

Titolo: "La formazione di tunnel di nanotubi promuove la sopravvivenza contro il 5-fluorouracile nelle cellule di cancro al seno MCF-7 - Tunneling nanotube formation promotes survival against 5-fluorouracil in MCF-7 breast cancer cells

Codice: MUT008

Autore: Kato et al.

Data: 2022

Rivista: Federation of European Biochemical Societies (FEBS) 12(1): 203–210

Argomento: mutagenesi

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13324>

URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.13324>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2022/03/17/mut008-kato-et-al-2022/>

Parole chiave: 5-fluorouracile, chemioterapia, citocalasina B, doxorubicina, farmacoresistenza, nanotubi tunneling

Tumore: cancro al seno

Traduzione: Sono state tradotte le sezioni "Riassunto", "Introduzione" e "Discussione", in modo pressoché fedele. Della sezione "Risultati" sono stati presentati solo i titoli dei tre paragrafi di questa sezione. La sezione "Materiali e metodi" è stata presentata in modo molto succinto.

Punti di interesse

La formazione di tunnel di nanotubi (TNT) è una via estremamente diretta che le cellule usano per comunicare, per scambiarsi segnali, sostanze, molecole tossiche, organelli, materiale genetico etc, soprattutto quando sono sottoposte a stress. I TNT sono presenti a bassi livelli in condizioni normali nella maggior parte delle cellule. La loro formazione è aumentata in risposta a vari stress quali la deprivazione nutrizionale, luce UV, stress ossidativo e agenti citotossici. I TNT formati durante lo stress diventano condotti per lo scambio di proteine e organelli, come i mitocondri, che possono aiutare nella sopravvivenza cellulare. Ad esempio, è stato dimostrato che lo scambio di mitocondri attraverso i TNT salva cellule che sono state danneggiate dalla luce UV.

Nelle cellule tumorali di molti tumori come mesotelioma, glioblastoma e carcinomi pancreatici sono stati osservati anche in modo elevato. Nelle cellule tumorali del pancreas, i TNT sono stati osservati facilitare la redistribuzione intercellulare della doxorubicina (DOX), che ha consentito una maggiore resistenza al farmaco. È stato anche dimostrato che le cellule tumorali utilizzano i TNT per trasferire proteine coinvolte nella resistenza ai farmaci come la proteina 1 di resistenza multifarmaco (MDR1).

In questo studio in vitro, è stato dimostrato che vari trattamenti chemioterapici inducono la formazione di tunnel di nanotubi in colonie cellulari di cancro al seno, anche se in modo diverso. In particolare lo studio ha dimostrato che il 5-fluorouracile (5-FU), un agente chemioterapico ampiamente utilizzato nel trattamento di un'ampia gamma di tumori tra cui tumori della mammella, del colon-retto, dello stomaco e del pancreas, era particolarmente efficace nell'indurre la formazione di TNT .

Il 5-FU è inizialmente molto efficace nel trattamento del carcinoma mammario metastatico, ma perde efficacia nel tempo poiché le cellule tumorali sviluppano resistenza. Il trattamento con 5-FU per le cellule tumorali rappresenta un fattore di stress significativo per le cellule tumorali e induce carenza di timidina, necessaria per la sintesi del DNA, uno stato simile alla deprivazione nutrizionale, che è noto per aumentare la formazione di TNT. Nelle cellule MCF-7, la formazione di TNT potrebbe aiutare nella sopravvivenza attraverso la redistribuzione del 5-FU, il trasferimento dei mitocondri o il trasferimento di molecole come la timidina o l'enzima coinvolto nella sua produzione.

La citocalasina B (citoB), una micotossina che inibisce la polimerizzazione dell'F-actina, molecola necessaria per la formazione del citoscheletro dei nanotubi, aveva precedentemente dimostrato di inibire la formazione di TNT in varie cellule. La F-actin, o actina filamentosa, è una componente proteica altamente conservata nell'evoluzione e si trova quasi ubiquitariamente nei citoscheletri eucariotici. È conosciuta principalmente per la sua funzione di proteina strutturale e di traslocazione. L'actina si presenta in due forme: l'actina globulare (G-actin), le unità monomeriche libere di actina, e l'actina filamentosa (F-actin) che è la forma polimerica. Queste due forme esistono in un equilibrio dinamico l'una con l'altra poiché la polimerizzazione e la depolimerizzazione associate all'ATP avvengono continuamente all'interno della cellula.

