibroblastic reaction associated with rat colorectal tumor development. *Cancer Res* 1994; 54:6526-32
- 9- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 2000;19(21):2474-88.
- 10- Ogata H, Chinen T, Yoshida T, Kinjyo I, Takaesu G, Shiraishi H, Iida M, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production. *Oncogene*. 2006 ;25(17):2520-30.

- 11- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell*. 1999 ;98(3):295-303.
- 12- Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(10):496-502. Review.
- 13- Kuratsune M, Masaki T, Hirai T, Kiribayashi K, Yokoyama Y, Arakawa T, Yorioka N, Kohno N. Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Nephrology (Carlton)*. 2007 ;12(6):565-71.
- 14- Pang M, Ma L, Gong R, Tolbert E, Mao H, Ponnusamy M, Chin YE, Yan H, Dworkin LD, Zhuang S. A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 2010 ;78(3):257-68. Epub 2010 Jun 2.
- 15- Dirat, B., Bochet, L., Escourrou, G., Valet, P., and Muller, C. (2010). Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes? *Endocr. Dev.* 19, 45–52.
- 16- Pietras, K., and Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* 316, 1324–1331.
- 17- Rasanen, K., and Vaheri, A. (2010). Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp. Cell Res.* 316, 2713–2722.
- 18- Shimoda, M., Mellody, K.T., and Orimo, A. (2010). Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 19–25.
- 19- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 392–401.
- 20- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.

- 21- Bergfeld, S.A., and DeClerck, Y.A. (2010). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 249–261.
- 22- Giaccia, A.J., and Schipani, E. (2010). Role of carcinoma-associated fibroblasts and hypoxia in tumor progression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 345, 31–45.
- 23- Patenaude, A., Parker, J., and Karsan, A. (2010). Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. *Microvasc. Res.* 79, 217–223.
- 24- Lamagna, C., and Bergers, G. (2006). The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *J. Leukoc. Biol.* 80, 677–681.
- 25- Gronberg, H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 361, 859-64 (2003).
- 26- Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2: 584–593, 2002.
- 27- Schor SL, Schor AM. Hypothesis: persistent expression of fetal phenotype characteristics by fibroblasts is associated with an increased susceptibility to neoplastic disease. *Exp Cell Biol* 1987;55:11–7.
- 28- Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer-associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Bio* 2010;21: 33–9.
- 29- De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008;123:2229–38.
- 30- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999;59:5002–11.
- 31- Ao M, Franco OE, Park D, Raman D, Williams K, Hayward SW. Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res* 2007;67:4244–53.

- 32- He Y, Franco OE, Jiang M, et al. Tissue-specific consequences of cyclin D1 overexpression in prostate cancer progression. *Cancer Res* 2007;67:8188–97.
- 33- Sung SY, Chung LW. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanisms and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation*. 2002; 70:506–21.
- 34- Chung LW. Fibroblasts are critical determinants in prostatic cancer growth and dissemination. *Cancer Metastasis Rev*. 1991; 10:263–74.
- 35- Camps JL, Chang SM, Hsu TC, et al. Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87:75–9.
- 36- Chung LW. The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surv*. 1995; 23:33–42.
- 37- Thalmann GN, Rhee H, Sikes RA, et al. Human prostate fibroblasts induce growth and confer castration resistance and metastatic potential in LNCaP Cells. *Eur Urol*. 2010; 58:162–71.
- 38- Chung LW, Zhau HE, Ro JY. Morphologic and biochemical alterations in rat prostatic tumors induced by fetal urogenital sinus mesenchyme. *Prostate*. 1990; 17:165–74.
- 39- Miller GJ, Runner MN, Chung LW. Tissue interactions and prostatic growth: II. Morphological and biochemical characterization of adult mouse prostatic hyperplasia induced by fetal urogenital sinus implants. *Prostate*. 1985; 6:241–53.
- 40- Gleave M, Hsieh JT, Gao CA, et al. Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res*. 1991; 51:3753–61.
- 41- Rhee HW, Zhau HE, Pathak S, et al. Permanent phenotypic and genotypic changes of prostate cancer cells cultured in a three-dimensional rotating-wall vessel. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2001; 37:127–40.
- 42- Sung SY, Hsieh CL, Law A, et al. Coevolution of prostate cancer and bone stroma in three-dimensional coculture:

