

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze del Farmaco

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: MEDICINA MOLECOLARE
CURRICOLO: MEDICINA RIGENERATIVA
CICLO XXXI

**ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA DI DERIVATI
FUROCUMARINICI ATTIVATI DA BLUE LIGHT IN LINEE
CELLULARI DI CARCINOMA PROSTATICO E VESCICALE**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Co-Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Giorgia Miolo

Dottorando: Giulio Sturaro

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Carcinoma prostatico	5
1.2 Carcinoma vescicale	10
1.3 Terapia fotodinamica	16
1.4 PUVA terapia	18
1.5 4,6,4'-Trimetilangelicina	27
1.6 8-Metossipsoralene	28
2. SCOPO	29
3. MATERIALI E METODI	30
3.1 Sostanze	30
3.2 Isolamento dei fotoaddotti	30
3.3 Relaxation assay	31
3.4 Fotoossidazione	31
3.5 Cross-linking assay	31
3.6 Colture cellulari	32
3.7 Trattamenti	32
3.8 Saggio di formazione delle sfere	33
3.9 Immunofluorescenza	33

3.10 Citofluorimetria	35
3.11 Produzione di specie reattive dell'ossigeno	37
3.14 Quantificazione delle proteine	39
3.15 Western Blot	40
3.16 Analisi di espressione mediante RT-PCR	42
3.17 Analisi statistica	45
4. RISULTATI	46
4.1 Lesioni al DNA indotte da 8-MOP e TMA attivate da UVA o BL	46
4.2 Effetti sulla linea cellulare DU145	52
4.3 Effetti sulla linea cellulare T24	60
5. DISCUSSIONE	69
6. CONCLUSIONI	77
7. RINGRAZIAMENTI	78
8. BIBLIOGRAFIA	79
9. PUBBLICAZIONI	90

RIASSUNTO

Il carcinoma prostatico e quello vescicale sono ad oggi le patologie tumorali a maggiore incidenza nella popolazione maschile e quelli con i più alti tassi di mortalità. Quest'ultima è connessa all'elevata frequenza di ricadute derivante da una scarsa efficacia dei trattamenti disponibili, spesso caratterizzati da invasività e tossicità. Un nuovo approccio per la cura di questi tumori potrebbe essere rappresentato dalla fotochemioterapia nella quale i farmaci vengono attivati per svolgere la loro funzione direttamente sul sito interessato, riducendo quindi la tossicità alle cellule sane limitrofe. L'attività antiproliferativa dei composti usati in questa pratica, psoraleni ed angelicine, in seguito ad attivazione con luce UVA, è ben nota ed in gran parte dovuta alla loro capacità di interagire con il DNA formando monoaddotti (MA) e legami crociati (XL). Tuttavia, il maggior svantaggio dell'utilizzo delle furocumarine in associazione a luce UVA è rappresentato dal rischio di mutagenicità legato sia alla loro capacità di legare covalentemente l'acido nucleico che alla tossicità della stessa radiazione utilizzata. La possibilità di fotoattivare questo tipo di molecole con blue light (BL) potrebbe rappresentare un'innovazione nel campo della fotochemioterapia perché andrebbe a migliorarne i più comuni limiti operativi ed effetti collaterali riscontrati con l'utilizzo di UVA. BL, diversamente da UVA, possiede una più profonda penetrazione tissutale, permettendo quindi il potenziale trattamento di tumori più invasivi, e al contempo presenta una minore mutagenicità. Inoltre, da un punto di vista tecnico, le fibre ottiche usate in terapia fotodinamica (PDT) hanno un migliore rendimento nel trasporto di BL rispetto a quello di UVA sia da un punto di vista della diffusione della luce che della quantità di radiazione trasmessa.

Poiché 8-MOP e TMA, nonostante i loro bassi coefficienti di estinzione molare (ϵ), sono in grado di essere fotoattivate da BL, in questa tesi è stato verificato se l'associazione delle due sostanze con questo tipo di radiazione potesse esercitare un effetto antiproliferativo su linee cellulari di tumore prostatico (DU145) e vescicale (T24), fornendo una prima indicazione su un loro possibile utilizzo nella fototerapia locale di tali neoplasie.

Esperimenti su DNA isolato hanno confermato la capacità di queste molecole di formare MA e XL, produrre tagli ai filamenti e fotoossidare le basi dell'acido nucleico quando attivate da UVA; la fotoattivazione mediante BL induceva, invece, sia una diminuzione quantitativa che una variazione nella tipologia delle lesioni alla macromolecola. Questa diminuzione risultava di gran lunga maggiore nel caso di

TMA che, al contrario di 8-MOP, in seguito ad attivazione con BL non era in grado di formare XL e di fotoossidare il DNA.

8-MOP e TMA più BL possedevano una buona attività antiproliferativa risultante dall'induzione del processo apoptotico e dalla formazione di ROS. Inoltre, queste molecole modulavano lo stato di attivazione di p38 ed ERK1/2 con entrambe le tipologie di irradiazione. Tuttavia, i dati raccolti hanno evidenziato che TMA possedeva una maggiore efficacia rispetto a 8-MOP essendo attiva a dosi minori. Inoltre, non era genotossica, come mostrato dalla valutazione dello stato di fosforilazione dell'istone H2AX sia nelle cellule DU145 che nelle T24, quando irradiata con UVA o BL.

TMA/BL, inoltre, modulava in modo negativo la via di segnale canonica di Wnt; infatti aumentava le forme fosforilate di β -catenina e di GSK3 β alla tirosina 216 e diminuiva i livelli nucleari di β -catenina. L'inibizione di questa via si traduceva nella diminuzione dell'espressione di alcuni suoi geni target, quali ciclina D1, c-Myc e CD44 nella sua variante v6, come evidenziato dalla RT-PCR. Oltre ad una diminuita espressione a livello di trascritto si registrava anche una riduzione dell'espressione proteica di CD44 in tutti i campioni trattati con TMA. Studi sul docking tra TMA e la glicoproteina CD44 hanno evidenziato come la sua ridotta espressione non fosse imputabile ad una interazione diretta tra le due molecole, ma conseguente all'inibizione della via Wnt. Quest'ultima era dovuta alla modulazione dello stato di fosforilazione alla tirosina 216 di GSK3 β , come suggerito dal parziale recupero dell'espressione di β -catenina nucleare ed alla riduzione della sua forma fosforilata in seguito a trattamento con LiCl. I dati raccolti hanno suggerito, inoltre, che lo stato di attivazione di GSK3 β potesse essere mediato da ERK1/2, in quanto TMA/BL induceva una diminuzione della sua forma fosforilata.

In conclusione, TMA fotoattivata da BL può rappresentare un'interessante opzione per la fotochemioterapia dei carcinomi prostatico e vescicale non invasivo, in quanto tale trattamento è in grado di inibire vie chiave per la crescita e la progressione tumorale in assenza di effetti genotossici.

ABSTRACT

Prostate and bladder cancer are currently the most common tumors in the male population and those with the highest mortality rates. The latter is related to the high incidence of relapses resulting from a lack of efficacy of available treatments, often characterized by invasiveness and toxicity. A new approach for the management of these cancers could be represented by photochemotherapy where the drugs are directly activated on the diseased area, thus reducing toxicity to neighboring healthy cells. The antiproliferative activity of the compounds, psoralenes and angelicins, following activation with UVA, light is well known and largely due to their ability to interact with DNA forming monoadducts (MAs) and cross-links (XLs). However, the major disadvantage of the use of furocoumarins in combination with UVA light is represented by the risk of mutagenicity linked both to their ability to covalently bind the nucleic acid and to the toxicity of the radiation. The possibility of photoactivate this type of molecule with blue light (BL) could represent an innovation in the field of photochemotherapy because it would improve the most common operational limits and side effects connected with the use of UVA. BL, unlike UVA, has a deeper tissue penetration, thus allowing the potential treatment of more invasive tumours, and at the same time has a lower mutagenicity. Moreover, from a technical point of view, the optical fibers used in photodynamic therapy (PDT) have a better performance to deliver BL than UVA both from the point of view of light diffusion and the amount of transmitted radiation.

Since 8-MOP and TMA are able to be photoactivated by BL, despite their low coefficients of molar extinction, this thesis verified whether the association of the two compounds with this type of radiation exerted an antiproliferative effect on cell lines of prostate cancer (DU145) and bladder (T24) cell lines, providing an initial indication of their possible use in local phototherapy of these cancers.

Experiments on isolated DNA have confirmed the ability of these molecules to form MAs and XLs, produce strand breaks and photooxidation of nucleic acid bases when activated by UVA. However, photoactivation by BL induced, both a quantitative decrease and a variation in the type of lesions in the macromolecule. This decrease was far greater in the case of TMA, which, unlike 8-MOP, was unable to form XLs and photooxidize DNA after activation with BL.