In questo studio nelle cellule MCF-7, è stato osservato che il citoB può inibire efficacemente la formazione di TNT e migliorare citotossicità del 5-FU. Tuttavia l'inibizione della formazione di TNT indotta da citoB era inferiore a quella osservata in altri studi, in cui la citoB poteva inibire la formazione di TNT di oltre il 95%. Quindi sebbene i TNT siano composti principalmente da F-actina, sono stati rilevati anche microtubuli o filamenti di citocheratina nei TNT in varie cellule. Pertanto, una minore efficacia della citoB, che inibisce i TNT attraverso la polimerizzazione della F-actina nelle cellule MCF-7, può suggerire che altri filamenti (microtubuli o filamenti di citocheratina che anch'essi compongono il citoscheletro delle cellule) aiutano a costruire TNT quando l'F-actina è inibita dalla citoB nelle cellule MCF-7 (base per lo sviluppo della resistenza alla citoB?)

Trattamenti chimici tossici e inappropriati, promuovono la comunicazione tra le cellule tumorali e l'ambiente che le circonda, cioè promuovono lo scambio di informazioni e materiale, fondamentale per organizzare una resistenza al trattamento chimico stesso. Promuovono aggressività perché inducono le cellule a intraprendere altri nuovi percorsi di sopravvivenza e crescita.

Traduzione articolo

Riassunto

I tunnel di nanotubi (TNT) sono estensioni tubolari aperte a base di F-actina che si formano in seguito a stress, come deprivazione nutrizionale e stress ossidativo. L'agente chemioterapico 5-fluorouracile (5-FU) rappresenta un fattore di stress significativo per le cellule tumorali e induce carenza di timidina, uno stato simile alla deprivazione nutrizionale. Tuttavia, la capacità del 5-FU di indurre la formazione di TNT nelle cellule tumorali e potenzialmente migliorare la sopravvivenza non è stata esplorata. In questo studio, abbiamo esaminato se il 5-FU può indurre la formazione di TNT nelle cellule di cancro al seno MCF-7. È stato osservato che dosi citotossiche di 5-FU (150–350 μ m) inducono significativamente la formazione di TNT a partire da 24 h dopo l'esposizione. I TNT formati dopo il trattamento con 5-FU probabilmente hanno avuto origine come estensioni delle giunzioni gap quando le cellule MCF-7 si staccano dai cluster cellulari. I TNT fungono da condotti per lo scambio di componenti cellulari e abbiamo osservato lo scambio mitocondriale attraverso i TNT dopo il trattamento con 5-FU. La formazione di TNT indotta da 5-FU è stata inibita di oltre l'80% dopo il trattamento con l'agente depolimerizzante F-actina, la citocalasina B (citoB). L'inibizione dei TNT da parte del citoB corrispondeva a un aumento della citotossicità indotta da 5-FU del 30-62% a partire da 48 h, suggerendo che la formazione di TNT aiuti le cellule MCF-7 a sopravvivere contro 5-FU. Altri

due agenti chemioterapici ampiamente utilizzati, docetaxel e doxorubicina, hanno indotto la formazione di TNT a livelli molto più bassi del 5-FU. Il nostro lavoro suggerisce che il targeting terapeutico dei TNT può aumentare l'efficacia della chemioterapia con 5-FU e diminuire la resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali e questi risultati meritano ulteriori indagini.

Abbreviazioni: 5-FU 5-fluorouracile; CitoB citocalasina B; DOX doxorubicina; DTX docetaxel; MDR1 proteina multiresistente 1; TNT tunnel di nanotubi; TS timidilato sintasi

Introduzione

I tunnel di nanotubi (TNT) sono estensioni tubolari aperte a base di F-actina che vengono utilizzate per la comunicazione cellula-cellula [1-3]. La formazione di TNT è stata osservata in un'ampia gamma di cellule tra cui fibroblasti, cellule epiteliali, neuroni e numerose cellule trasformate. Sebbene i TNT possano esistere a bassi livelli in condizioni basali nella maggior parte delle cellule, la loro formazione è migliorata in risposta a vari stress tra cui deprivazione nutrizionale, luce UV, stress ossidativo e agenti citotossici [3-5]. I TNT formati durante lo stress diventano condotti per lo scambio di proteine e organelli, come i mitocondri, che possono aiutare nella sopravvivenza cellulare [6]. Ad esempio, è stato dimostrato che lo scambio di mitocondri attraverso i TNT salva cellule che sono state danneggiate dalla luce UV [4]. È stato anche dimostrato che i TNT sono condotti per il trasferimento di agenti patogeni come virus (retrovirus, herpesvirus, orthomyxovirus) e prioni [7].