- implications for cancer growth and metastasis. *Cancer Res.* 2008; 68:9996– 10003.
- 43- Hsieh CL, Gardner TA, Miao L, et al. Cotargeting tumor and stroma in a novel chimeric tumor model involving the growth of both human prostate cancer and bone stromal cells. *Cancer Gene Ther.* 2004; 11:148–55.
- 44- Berruti A, Tucci M, Mosca A, Tarabuzzi R, Gorzegno G, Terrone C, Vana F, Lamanna G, Tampellini M, Porpiglia F, Angeli A, Scarpa RM, Dogliotti L. Predictive factors for skeletal complications in hormone-refractory prostate cancer patients with metastatic bone disease. *Br J Cancer* 93: 633-638, 2005.
- 45- Aapro M, Ahrhamson A, Body JJ, Coleman R, Colomer R, Costa L, Crinò L, Dirix L, Gnani M, Gralow J, Hadji P, Hortobagay GN, Jonat W, Lipton A, Saad F, Thurliman B. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an International Expert Panel. *Ann Oncol* 2008; 19; 420-432
- 46- Jossion S, Matsuoka Y, Chung LW, et al. Tumor-stroma co-evolution in prostate cancer progression and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21:26–32.
- 47- Murali Gururajan, Edwin M. Posadas, and Leland W. K. Chung. Future perspectives of prostate cancer therapy. *Transl Androl Urol.* 2012 January 3; 1(1): 19–32.
- 48- Chung LW, Baseman A, Assikis V, et al. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol.* 2005; 173:10–20.
- 49- Bartel, D. P. et al. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-97 (2004).
- 50- Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 2000;257:180-9.
- 51- Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:506–20.

- 52- Li X, Placencio V, Iturregui JM, et al. Prostate tumor progression is mediated by a paracrine TGF-beta/Wnt3a signaling axis. *Oncogene* 2008;27:7118–30.
- 53- Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, et al. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 2004;303:848–51.
- 54- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 2001;166:2472–83.
- 55- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 2002;8:2912–23.
- 56- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res* 2002;62:6021–5.
- 57- Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhou HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol* 2005;173:10–20.
- 58- Chung LW, Huang WC, Sung SY, et al. Stromal-epithelial interaction in prostate cancer progression. *Clin Genitourin Cancer* 2006;5: 162–70.
- 59- Xu J, Wang R, Xie ZH, et al. Prostate cancer metastasis: role of the host microenvironment in promoting epithelial to mesenchymal transition and increased bone and adrenal gland metastasis. *Prostate* 2006;66:1664–73.
- 60- Hayashi N, Cunha GR. Mesenchyme-induced changes in the neoplastic characteristics of the dunning prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991;51:4924–30.
- 61- Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005;19:2783–810.
- 62- Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008;1782:197–228.

- 63- Jones E, Pu H, Kyprianou N. Targeting TGF-beta in prostate cancer: therapeutic possibilities during tumor progression. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:227-34.
- 64- Kalluri R, Han Y. Targeting TGF-beta and the extracellular matrix in Marfan's syndrome. *Dev Cell*. 2008 Jul; 15(1):1-2.
- 65- Menke A & Adler G 2002 TGFbeta-induced fibrogenesis of the pancreas. *Int J Gastrointest Cancer* 31 41-46.
- 66- Prud'homme GJ 2007 Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest* 87 1077-1091.
- 67- Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB & Thorgeirsson SS 1995 Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 2572-2576.
- 68- Jagadeesan J & Bayat A 2007 Transforming growth factor beta (TGFbeta) and keloid disease. *Int J Surg* 5 278-285.
- 69- Alonso-Magdalena P, Brossner C, Reiner A, Cheng G, Sugiyama N, Warner M & Gustafsson JA 617 2009 A role for epithelial-mesenchymal transition in the etiology of benign prostatic hyperplasia. 618 *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 2859-2863.
- 70- Ao M, Williams K, Bhowmick NA & Hayward SW 2006 Transforming growth factor-beta promotes invasion in tumorigenic but not in nontumorigenic human prostatic epithelial cells. *Cancer Res* 66 8007-8016.
- 71- Gann PH, Klein KG, Chatterton RT, Ellman AE, Grayhack JT, Nadler RB & Lee C 1999 Growth factors in expressed prostatic fluid from men with prostate cancer, BPH, and clinically normal prostates. *Prostate* 40 248-255.
- 72- Shoskes DA, Albakri Q, Thomas K & Cook D 2002 Cytokine polymorphisms in men with 1032 chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: association with diagnosis and treatment response. *J Urol* 168 331-335.