8-MOP and TMA plus BL had good antiproliferative activity resulting from the induction of the apoptotic process and the formation of ROS. In addition, these molecules modulated the activation status of p38 and ERK1/2 with both types of

irradiation. However, TMA had a higher activity than 8-MOP being active at lower doses, and was not genotoxic, as shown by the evaluation of the phosphorylation status of histone H2AX in both DU145 and T24 cells, when irradiated with UVA or BL. TMA/BL also modulated Wnt's canonical signal pathway in a negative way; in fact, it increased the phosphorylated forms of β -catenin and GSK3 β (to tyrosine 216) and decreases the nuclear levels of β -catenin. The inhibition of this pathway lead to a decrease in the expression of some of its target genes, such as cyclin D1, c-Myc and CD44v6, as demonstrated by RT-PCR. In addition to decreased expression at transcript level, there was also a reduction in protein expression of CD44 in all samples treated with TMA. Studies on the docking between TMA and CD44 have shown that its reduced expression was not due to a direct interaction between the two molecules, but consequent to the inhibition of the Wnt pathway.

The latter was due to the modulation of the phosphorylation state at tyrosine 216 of GSK3 β , as suggested by the partial recovery of the expression of nuclear β -catenin and the reduction of its phosphorilated form after treatment with LiCl. The collected data also suggest that the activation status of GSK3 β may be mediated by ERK1/2, as TMA/BL induced a decrease in its phosphorylated form.

In conclusion, TMA photoactivated by BL may represent an interesting option for photochemotherapy of non-invasive prostate and bladder carcinomas, because this treatment is able to inhibit key pathways for tumour growth and progression in the absence of genotoxic effects.

1. INTRODUZIONE

1.1 Carcinoma prostatico

La prostata, o ghiandola prostatica, è una struttura anatomica di forma rotondeggiante dell'apparato genitale maschile situata sotto la vescica e di fronte al retto. Ha la funzione di secernere il liquido prostatico, uno dei costituenti dello sperma, coinvolto nella maturazione e veicolazione degli spermatozoi. Il cancro alla prostata è il tumore non cutaneo più comunemente diagnosticato e la seconda causa principale di morte per neoplasia, negli uomini, a livello globale. Il tasso di incidenza di questa patologia nelle ultime due decadi ha registrato un continuo aumento anche grazie all'adozione metodica dello screening per l'antigene prostatico specifico (PSA) come diagnosi precoce (Daniyal et al., 2014; Salinas et al., 2014).

Il PSA, chiamato anche callicreina-3 (KLK3), è una glicoproteina prodotta dalla ghiandola prostatica normalmente rilevabile in piccole quantità nel sangue e nel liquido seminale; svolge la funzione fisiologica di mantenere fluido il seme promuovendo la motilità dello sperma attraverso il muco della cervice uterina. È una proteina quasi esclusivamente espressa dalle cellule prostatiche e la sua trascrizione è regolata dai livelli degli ormoni androgeni; sebbene non sia un marker specifico per la patologia tumorale prostatica è molto utilizzato da un punto di vista clinico per la diagnosi iniziale della neoplasia e soprattutto per monitorarne la risposta alle terapie. I livelli ematici di PSA risultano molto elevati nei pazienti affetti dal tumore ma anche nel caso di patologie non maligne come, ad esempio, l'ipertrofia prostatica benigna o semplici infiammazioni. A causa di questa non assoluta specificità, la diagnosi di neoplasia viene effettuata anche tramite altri esami quali l'analisi con ultrasuoni transrettali, l'esame digitale rettale e la biopsia (Amaro et al., 2014; Pezaro et al., 2014). Un altro marcatore recentemente entrato nella prassi diagnostica è l'antigene 3 del cancro alla prostata (PCA3). PCA3 è un RNA non codificante di funzione sconosciuta. Viene analizzato con metodi di amplificazione dell'RNA dai sedimenti urinari. A differenza di PSA, questo marcatore è espresso in modo specifico dalle cellule tumorali della prostata. Tuttavia, all'aumento della specificità si contrappone una ridotta sensibilità e quindi il PCA3 viene applicato in associazione al PSA, dove può essere utile nel ridurre il numero di biopsie non necessarie in caso di una precedente biopsia negativa negli uomini con elevati livelli di PSA (Pezaro et al., 2014).

Sebbene le cause siano ancora sconosciute, studi epidemiologici hanno considerato un gran numero di fattori correlati allo sviluppo del tumore prostatico. Il rischio di insorgenza è direttamente correlato all'aumento dell'età; infatti, l'incidenza è più elevata negli uomini al di sopra dei 50 anni. Inoltre, l'incidenza della neoplasia è aumentata in persone di razza africana e in quelle aventi una storia familiare positiva per questa patologia. Altri fattori che possono contribuire allo sviluppo della neoplasia possono essere l'obesità, elevati livelli di ormoni maschili, fumo, esposizione ad agenti chimici e mutazioni ai geni BRCA1 e BRCA2 che sono mutazioni ereditarie della linea germinale (Pezaro et al., 2014; Tabayoyong and Abouassaly, 2015). I BRCA1/2 sono geni onco-soppressori coinvolti in vie di segnale importanti per il controllo dei danni al DNA, come la regolazione della trascrizione e la riparazione della rottura a doppio filamento. Questi geni hanno molteplici domini funzionali e interagiscono con numerose proteine coinvolte in numerosi processi biologici. Il BRCA1 è coinvolto in tutte le fasi del ciclo cellulare e regola gli eventi durante la progressione cellulare. Normalmente BRCA1 attiva la risposta cellulare ai danni al DNA che possono bloccare la proliferazione e favorirne l'apoptosi, sottoponendo le cellule ad elevato rischio di trasformazione maligna. Il gene BRCA2, invece, è coinvolto nella riparazione del DNA. Mutazioni di questi geni ne minano le funzioni portando ad un accumulo di danni al DNA, soprattutto in cellule in fase di replicazione, che sfociano successivamente in tessuti tumorali (Cavanagh e Katherine, 2015). Screening, come i test per PSA e PCA3, uniti alla valutazione di altri fattori di rischio, stanno prendendo sempre più importanza sia per evitare l'uso di ulteriori test invasivi, come le biopsie, sia per scongiurare diagnosi errate; questo è dovuto al fatto che la neoplasia presenta molto spesso un lento decorso, frequentemente con assenza di sintomi soprattutto negli stadi iniziali, rendendo alle volte molto difficile compiere una diagnosi appropriata (Pezaro et al., 2014).

La maggior parte dei tumori prostatici sono adenocarcinomi in quanto la neoplasia si sviluppa nelle cellule ghiandolari, mentre altri casi più rari comprendono il carcinoma a cellule squamose, il carcinoma a cellule ad anello con castone, il carcinoma a cellule transazionali, il carcinoma neuroendocrino e il sarcoma. In caso di metastasi questo tipo di tumore è in grado di diffondere sia localmente, attraverso l'invasione diretta delle vescicole seminali, della vescica o dei tessuti circostanti, sia localizzarsi in punti più distanti, come ad esempio cervello e reni (Guandagli et al., 2014; Okoye et al., 2014).

1.1.1 Opzioni terapeutiche per il carcinoma prostatico

La scelta della strategia terapeutica più adeguata avviene in seguito alla valutazione di diversi parametri, quali l'estensione anatomica del tumore e l'aggressività della neoplasia, i valori di PSA iniziali, le condizioni generali del paziente in termini di età, aspettativa di vita e presenza di situazioni di co-morbidità, ovvero la coesistenza di più patologie nello stesso paziente, che possono rappresentare un rischio di morte più elevato di quello del carcinoma prostatico stesso (Grozescu et al., 2017). Nei pazienti in cui il carcinoma è circoscritto alla sola prostata la scelta solitamente ricade sulla vigile attesa o sorveglianza attiva, sulla chirurgia o sulla radioterapia accoppiata o meno alla terapia ormonale; invece, nel caso in cui il carcinoma sia diffuso anche ad altri tessuti od organi i trattamenti maggiormente utilizzati sono la chemioterapia e la terapia ormonale (Sternberg et al., 2014).

1.1.1.1 Chirurgia

Le pratiche chirurgiche più comunemente utilizzate in caso di cancro alla prostata sono rappresentate dalla prostatectomia radicale e dall'orchietomia. La prostatectomia radicale consiste nella rimozione chirurgica della prostata, delle vescicole seminali e dei linfonodi loco-regionali. Rappresenta l'approccio più comunemente utilizzato nei casi in cui il tumore sia circoscritto alla sola prostata, nei primi stadi della neoplasia e qualora non ci sia stata alcuna risposta positiva alla radioterapia. Questa tecnica può essere effettuata in diversi modi; la tipologia più comune di prostatectomia radicale è rappresentata dalla prostatectomia retropubica, nella quale avviene la rimozione della prostata attraverso un'incisione addominale, mentre si parla di prostatectomia perineale nel caso in cui l'incisione sia praticata a livello del perineo. In altri casi la rimozione della prostata può avvenire per via laparoscopica, in modo molto meno invasivo (Lepor, 2005). Nonostante sia una tecnica molto utilizzata, la prostatectomia può dare luogo a varie conseguenze negative tra le quali le più comuni sono incontinenza ed impotenza nei pazienti trattati. Nel caso in cui le caratteristiche del tumore lo consentano, per ridurre la possibilità di insorgenza di tali conseguenze, può essere adottata una tecnica chiamata prostatectomia radicale nerve-sparing, che consente di preservare i fasci nervosi che decorrono in prossimità della prostata e consentire un più facile recupero dall'intervento (Michl et al., 2015).