Sebbene la formazione di TNT sia stata osservata in molti tipi cellulari diversi, può diventare sovraregolata con la trasformazione maligna, poiché i TNT sono stati osservati a livelli elevati nelle cellule tumorali tra cui mesotelioma, glioblastoma e carcinomi pancreatici [5, 8, 9]. Nelle cellule tumorali del pancreas, i TNT sono stati osservati per facilitare la ridistribuzione intercellulare della doxorubicina (DOX), che ha consentito una maggiore resistenza al farmaco [9]. È stato anche dimostrato che le cellule tumorali utilizzano i TNT per trasferire proteine coinvolte nella resistenza ai farmaci come la proteina 1 di resistenza multifarmaco (MDR1) [10, 11]. Di conseguenza, i TNT rappresentano potenziali bersagli terapeutici per migliorare l'efficacia della chemioterapia e prevenire la resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali.

Il 5-fluorouracile (5-FU) è un agente chemioterapico ampiamente utilizzato nel trattamento di un'ampia gamma di tumori tra cui tumori della mammella, del colon-retto, dello stomaco e del pancreas [12]. 5-FU è un pro-farmaco che viene metabolizzato in vari prodotti con proprietà antitumorali, tra cui la fluorodeossiuridina monofosfato (FdUMP) che inibisce la timidilato sintasi (TS), un enzima essenziale nella sintesi de novo della timidina [13]. Di conseguenza, il meccanismo citotossico del 5-FU può essere dovuto in parte a una carenza di timidina, necessaria per la sintesi del DNA. Come tutti i farmaci chemioterapici, le cellule tumorali acquisiscono resistenza al 5-FU attraverso vari meccanismi [14, 15].

Il trattamento con 5-FU per le cellule tumorali rappresenta un fattore di stress significativo per le cellule tumorali e induce carenza di timidina, uno stato simile alla deprivazione nutrizionale, che è noto per aumentare la formazione di TNT. Tuttavia, la capacità del 5-FU di indurre la formazione di TNT nelle cellule tumorali e potenzialmente migliorare la sopravvivenza non è stata esplorata. In questo lavoro, esaminiamo queste domande relative a 5-FU e TNT nelle cellule di cancro al seno MCF-7.

Materiali e metodi

Le colture cellulari di cancro al seno denominate MCF-7 sono state ottenute da ATCC (Manassas, VA, USA - ATCC - American Type Culture Collection è un centro globale di risorse biologiche e un'organizzazione di standard senza scopo di lucro e il principale sviluppatore e fornitore di linee cellulari e microrganismi autenticati) e coltivate utilizzando le loro linee guida stabilite. Tutti i reagenti di coltura sono stati ottenuti anche da ATCC. Tutte le sostanze chimiche tra cui 5-FU, docetaxel (DTX), DOX, paraformaldeide e citocalasina B (citoB) sono state ottenute da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). I coloranti fluorescenti falloidin rodamina e MitoTracker Green sono stati ottenuti da Thermo-Fisher (Waltham, MA, USA).

Risultati

- 1) Il trattamento con 5-FU induce la formazione di TNT nelle cellule MCF-7
- 2) La formazione di TNT migliora la sopravvivenza delle cellule MCF-7 contro il trattamento con 5-FU
- 3) Vari trattamenti chemioterapici inducono la formazione di TNT in cellule MCF-7

Discussione

In questo lavoro, abbiamo dimostrato che il 5-FU era particolarmente efficace nell'indurre la formazione di TNT rispetto ad altri farmaci chemioterapici, doxorubicina (DOX) e docetaxel (DTX). È stato anche degno di nota il fatto che il DTX, che principalmente uccide le cellule tumorali inibendo la depolimerizzazione microtubulare, fosse il farmaco meno efficace testato nel causare la formazione di TNT. Il DTX non è associato a stress noti per causare la formazione di TNT, come l'aumento della generazione di specie reattive dell'ossigeno [19], che invece la DOX induce nelle cellule, o la privazione nutrizionale, che invece il 5-FU può imitare esaurendo la timidina attraverso l'inibizione di della sua sintesi. Per comprendere ulteriormente perché il 5-FU fosse così potente nell'indurre la formazione di TNT nelle cellule MCF-7, sarà necessario eseguire un esame dettagliato delle vie di segnalazione che regolano la formazione di TNT [2, 3, 21-23]. È anche possibile che la formazione di TNT possa essere una conseguenza del distacco indotto dallo stress dei cluster cellulari. Sono stati proposti due modelli principali di formazione di TNT: (a) formazione di TNT da sporgenze simili a filopodio che si attaccano a un'altra cellula e (b) TNT ha origine da giunzioni gap di due cellule attaccate che si separano [2, 3]. Dato che le cellule MCF-7 sono altamente attaccate in cluster, è probabile che quest'ultimo modello possa essere più predominante nella formazione di TNT nelle cellule MCF-7 dopo il trattamento chemioterapico. Il 5-FU potrebbe aver indotto una maggiore formazione di TNT a causa del maggiore distacco cellulare delle giunzioni gap che si estendono fino a diventare TNT, che necessita di ulteriori esplorazioni.