- 73- Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW & Kalluri R 2006 Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 5 1640-1646.
- 74- Kiskowski MA, Jackson RS, 2nd, Banerjee J, Li X, Kang M, Iturregui JM, Franco OE, Hayward 871 SW & Bhowmick NA 2011 Role for stromal heterogeneity in prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 71 3459-3470.
- 75- Franco OE, Jiang M, Strand DW, Peacock J, Fernandez S, Jackson RS, Revelo MP, 774 Bhowmick NA & Hayward SW 2011 Altered TGF-beta signaling in a subpopulation of human stromal cells promotes prostatic carcinogenesis. *Cancer Res* 71 1272-1281.
- 76- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE & Rowley DR 2002b Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res* 62 3298-3307.
- 77- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD & Rowley DR 2002c Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res* 62 6021-6025.
- 78- Yang F, Strand DW & Rowley DR 2008a Fibroblast growth factor-2 mediates transforming growth factor-beta action in prostate cancer reactive stroma. *Oncogene* 27 450-459.
- 79- Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD & Rowley DR 2005 Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Res* 65 8887-8895.
- 80- Roberts AB & Sporn MB 1996 Transforming growth factor- β . In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, pp 275-308. Ed RAF Clark. New York, NY: Plenum Press.
- 81- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. 1986 Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 4167-4171.

- 82- Brandes ME, Mai UE, Ohura K & Wahl SM 1991 Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. *J Immunol* 147:1600-1606.
- 83- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB & Sporn MB Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5788-5792.
- 84- Condeelis J & Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006, 124:263-266.
- 85- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004,4:71-78.
- 86- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD & Rowley DR 2002a Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 8:2912-2923.
- 87- Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(9):651-662.
- 88- Pensa S, Regis G, Boselli D, Novelli F and Poli V. STAT1 and STAT3 in Tumorigenesis: Two Sides of the Same Coin? *JAK-STAT Pathway in Disease*, edited by Anastasis Stephanou. ©2009 Landes Bioscience.
- 89- Fisman EZ, Tenenbaum A. The ubiquitous interleukin-6: a time for reappraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2010, 11;9:62.
- 90- Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*. 2000, 25(10):496-502.
- 91- Vij N, Sharma A, Thakkar M et al. PDGF-driven proliferation, migration, and IL8 chemokine secretion in human corneal fibroblasts involve JAK2- STAT3 signaling pathway. *Mol Vis* 2008, 14: 1020–1027.

- 92- Wang YZ, Wharton W, Garcia R et al. Activation of Stat3 preassembled with platelet-derived growth factor beta receptors requires Src kinase activity. *Oncogene* 2000, 19: 2075–2085.
- 93- Kuratsune M, Masaki T, Hirai T, Kiribayashi K, Yokoyama Y, Arakawa T, Yorioka N, Kohno N. Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Nephrology (Carlton)*. 2007, 12(6):565-71.
- 94- Mair M, Blaas L, Österreicher CH, Casanova E, Eferl R. JAK-STAT signaling in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2011, 17:2794-811.
- 95- Lim CP, Phan TT, Lim IJ et al. Cytokine profiling and Stat3 phosphorylation in epithelial-mesenchymal interactions between keloid keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2009,129: 851–861.
- 96- Mustafa Aziz Hatiboglu, Ling-Yuan Kong, Jun Wei, Yongtao Wang, Kayla Anne McEnery, Gregory N. Fuller, Wei Qiao, Michael A. Davies, Waldemar Priebe and Amy B. Heimberger. The tumor microenvironment expression of p-STAT3 influences the efficacy of cyclophosphamide with WP1066 in murine melanoma models. *Int. J. Cancer*: 2012 Jul 1;131(1):8-1
- 97- Skoumal R, Tóth M, Serpi R, Rysä J, Leskinen H, Ulvila J, Saiho T, Aro J, Ruskoaho H, Szokodi I, Kerkelä R. Parthenolide inhibits STAT3 signaling and attenuates angiotensin II-induced left ventricular hypertrophy via modulation of fibroblast activity. *J Mol Cell Cardiol*. 2011, 50(4):634-41.
- 98- Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Klöppel G, Yoshimura A, Reindl W, Sipos B, Akira S, Schmid RM, Algül H. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2011 ;19(4):456-69.
- 99- Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and

adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells.
Nat Med. 2004 ;10(1):48-54.