Alternativamente, può essere effettuata l'orchietomia, ovvero l'asportazione di entrambi i testicoli, per ridurre i livelli di testosterone, fattore implicato nella crescita e

nello sviluppo del tumore prostatico. Tale tecnica è stata quasi totalmente abbandonata a causa dell'irreversibilità della procedura e degli importanti risvolti psicologici nel paziente. Infine, è possibile eradicare le cellule tumorali esponendo la prostata a bassissime temperature mediante una tecnica denominata criochirurgia. Nel 90% dei casi però l'utilizzo di questo metodo di trattamento ha come conseguenza lo sviluppo di impotenza nel paziente (Bahn et al., 2002).

1.1.1.2 Chemioterapia

La chemioterapia ha un ruolo ben riconosciuto nella gestione del cancro alla prostata, soprattutto nei casi di tumore ormono-refrattario. Viene utilizzata come seconda linea di trattamento nei casi in cui la terapia ormonale non abbia dato buoni risultati o in caso di tumori in stadio avanzato o che presentano una metastatizzazione in altri organi e tessuti. Sebbene per questa tipologia di tumore la chemioterapia non rappresenti un trattamento di prima scelta, è utilizzata come efficace strumento per la prevenzione di eventuali recidive in seguito a trattamento chirurgico o radioterapico (Bracarda et al., 2005).

Il farmaco chemioterapico d'elezione per il trattamento del carcinoma prostatico è il Docetaxel (DTX), appartenente alla famiglia dei taxani; questa classe di molecole, legandosi alla β -tubulina, stabilizza la polimerizzazione e la depolimerizzazione dei microtubuli. Il blocco di questo dinamico processo cellulare porta all'attivazione di numerose vie di segnale che inducono apoptosi a causa del blocco della mitosi, attivazione di Bcl-2 e blocco della trascrizione data dal recettore per gli androgeni (Hurwitz, 2015).

Un altro farmaco usato nel caso di tumore prostatico è il Carbazitaxel, anch'esso appartenente alla famiglia dei taxani. Quest'ultimo ha dimostrato una buona efficacia in pazienti trattati con ormonoterapia associata alla chemioterapia e in pazienti resistenti al DTX (Kotsakis et al., 2016). Nell'ultimo periodo numerosi studi clinici hanno, inoltre, sottolineato come l'associazione di farmaci della famiglia dei taxani con la somministrazione di prednisone migliori la risposta terapeutica e il profilo di tossicità (Hurwitz, 2015).

1.1.1.3 Radioterapia

In alternativa alle pratiche chirurgiche ed alla chemioterapia un altro approccio usato contro il tumore alla prostata è rappresentato dalla radioterapia. Questa tecnica si basa sull'emissione di un fascio di radiazioni ionizzanti ad alta energia diretto contro le cellule tumorali; viene usata nei casi di tumori prostatici molto aggressivi ed in stato

avanzato, generalmente associata alla terapia per la deprivazione degli androgeni (ADT). Numerosi studi clinici hanno evidenziato come il co-trattamento con ADT e radioterapia aumenti sensibilmente l'aspettativa di vita dei pazienti rispetto all'utilizzo delle due pratiche separate (Warde et al., 2011).

Negli ultimi anni la radioterapia classica è stata soppiantata da due nuove forme di trattamento più efficaci e meno lesive per i pazienti: la radioterapia conformazionale (3D-CRT) e la radioterapia ad intensità modulata (IMRT). La 3D-CRT rappresenta una forma a fasci esterni in grado di definire e di ricostruire tridimensionalmente i volumi degli organi interessati dal trattamento; questa tecnica permette un netto miglioramento in termini di sopravvivenza libera da recidiva. Purtroppo la persistenza di tumore locale residuo dopo la radioterapia convenzionale rappresenta ancora un problema non indifferente. L'insuccesso nell'eradicazione della malattia è probabilmente dovuto alla presenza di cloni cellulari tumorali resistenti e ad imprecisioni nella determinazione del volume tumorale da irradiare. La 3D-CRT è in grado di definire in modo specifico i tessuti da irradiare e di calcolare con estrema precisione la dose da distribuire in ogni punto dell'area interessata, risolvendo quindi le problematiche inerenti ad una non omogenea distribuzione della radiazione. Grazie alla sua innovatività questa tecnica ha permesso, inoltre, di ridurre la tossicità agli organi adiacenti anche utilizzando dosi elevate di radiazioni (Zelefsky et al., 2001). Nei casi di tumori particolarmente aggressivi viene usata la IMRT; anche questa tecnica permette una modulazione dell'intensità di radiazione da vari angoli di emissione e si è dimostrata particolarmente efficace quando associata ad ADT. Il grande vantaggio di questa tecnica rispetto alla radioterapia classica è la sua capacità di somministrare dosi anche molto elevate di radiazioni alla prostata riducendo al minimo l'esposizione agli organi circostanti. Anche questo approccio terapeutico non è esente da effetti collaterali, tra i quali i più riscontrati dai pazienti sono disturbi alla minzione, affaticamento e stanchezza generale e sintomi intestinali (Mohiuddin et al., 2015).

1.1.1.4 Ormonoterapia

Numerosi studi hanno evidenziato che nel tumore alla prostata la componente staminale, soprattutto nelle fasi iniziali sia sostenuta dalla presenza di testosterone. Sulla base di questa osservazione un approccio possibile per contenere lo sviluppo del tumore è rappresentato dalla ADT. Questo approccio risulta particolarmente efficace quando associato ad altre tecniche come, ad esempio, in seguito alla chirurgia o in concomitanza con la radioterapia. Usata come trattamento a sé stante l'ADT, in seguito a lunghi periodi di trattamento, dà solitamente origine a popolazioni

cellulari che non necessitano più della presenza di testosterone per la loro crescita finendo col perdere di efficacia (Di Zazzo et al., 2016).

Attualmente la ADT si basa sulla somministrazione di farmaci in grado di inibire direttamente la sintesi degli androgeni. Esistono due categorie di questi farmaci che possono anche essere usati in associazione: agonisti ed antagonisti dell'ormone di rilascio ipotalamico delle gonadotropine (GnRH) e antiandrogeni. Gli antagonisti del GnRH sopprimono, agendo direttamente a livello ipotalamico, la produzione di androgeni. A questa classe di farmaci appartengono il Degarelix e l'Abarelix, i quali vengono somministrati tramite iniezioni sottocutanee nell'area addominale. Gli agonisti del GnRH, invece, agiscono sopprimendo la produzione ormonale attraverso un processo di regolazione negativa. I farmaci antiandrogeni sono in grado di bloccare la crescita delle cellule tumorali prostatiche inibendo l'attività del testosterone in quanto si legano in modo competitivo ai suoi recettori. I farmaci maggiormente usati di questa classe sono il ciproterone acetato (CPA), un derivato dell'idrossiprogesterone, la flutamide e la bicalutamide, più sicuri e con meno effetti collaterali rispetto al precedente poiché sono in grado di salvaguardare maggiormente le funzioni sessuali (Rove et al., 2014).

Tra i più comuni effetti collaterali riscontrati durante questa terapia si annoverano affaticamento, disfunzioni sessuali, ginecomastia, vampate di calore e problemi cardiocircolatori (Mohiuddin et al., 2015).

1.2 Carcinoma vescicale

La vescica è un organo cavo muscolo-membranoso situato nella cavità pelvica che assolve il compito di raccogliere l'urina derivante dai reni. La sua parete è composta da quattro tonache: mucosa, sottomucosa, muscolare e avventizia. Il tumore alla vescica rappresenta il quarto tipo di neoplasia più comunemente riscontrata negli uomini e la nona nelle donne. La maggior parte dei tumori vescicali origina a livello della tonaca mucosa, in seguito ad alterazioni maligne delle cellule dell'epitelio di transizione, la cui proliferazione diventa incontrollata (Zhang X e Zhang Y, 2015).

Il tumore vescicale più frequentemente diagnosticato è quello che ha origine dalle cellule transizionali e viene generalmente suddiviso in *alto* e *basso* grado. Quello di *alto* grado è la forma più aggressiva e tende ad invadere il tessuto muscolare, diffondendosi poi ai tessuti e agli organi adiacenti, mentre il tumore di *basso* grado, presenta caratteristiche meno invasive e solitamente si riscontra in seguito a trattamento di un precedente tumore all'organo. Il carcinoma vescicale può inoltre essere classificato anche in muscolo-invasivo e in non muscolo-invasivo, in base alla

sua capacità di invadere la tonaca muscolare vescicale. Sulla base dell'evoluzione della patologia, il carcinoma vescicale può essere presente in quattro stadi, che vanno dallo stadio 0, in cui le lesioni neoplastiche sono localizzate a livello epiteliale, allo stadio IV, in cui il tumore invade la parete pelvica o addominale, diffondendosi poi ai linfonodi o ad altre parti del corpo come ad esempio le ossa, il fegato e i polmoni. (Ohishi et al., 2015).