La citocalasina B (citoB), una micotossina che inibisce la polimerizzazione dell'F-actina, aveva precedentemente dimostrato di inibire la formazione di TNT in varie cellule [4, 18]. Allo stesso modo, nelle cellule MCF-7, abbiamo osservato che il citoB potrebbe inibire efficacemente la formazione di TNT di oltre l'80%, il che corrispondeva a una citotossicità del 5-FU migliorata del 30-62%. Il potenziamento della citotossicità del 5-FU da parte del citoB suggerisce che la formazione di TNT aiutando la sopravvivenza cellulare nelle cellule MCF-7. Nelle linee cellulari di feocromocitoma (cellule PC12), è stato riscontrato che il trasferimento di mitocondri attraverso i TNT salva le cellule danneggiate dai raggi UV dall'apoptosi [4]. Mentre nelle cellule del cancro del pancreas, i TNT sono stati utilizzati per ridistribuire la DOX tra le cellule per migliorare la sopravvivenza [9]. Nelle cellule MCF-7, la formazione di TNT potrebbe aiutare nella sopravvivenza attraverso la ridistribuzione del 5-FU, il trasferimento dei mitocondri o il trasferimento di componenti cellulari come TS o timidina. La CytoB incide ampiamente sulla polimerizzazione della F-actina, e quindi è possibile che la citotossicità del 5-FU potenziata dalla citoB si sia verificata attraverso l'inibizione della polimerizzazione della F-actina. I nostri dati suggeriscono che esisteva una forte correlazione tra una diminuzione dei livelli di TNT e un aumento della citotossicità del 5-FU. Nei nostri studi, l'inibizione della formazione di TNT indotta da citoB era inferiore a quella osservata in altri studi, in cui la citoB poteva inibire la formazione di TNT di oltre il 95% [4]. Sebbene i TNT siano composti principalmente da F-actina, sono stati rilevati anche microtubuli o filamenti di citocheratina nei TNT in varie cellule [24]. Pertanto, una minore efficacia della citoB che inibisce i TNT attraverso la polimerizzazione della F-actine nelle cellule MCF-7 può suggerire che altri filamenti aiutano a costruire TNT quando l'F-actina è inibita dalla citoB nelle cellule MCF-7.

La formazione di nanotubi a tunnel è stata osservata in un'ampia gamma di cellule tumorali, compresi i tumori solidi [8]. I TNT possono non solo aiutare nella sopravvivenza delle cellule tumorali, ma possono anche promuovere la resistenza ai farmaci [9-11]. Gli agenti chemioterapici come il 5-FU utilizzati nella chemioterapia combinata sono inizialmente molto efficaci nel trattamento del carcinoma mammario metastatico, ma perdono efficacia nel tempo poiché le cellule tumorali sviluppano resistenza ai farmaci. La

resistenza ai farmaci al 5-FU coinvolge molti meccanismi, comprese le mutazioni nel TS e la sovraregolazione dei trasportatori di efflusso del farmaco (cioè MDR1) [14, 15]. È stato dimostrato che MDR1 viene trasferito tra le cellule attraverso i TNT, e quindi potrebbe anche essere un meccanismo mediante il quale i TNT promuovono la sopravvivenza cellulare nelle cellule MCF-7 dopo il trattamento con 5-FU [10, 11]. È probabile che i TNT possano trasportare altre proteine come i TS per promuovere la sopravvivenza e la resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali dopo il trattamento chemioterapico. Nel complesso, il targeting terapeutico dei TNT può aumentare l'efficacia del 5-FU e diminuire la resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali e merita ulteriori indagini.