Si è visto che questa tipologia di tumore aumenta con l'avanzare dell'età e, sebbene non se ne conoscano le cause, numerosi studi ne hanno associato l'insorgenza ad una serie di fattori di rischio sia ambientali che genetici. Tra i più comuni fattori di rischio ambientali si annoverano fumo di sigaretta, esposizione a prodotti chimici e gas tossici industriali, infiammazione della vescica dovuta a infezioni microbiche e parassitarie da Schistosomiasi e alcuni effetti avversi dei farmaci usati per il trattamento del cancro alla vescica. Oltre all'esposizione ambientale anche numerose alterazioni genetiche concorrono all'aumento di rischio di insorgenza del tumore vescicale; a differenza di altre neoplasie le mutazioni genetiche implicate nell'insorgenza di questa tipologia di cancro non appartengono alla linea germinale bensì a quella somatica e quindi non sono ereditabili.

Le mutazioni genetiche alla base della neoplasia vescicale colpiscono soprattutto geni aventi un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare prevenendo che le cellule si dividano in modo troppo rapido e incontrollato come, ad esempio, CCND1, TERT, HRAS, e TP53. CCND1 e TP53 codificano rispettivamente per ciclina D1 e p53, due proteine molto importanti per un corretto svolgimento della duplicazione cellulare; il gene TERT, è coinvolto nella protezione del DNA, nei processi di invecchiamento cellulare e nel cancro. Numerosi studi hanno dimostrato che mutazioni di questo gene si verificano durante la carcinogenesi e che tali mutazioni possono essere presenti in qualsiasi fase dello sviluppo tumorale dell'urotelio. Il gene TERT produce una proteina, la trascrittasi inversa del complesso della telomerasi, che aumenta la lunghezza dei telomeri, strutture che si trovano alle estremità dei cromosomi e proteggono il materiale genetico e sono anche associate al processo di invecchiamento cellulare. La proteina HRAS codificata dall'omonimo gene è normalmente coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare in risposta allo stimolo dato dai fattori di crescita; quando alterata, risulta permanentemente attivata anche in assenza di stimolo portando di conseguenza ad una incontrollata crescita cellulare (Zhang X e Zhang Y, 2015).

1.2.1 Opzioni terapeutiche del carcinoma vescicale

Per stabilire il miglior approccio terapeutico per il carcinoma vescicale vengono presi in considerazione una serie di fattori, quali le dimensioni della massa tumorale, lo stadio clinico del tumore, il grado di infiltrazione delle cellule tumorali nella parete della vescica e la loro diffusione nelle strutture adiacenti. Vengono, inoltre, valutati anche il quadro clinico generale del paziente, eventuali trattamenti precedenti, l'età, l'aspettativa di vita e la risposta ai possibili effetti collaterali del trattamento. Su questa base, ad oggi, il tumore alla vescica viene affrontato tramite chirurgia, terapia intravesicale, chemioterapia convenzionale, radioterapia e immunoterapia. Queste pratiche possono essere utilizzate in combinazione fra loro in base alla tipologia e alla gravità della patologia con l'obiettivo di ottenere una terapia il più efficace possibile e scongiurare il rischio di recidive (Soria et al., 2016).

1.2.1.1 Chirurgia

Gli approcci chirurgici al carcinoma vescicale sono sostanzialmente di due tipi, resezione transuretrale e cistectomia, scelti in base alla tipologia, allo stadio della patologia e della sua conseguente espansione. Nei tumori agli stadi iniziali e non invasivi si predilige la resezione transuretrale. Viene effettuata sia per verificare la presenza del tumore e il suo grado di infiltrazione nell'organo, sia per rimuoverne la massa. Per raggiungere l'interno dell'organo viene utilizzato un resectoscopio con il quale viene asportata la massa tumorale tramite un filamento ad anello posto alla sommità dello strumento. In seguito, per avere la sicurezza di aver asportato l'intera massa tumorale, gli eventuali residui possono essere rimossi tramite folgorazione per mezzo di laser ad alta energia. Questa opzione terapeutica viene generalmente eseguita in anestesia spinale o totale (Zapala et al., 2018).

La cistectomia viene, invece, presa in considerazione quando il tumore è di tipo invasivo, può essere parziale o totale a seconda delle dimensioni e della gravità dell'infiltrazione del carcinoma. Quando questo ha raggiunto la tonaca muscolare, ma la sua estensione risulta limitata ad una piccola zona, si predilige la cistectomia parziale; in questo caso, viene rimossa solo la parte interessata della vescica assieme ai linfonodi limitrofi che sono successivamente analizzati. Questo approccio risulta particolarmente vantaggioso in quanto non risulta necessario ricostruire la vescica, anche se la struttura residua presenterà una capacità di volume minore, costringendo i pazienti ad urinare con maggiore frequenza (Kurpad e Woods, 2015).

La cistectomia radicale viene, invece, effettuata nei casi in cui il tumore risulti esteso e presente in più aree diverse della vescica. Questa metodologia prevede la completa

asportazione dell'organo e di tutti i linfonodi della zona limitrofa. Inoltre, negli uomini sono generalmente asportate anche la prostata e le vescicole seminali, mentre nella donna le ovaie, le tube di Falloppio, l'utero, la cervice e talvolta una piccola porzione di vagina. In seguito a questo drastico intervento risulta necessaria la ricostruzione della vescica. Sulla base della situazione medica generale e delle richieste del paziente vengono effettuate la diversione incontinente, la diversione continente o la ricostruzione vescicale. La diversione incontinente viene eseguita usando un piccolo pezzo di intestino il quale, connesso agli ureteri, viene collegato ad una sacca posizionata al di fuori dell'addome del paziente. La diversione continente viene invece realizzata formando una sacca con un pezzo di intestino, la quale è connessa ai reni tramite gli ureteri e alla parete addominale con una specifica valvola la quale permette al paziente di svuotare la sacca tramite un apposito catetere. Nel caso di ricostruzione di una nuova vescica, la porzione di intestino, utilizzata per sopperire alla mancanza dell'organo, viene connessa all'uretra, permettendo al paziente di urinare normalmente (Lee et al., 2014).

1.2.1.2 Terapia intravesicale

La terapia intravesicale viene generalmente effettuata in seguito a resezione transuretrale nei casi di tumore non invasivo per ridurre al minimo il rischio di recidive. Gli agenti terapeutici utilizzati in questa pratica non sono in grado di raggiungere gli strati più profondi della parete vescicale o le strutture extravescicali come ad esempio i reni e l'uretere, ma presentano il vantaggio di essere in grado di colpire in modo selettivo le cellule tumorali senza intaccare quelle sane. Tuttavia, questo approccio può comunque dar luogo a irritazioni fastidiose e sensazioni di calore a livello dell'organo (Gözen et al., 2017). Per l'attuazione di questa pratica possono venire inseriti all'interno della vescica, tramite un apposito catetere, agenti sia immunoterapici che chemioterapici.

Tramite l'approccio immunoterapico viene sfruttata l'attivazione delle cellule del sistema immunitario del paziente per eliminare le residue cellule tumorali eventualmente rimaste in seguito a rimozione chirurgica della massa tumorale.

Nel caso di tumore allo stadio iniziale come agente immunoterapico viene utilizzato il *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). Il complesso meccanismo attraverso cui agisce il BCG non è ancora del tutto chiaro; è noto che questo batterio è in grado di legarsi all'urotelio inducendo in tal modo un'inflammatione che porta al rilascio di citochine pro-infiammatorie che, a loro volta, richiamano le cellule del sistema immunitario innato come i macrofagi e i granulociti neutrofili. La conseguente produzione di

citochine e chemochine attira infine le cellule T e le cellule NK che, attraverso la citolisi, sono responsabili dell'effetto antitumorale finale.

Questa tecnica non è particolarmente indicata nei pazienti con ridotta capacità vascolare e cardiaca, in pazienti immunodeficienti o che presentano una qualche patologia polmonare. Inoltre, l'età è un fattore estremamente importante da tenere in considerazione in quanto all'aumentare degli anni si riduce la capacità di risposta del sistema immunitario (Soria et al., 2016).

1.2.1.3 Chemioterapia

In caso di tumore vescicale l'agente chemioterapico può venire somministrato sia per via intravesicale, qualora la patologia sia allo stadio iniziale e quindi localizzata, o per via sistemica per raggiungere eventuali punti di metastatizzazione in caso di malattia ad uno stadio avanzato. La chemioterapia sistemica può essere utilizzata come terapia neoadiuvante, terapia adiuvante o come aiuto alla radioterapia. Principalmente viene usata come terapia neoadiuvante, ovvero effettuata prima della radioterapia o di un intervento chirurgico per ridurre le dimensioni della massa tumorale e facilitarne la successiva asportazione.

In alternativa, l'approccio chemioterapico può essere adottato in seguito al trattamento chirurgico o radioterapico, come terapia adiuvante, per eliminare eventuali cellule tumorali rimaste. Numerosi studi hanno, inoltre, verificato come una combinazione tra radioterapia e chemioterapia permetta di ottenere ottimi risultati dal punto di vista di eradicazione del tumore, permettendo la diminuzione sia delle dosi di radiazione che di concentrazione del farmaco. I farmaci possono essere somministrati da soli o in combinazione sulla base del loro meccanismo d'azione e dello stato clinico generale del paziente. Il cisplatino, la mitomicina in associazione al 5-fluorouracile vengono usati nella chemioterapia sistemica associata a radioterapia. Nella chemioterapia come trattamento a sé stante le associazioni più frequenti sono, invece, gemcitabina e cisplatino; metotressato, vinblastina, doxorubicina in combinazione con cisplatino (MVAC); cisplatino, metotressato e vinblastina (CMV); carboplatino e paclitaxel o decetaxel per pazienti con ridotta funzionalità renale. Tali combinazioni vengono somministrate in cicli che normalmente durano qualche settimana, intervallati da un periodo di riposo per permettere al corpo di recuperare (Abufaraj et al., 2016).

I principali effetti collaterali di questi farmaci sono principalmente legati alla loro capacità di agire maggiormente su cellule in rapida crescita, le quali sono presenti non solo a livello tumorale ma anche in altri tessuti. I pazienti generalmente riscontrano nausea e vomito con conseguente perdita di appetito, caduta di capelli,

piaghe alla bocca, diarrea o costipazione, aumento del rischio di infezioni per la diminuita produzione di globuli bianchi ed emorragia o ecchimosi, in seguito a piccoli tagli, per diminuita produzione di piastrine insieme ad affaticamento a causa di una minor produzione di globuli rossi. Normalmente, tali effetti spariscono una volta terminato il trattamento (Mari et al., 2017).

1.2.1.4 Radioterapia

La radioterapia come approccio terapeutico al carcinoma vescicale viene utilizzata come parte del trattamento negli stadi iniziali, in seguito alla chirurgia, ove non fosse stato possibile asportare l'intera massa tumorale, oppure come trattamento principale nel caso di tumori ai primi stadi. Inoltre, può essere effettuata per ridurre la massa tumorale prima di procedere all'asportazione chirurgica in caso di tumori in stadi avanzati. Spesso la chemioterapia viene usata in combinazione con la radioterapia per rendere quest'ultima più efficace e in questo caso si parla di chemioradiazione. L'irradiazione dura generalmente pochi minuti e la terapia risulta del tutto indolore. Il trattamento di solito è composto da cinque sedute a settimana per alcune settimane. Per scegliere la corretta dose di radiazioni e la giusta angolazione del fascio da usare nel trattamento è necessaria una sessione di preparazione, chiamata simulazione. Sfortunatamente, anche questo trattamento presenta alcuni effetti collaterali (in base alla dose utilizzata e all'area trattata), tra cui cambiamenti cutanei della zona irradiata (rossori, vesciche, perdita di pelle), nausea e vomito, fastidi vescicali (calore, dolore nell'urinare, presenza di sangue nelle urine), diarrea, affaticamento dovuto ad un basso ematocrito (Ma et al., 2018).

1.2.1.5 Immunoterapia

L'immunoterapia consiste nell'utilizzare farmaci che permettono ed aiutano il sistema immunitario a riconoscere e a distruggere le cellule tumorali. Oltre al trattamento con BCG, il quale viene usato negli stadi iniziali della patologia, altri approcci immunoterapici rappresentano una valida alternativa negli stadi più avanzati o in carcinomi che si ripresentano dopo trattamento chemioterapico.

Il sistema immunitario vanta la grande capacità di saper riconoscere quelle che sono le proprie cellule (*self*) da quelle estranee (*non self*), grazie a molecole checkpoint o cellule che vengono attivate o disattivate, innescando la risposta immunitaria. Tuttavia, le cellule tumorali sono spesso in grado di eludere questi meccanismi ed essere riconosciute come *self*. In questo contesto, sono stati progettati e sintetizzati farmaci capaci di legarsi alle molecole checkpoint (Butt e Malik, 2018).

Tra queste ultime si ricorda PD-1 (*Programmed death-cell 1*) e PD-L1 (*Programmed death ligand 1*). PD-1 è una proteina transmembrana espressa soprattutto a livello dei linfociti T e B, che gioca un ruolo importante nella sotto-regolazione del sistema immunitario e reprime l'attività delle cellule T infiammatorie. La proteina rappresenta un checkpoint della risposta immunitaria e contrasta meccanismi che possono portare a fenomeni autoimmuni, promuovendo l'apoptosi nelle cellule T presentanti l'antigene e riducendola in quelle T regolatorie. PD-1 lega un'altra proteina transmembrana, PD-L1, che risulta essere sovraespressa nelle cellule attivate del sistema immunitario (macrofagi, cellule dendritiche e linfociti) e in molti tumori. Il legame con PD-L1 provoca una soppressione della via di segnale di PD-1 e una conseguente diminuzione dell'attività immunitaria verso le cellule presentanti la suddetta proteina. Farmaci come atezolizumab, durvalumab e avelumab si legano a PD-L1, mentre nivolumab e pembrolizumab si legano a PD-1 impedendone il legame con PD-L1. Ostacolando il legame tra queste proteine checkpoint viene, quindi, migliorata la risposta immunitaria antitumorale da parte delle cellule T. Questi farmaci vengono somministrati generalmente ogni due o tre settimane per via endovenosa o per infusione. Gli effetti collaterali più comuni sono nausea e conseguente perdita di appetito, affaticamento, febbre, diarrea o costipazione, rash cutanei e infezioni del tratto urinario (Sunshine e Taube, 2015; Powles et al., 2017).

1.3 TERAPIA FOTODINAMICA

La terapia fotodinamica (PDT) è un metodo non invasivo e altamente selettivo per la distruzione di cellule e tessuti indesiderati. È una pratica clinicamente approvata già da un quarto di secolo: inizialmente per il trattamento di un ristretto numero di tumori, si è via via ampliata enormemente fino a comprendere aree di applicazione diverse tra loro come cardiologia, urologia, immunologia e dermatologia. La PDT viene anche usata con successo per il trattamento di infezioni virali, contro ceppi batterici e funghi resistenti agli antibiotici, per l'inattivazione di agenti patogeni negli emoderivati e per la sterilizzazione dell'acqua.

Tra i principali vantaggi di questa tecnica vi è la sua elevata selettività. Si basa sulla presenza simultanea di tre componenti: un agente fotosensibilizzante (PS), ossigeno molecolare e luce visibile o quasi infrarossa (NIR), nessuno dei quali è tossico o in grado di danneggiare cellule e tessuti da solo. Il PS viene generalmente somministrato in forma stabile ed inattiva per via topica, endovenosa o intraperitoneale in base alla patologia da trattare e si accumula preferenzialmente nelle cellule da colpire. Quando viene irradiato ad una certa lunghezza d'onda, il PS

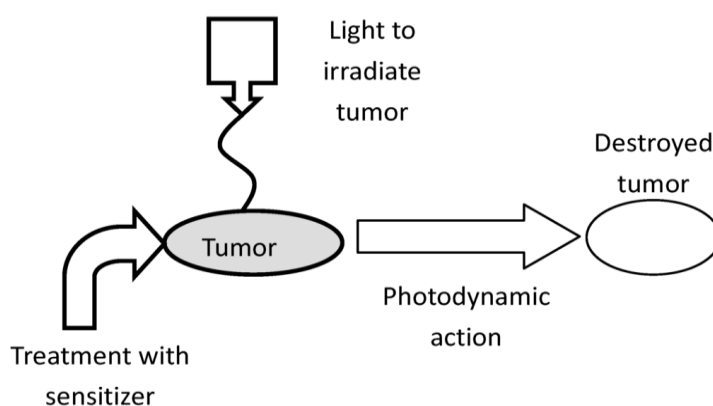
raggiunge uno stato eccitato e di maggiore instabilità energetica (stato di singoletto). In questa forma instabile il PS attivato rilascia energia attraverso l'emissione di calore, luce o si converte ad uno stato energetico intermedio (stato di tripletto) prima di tornare al suo stato fondamentale. Il fotosensibilizzante nel suo stato di tripletto è in grado di produrre i radicali superossido e idrossilico (attraverso reazioni di tipo 1) o convertire l'ossigeno molecolare presente nei tessuti in forma di ossigeno singoletto (1O_2) (reazione di tipo 2). Queste specie reattive dell'ossigeno (ROS) danneggiano ed uccidono le cellule bersaglio, ledono la rete vascolare del tumore e attivano la risposta immunitaria (Master et al., 2013; Benov, 2015).

A livello molecolare l'attore principale del danno indotto dal trattamento di PDT è l'ossigeno singoletto dato che le cellule contengono un'ampia serie di biomolecole che sono potenziali bersagli per l'ossidazione. Il bersaglio principale è rappresentato dalle proteine a causa della loro abbondanza a livello cellulare; i residui amminoacidici non reagiscono tutti allo stesso modo con l'ossigeno singoletto e ciò dà luogo a danni selettivi a determinate catene amminoacidiche. Amminoacidi come cisteina, metionina, tirosina, istidina e triptofano sono siti primari di modifica ossidativa delle proteine da parte dei ROS. Le proteine, inoltre, possono anche essere direttamente modificate dalla PDT tramite legame diretto con il PS. Un altro bersaglio molecolare è rappresentato dai lipidi; sono meno abbondanti delle proteine ma il loro alto contenuto di grassi insaturi, soprattutto a livello delle biomembrane, rende la membrana cellulare e altri organelli ottimi bersagli per l'ossigeno singoletto e i ROS prodotte dai PS. Un fattore aggiuntivo, che contribuisce al danno lipidico indotto dalla PDT, è l'alta solubilità dell'ossigeno nei lipidi; un PS in un ambiente lipidico ha una maggiore possibilità di incontrare ossigeno molecolare rispetto ad un ambiente acquoso e quindi di produrre 1O_2 . I ROS danno inizio a reazioni a catena di radicali liberi che distruggono il doppio strato lipidico delle membrane cellulari e generano al contempo prodotti di reazione biologicamente attivi e chimicamente reattivi. Le conseguenze della perossidazione lipidica non si limitano quindi al danneggiamento diretto degli acidi grassi, ma anche alla modifica di proteine e polinucleotidi. In aggiunta, oltre a modificare le funzioni delle membrane cellulari, la perossidazione lipidica porta ad alterazioni del metabolismo e delle vie di segnale cellulari portando, quindi, alla morte della cellula (Benov, 2015).

I fotosensibilizzanti utilizzati in PDT possono essere classificati in fotosensibilizzanti ad attivazione tissutale o vascolare. I PS ad attivazione tissutale richiedono ore o giorni per raggiungere concentrazioni terapeutiche nei tessuti da trattare e vengono attivati mediante luce laser. Questo ritardo tra la somministrazione del farmaco e la sua attivazione viene definito come "l'intervallo di luce del farmaco". Questi farmaci si

possono accumulare anche in altri tessuti, come la pelle e gli occhi, e possono essere attivati all'interno di tali strutture per un certo periodo di tempo dopo la somministrazione rendendo necessaria la loro protezione. I fotosensibilizzanti ad attivazione vascolare raggiungono, invece, concentrazioni utili al trattamento, all'interno dei vasi, in pochi minuti e hanno quindi il vantaggio di avere un breve "intervallo di luce". Questo permette che la somministrazione del farmaco e la sua irradiazione possano essere effettuati in un'unica seduta. Inoltre, questo tipo di PS viene metabolizzato rapidamente dall'organismo permettendo la dimissione del paziente senza particolari misure di prevenzione il giorno stesso del trattamento (Arumainayagam e Moore, 2010).

Ad oggi, la PDT risulta un valido strumento per il trattamento sia del carcinoma prostatico sia di quello vescicale anche grazie alla produzione ed al miglioramento di fibre ottiche che consentono di ridurre l'invasività della pratica. Gli agenti fotosensibilizzanti più utilizzati appartengono alla famiglia delle porfirine, molecole caratterizzate da uno scheletro eterociclico costituito da quattro molecole di pirrolo unite tramite ponti metinici, e l'acido 5-aminolevulinico (5-ALA) precursore della sintesi dei derivati porfirinici (Bader et al., 2012).



Rappresentazione schematica della terapia fotodinamica (PDT) per il trattamento del tumore

1.4 PUVA terapia

Mentre nella PDT si ricorre ad una radiazione nel visibile o nel vicino infrarosso, la PUVA (psoralene+UVA), anch'essa utilizzata per il trattamento di patologie cutanee, si avvale della componente UV della luce (Baker, 1984). In particolare, la luce UVA penetra profondamente nella cute, arrivando fino al derma e per questo motivo deve essere utilizzata con cautela. L'esposizione non deve essere, infatti, prolungata o frequentemente ripetuta negli anni, perché, come accade con l'esposizione non

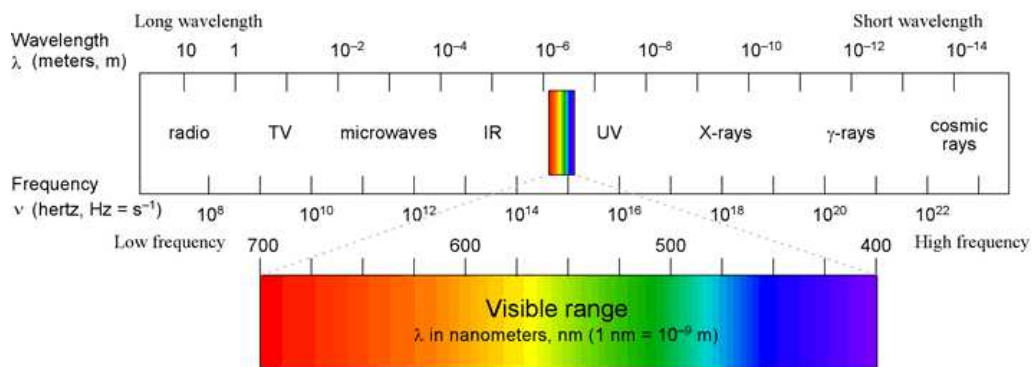
protetta da opportuni filtri ai raggi solari, il paziente potrebbe riscontrare importanti effetti collaterali, come l'invecchiamento della pelle fino allo sviluppo di forme tumorali cutanee maligne (Epstein JH., 1999).

Grazie all'attività iperpigmentante, eritematogena ed antiproliferativa di alcuni agenti fotosensibilizzanti, quali le furocumarine, è stato identificato il target principale dell'azione fotochimica, ovvero le basi pirimidiniche. Queste molecole possono quindi agire come agenti alchilanti il DNA e bloccare le funzioni cellulari; in questo senso, la PUVA inibisce la proliferazione cellulare dei cheratinociti, mentre stimola quella dei melanociti e la loro differenziazione (Nordlund e Lerner, 1982).

Poiché si legano al DNA delle cellule tumorali, rallentandone così la proliferazione, sono oggetto di studio come potenziali agenti antitumorali. Se non è ancora chiara la sicurezza del trattamento PUVA sulle cellule del melanoma, a causa degli effetti mutageni sulle cellule sane, *in vitro* si è visto come alcune furocumarine riescano ad inibire la proliferazione delle cellule di alcune forme tumorali, come, ad esempio, quelle del carcinoma mucoepidermoide o di quello mammario (Wu et al., 1992; Scaffidi et al., 2011; Panno et al., 2014).

1.4.1 Lo spettro elettromagnetico e la radiazione UV

Lo spettro elettromagnetico è costituito dall'insieme delle frequenze delle radiazioni elettromagnetiche. In base alle diverse lunghezze d'onda, vi si possono distinguere diverse regioni: quella dell'infrarosso compresa tra i 1800 e i 700 nm, quella del visibile tra i 780 e i 400 nm, e quella dell'ultravioletto al di sotto dei 400 nm.



Spettro elettromagnetico

Le radiazioni UV occupano quella porzione dello spettro elettromagnetico con lunghezza d'onda compresa tra 100 e 400 nm e si dividono in tre categorie principali:

- UVA (315-400 nm);
- UVB (280-315 nm);
- UVC (100-280 nm).

I raggi UVA costituiscono la quasi totalità degli ultravioletti e non provocano effetti in forma acuta a livello cutaneo, come possono essere eritemi e scottature, ma portano ad effetti negativi a lungo termine. Infatti, essendo in grado di penetrare in profondità fino al derma, sono i principali responsabili dell'invecchiamento cutaneo prematuro e possono favorire lo sviluppo di forme tumorali, quali il melanoma e il carcinoma cutaneo a cellule basali (Kavouras et al., 2015). Gli UVB sono più energetici ma inferiori in quantità rispetto agli UVA; causano danni sia a breve che a lungo termine, penetrando nell'epidermide. L'esposizione prolungata agli UVB è stata associata al rischio di cheratosi attinica e melanoma, per la capacità di compromettere i normali meccanismi fotoprotettivi della pelle; sembra sia responsabile di forme tumorali cutanee (Aubin et al., 2001). Sia gli UVA, che gli UVB hanno, però, un effetto sulla proliferazione dei melanociti e sulla sintesi della melanina (Abdel-Naser, 2003). I raggi UVC, invece, sono particolarmente dannosi per la salute, ma non inducono particolari effetti sulla pelle, perchè vengono trattenuti dalla fascia di ozono. Vengono più comunemente utilizzati per la disinfezione di acqua ed aria, e di dispositivi medici (Bichai et al., 2011).

1.4.2 Fotochimica

Quando una molecola assorbe una radiazione UV o visibile, avvengono una serie di processi fotochimici; tale assorbimento si traduce in un passaggio della molecola da uno stato elettronico fondamentale ad uno eccitato, con energia superiore.

Le transizioni elettroniche che si verificano in seguito all'assorbimento di una radiazione da parte di una molecola sono strettamente correlate a determinate caratteristiche strutturali; la lunghezza d'onda della luce assorbita dipende dalla presenza di un cromoforo nella struttura stessa, ovvero gruppi di atomi con caratteristiche assorbenti specifiche. Di solito, quando si parla di cromofori, ci si riferisce a gruppi aromatici di- o tricyclici, o a sistemi di doppi legami coniugati.

Secondo quanto afferma il Principio di Pauli, in condizioni standard le molecole si trovano allo stato fondamentale, che presenta gli elettroni nello stato energeticamente più favorevole, ovvero con spin opposti. Quando la molecola passa dallo stato fondamentale (S_0) a quello eccitato, gli elettroni più esterni dell'orbitale vengono promossi ad un livello energetico superiore, dove possono rimanere appaiati in uno

stato eccitato di singoletto (S_1), oppure possono subire un'inversione di spin, che porterà lo stato di singoletto ad evolvere in tripletto (T), più stabile.

Nello stato fondamentale e in quelli eccitati vi sono diversi stati vibrazionali e rotazionali, pertanto un salto elettronico può essere accompagnato da variazioni di energia vibrazionale e rotazionale. Poiché gli stati quantici vibrazionali sono molto più vicini dei livelli elettronici, ed ancora di più di quelli rotazionali, essi provocano la formazione di bande larghe che compaiono quando si registra uno spettro di assorbimento di una radiazione che interagisce con molecole poliatomiche in soluzione.

Gli stati di singoletto e tripletto vengono indicati con S_n e T_n , dove n è il numero che indica i diversi livelli energetici; $n=0$ indica lo stato fondamentale, e man mano che il valore di n cresce, maggiore sarà la distanza degli elettroni dal nucleo quindi maggiore sarà il contenuto di energia.

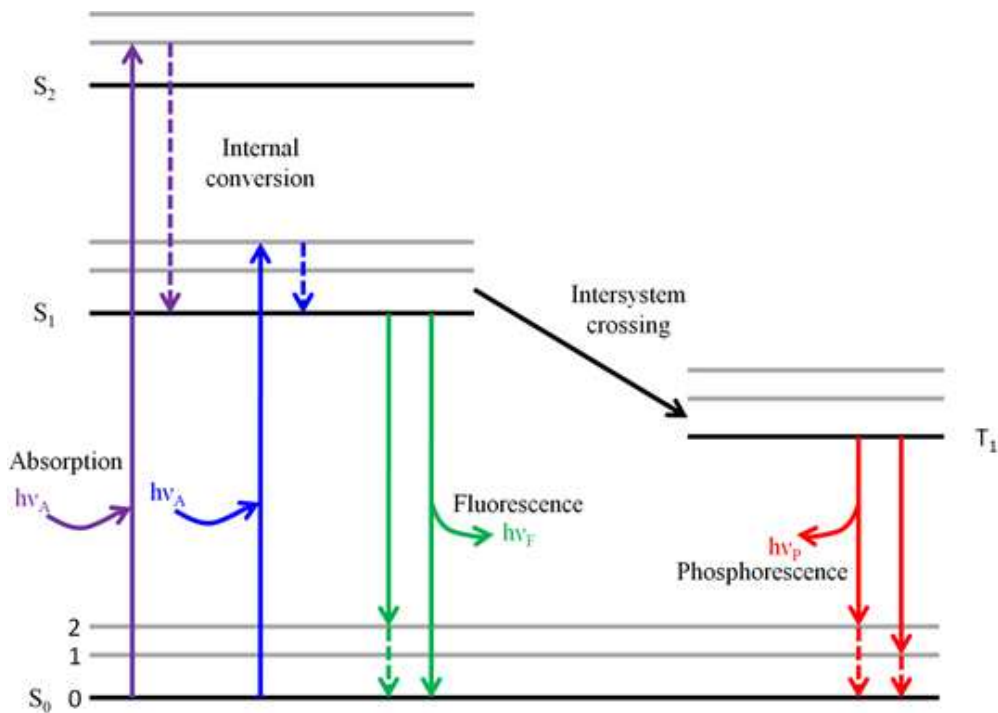


Diagramma di Jablonski che riporta schematicamente i livelli energetici e le transizioni possibili

Dopo essere state eccitate, le molecole tendono però a ritornare al loro stato fondamentale. In particolare, quando una molecola decade dallo stato S_1 allo stato S_0 , si verificano una serie di trasformazioni, durante le quali l'energia viene ceduta o assorbita sotto forma di radiazione elettromagnetica (processi radiativi), oppure la transizione tra livelli energetici differenti avviene ad energia costante (processi non radiativi).

Il decadimento da uno stato vibrazionale di singoletto eccitato a uno stato vibrazionale di singoletto a minor energia, quindi livelli con stessa molteplicità di spin, viene definito conversione interna (IC), mentre il decadimento con variazione di molteplicità, con conseguente passaggio da singoletto a tripletto, è detto *intersystem crossing* (ISC). Sia IC che ISC sono due processi non radiativi.

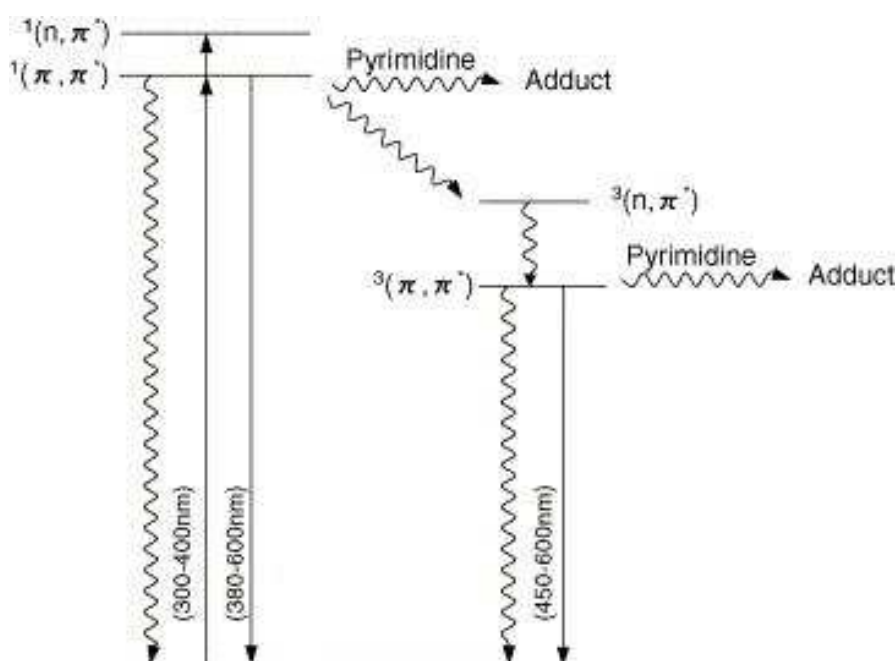
Il decadimento da S_1 o T_1 allo stato fondamentale S_0 avviene molto lentamente perché questi sono gli stati eccitati più stabili, a più lunga vita, e responsabili della maggior parte delle reazioni fotochimiche.

I processi accompagnati da emissione di radiazione che possono, invece, avvenire sono emissione di fluorescenza, dove si passa dallo stato eccitato di singoletto allo stato fondamentale di singoletto, e di fosforescenza, nella quale dallo stato di tripletto si arriva a quello di singoletto.

Due differenti tipi di transizioni elettroniche interessano le furocumarine nella regione UV, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.

Nelle transizioni $n \rightarrow \pi^*$ si crea lo stato eccitato $n\pi^*$, quando gli elettroni dell'ossigeno carbonilico vengono eccitati dalla radiazione, e transitano dall'orbitale n all'orbitale a più alta energia, cioè quello π^* .

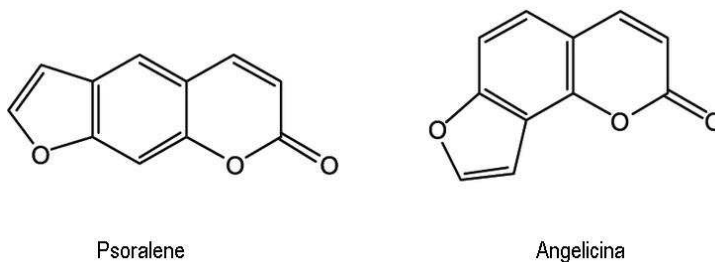
Nelle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ invece sono coinvolti gli elettroni π , che vengono eccitati all'orbitale π^* , dando luogo così allo stato eccitato $\pi\pi^*$.



Rappresentazione schematica dei livelli energetici degli psoraleni allo stato eccitato

1.4.3 Furocumarine

Le Furocumarine sono composti di origine naturale che posseggono importanti proprietà fotobiologiche. Dal punto di vista chimico derivano dalla condensazione di un anello furanico con un nucleo cumarinico; possono formarsi diversi isomeri, grazie alle diverse possibilità di condensazione, e per questo motivo si distinguono furocumarine lineari e furocumarine angolari, rispettivamente psoraleni e angelicine.



Struttura chimica di psoraleni ed angelicine

Queste sostanze naturali derivano dal mondo vegetale e sono state originariamente individuate ed isolate nella *Psoralea coryfolia* e nell'*Angelica archangelica*, ma poi ritrovate, assieme ai loro derivati, anche in moltissime altre specie.

Con l'avvento della fototerapia, questi composti sono stati oggetto di moltissimo interesse per il trattamento di malattie cutanee; l'applicazione topica di questi farmaci, e la successiva attivazione con luce, provoca eritema, edema e pigmentazione della cute (Caffieri, 2002). I principali effetti sono attribuiti all'attivazione con la radiazione ultravioletta, quindi con lunghezza d'onda compresa tra i 400 e i 320 nm, ma sono noti anche effetti farmacologici, seppur di scarsa intensità, in assenza di irradiazione.

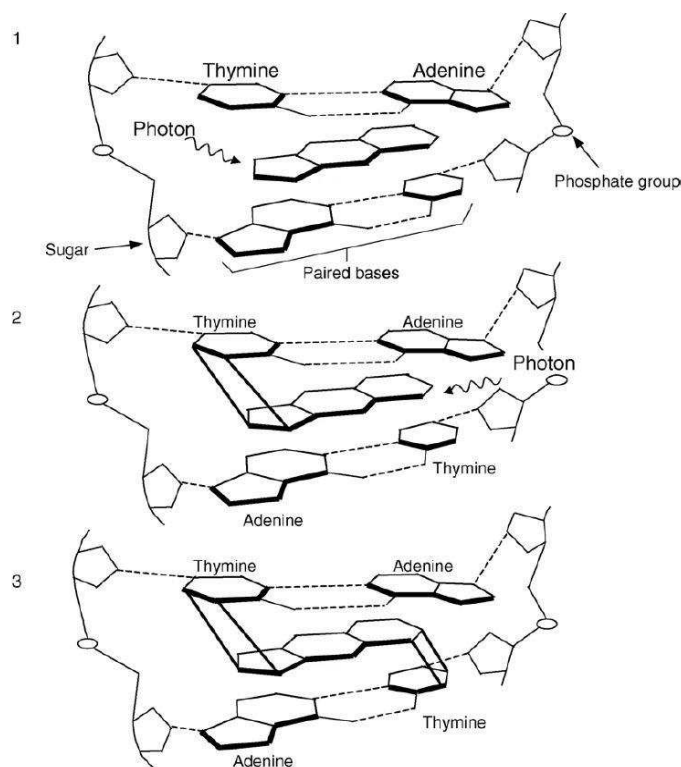
Le furocumarine agiscono attraverso due tipi di meccanismi (Kitamura et al., 2005):

- Meccanismo fotodinamico. Questo tipo di meccanismo richiede la presenza dell'ossigeno, e prevede due tipi di reazione che portano alla formazione di ROS. Nelle reazioni di tipo I si assiste al trasferimento di elettroni tra la furocumarina eccitata e l'ossigeno molecolare, in particolare la furocumarina nello stato di tripletto viene ridotta da un donatore di elettroni, che può essere ad esempio una delle basi del DNA, e dona gli elettroni all'ossigeno, con formazione di idroperossidi, che evolveranno poi in anione superossido e radicale ossidrilico. Nelle reazioni di tipo II, invece, la furocumarina eccitata allo stato di tripletto

trasferisce l'energia all'ossigeno, che si trova allo stato fondamentale, e si forma quindi l'ossigeno singoletto, altamente reattivo e responsabile del danno ossidativo di numerose molecole biologiche. Le specie radicaliche, quali $^1\text{O}_2$, anione superossido ($\cdot\text{O}_2$), radicale ossidrilico ($\cdot\text{OH}$), e perossido di idrogeno (H_2O_2), sono molto reattive verso le componenti cellulari; possono, infatti, determinare l'ossidazione dei lipidi di membrana, degli amminoacidi, delle proteine e degli acidi nucleici (Bordin et al., 1991).

- Meccanismo non fotodinamico. Si tratta, in questo caso, di una reazione ossigeno indipendente, in cui il PS reagisce direttamente con il composto di destinazione (reazione di tipo III); la furocumarina allo stato di singoletto reagisce con il DNA allo stato fondamentale. In particolare, in seguito ad irradiazione con luce UV (320-400 nm), si formano, tra i filamenti dell'acido nucleico, monoaddotti e legami crociati tramite legame preferenziale alle basi pirimidiniche. Il danno al DNA si traduce in un forte effetto antiproliferativo. L'interazione tra le furocumarine e il DNA avviene in due step (Song e Tapley, 1979). Nel primo si ha la formazione di un complesso molecolare quando la molecola si trova ancora nel suo stato fondamentale; numerosi studi dimostrano la grande affinità delle furocumarine per il DNA anche al buio, sebbene questa interazione sia di debole entità e facilmente dissociabile (Dalla Via et al., 2012). La molecola si intercala nel doppio filamento formando un complesso molecolare che favorisce la successiva formazione di cicloaddotti con le basi pirimidiniche. Nel secondo step, in seguito ad irradiazione, la furocumarina si lega in modo covalente con le basi pirimidiniche del DNA. Il modo attraverso cui le furocumarine angolari, ovvero le angelicine, formano cicloaddotti con il DNA è molto diverso rispetto a quello degli psoraleni, in quanto questi presentano struttura completamente planare. Le furocumarine presentano due siti fotoreattivi: il doppio legame 3,4 e il doppio legame 4',5'. Mentre negli psoraleni entrambi i siti fotoreattivi possono legarsi con il doppio legame 5,6 di due basi pirimidiniche, le angelicine, in virtù della loro struttura angolare, presentano un solo sito fotoreattivo che si può allineare con il doppio legame di una base pirimidinica del DNA (Kitamura et al., 2005). Potendo, quindi, usufruire di entrambi i siti di legame gli psoraleni formano legami covalenti tra le basi pirimidiniche dei due filamenti complementari di DNA originando legami crociati,

mentre le angelicine legano quasi esclusivamente una base pirimidinica con formazione di monoaddotti. Sulla base di queste differenti capacità di legame gli psoraleni sono definiti molecole bifunzionali, mentre le angelicine monofunzionali. (Bissonnette et al., 2008). Gli psoraleni preferenzialmente formano C4-cicloaddotti con le basi pirimidiniche tramite il loro sito reattivo in 4',5'. In seguito alla formazione di questo primo legame, se viene assorbita ulteriore energia, un'altra base pirimidinica viene legata tramite il sito reattivo in 3,4 con formazione di un legame crociato. Qualora il monoaddotto si formi, invece, tra il sito 3,4 dello psolarene e il doppio legame in 5,6 della base pirimidinica, la molecola non è più in grado di assorbire ulteriore energia per cui non può dare origine alla formazione di legami crociati (Kitamura et al., 2005). Al contrario, le angelicine, essendo molecole angolari monofunzionali, formano con il DNA quasi esclusivamente un monoaddotto 4',5' con la timina. Infatti, anche se l'angelicina presenta entrambi i siti fotoreattivi precedentemente descritti, a causa della sua conformazione sterica, non è in grado di mettere a disposizione il doppio legame in 3,4 per legare le basi pirimidiniche, dando luogo quindi solo alla formazione di monoaddotti e non di legami crociati.



Rappresentazione schematica del meccanismo di legame delle furocumarine al doppio filamento di DNA.

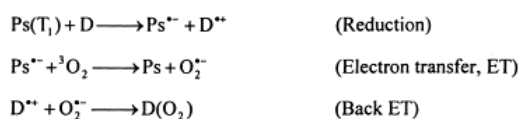
Esistono anche altre reazioni con formazione di specie radicaliche anioniche e cationiche, anch'esse in grado di reagire con un determinato substrato (reazione di auto-ionizzazione). Si è visto come le furocumarine, sempre in seguito all'attivazione con la luce, possano alchilare il DNA e produrre ROS, meccanismi che vengono considerati per il loro eventuale impiego contro alcune forme tumorali. Le furocumarine non trovano impiego solamente nel trattamento delle affezioni della pelle, ma agiscono anche ostacolando la proliferazione e la crescita di cellule tumorali, perché si legano al DNA rendendo difficoltosa la proliferazione e la crescita tumorale, e producono ROS fortemente reattivi nei confronti dei substrati biologici.

(i) *Formation of excited states:*



(ii) *Pathways of photosensitization:*

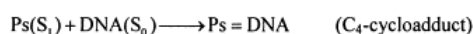
Type I. Electron transfer mechanism: Photosensitizer triplet state reacts with an electron donor D.



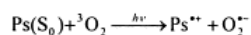
Type II. Electron-exchange type mechanism.



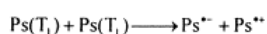
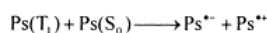
Type III. Photobinding to, e.g., DNA.



(iii) *Direct electron transfer.*



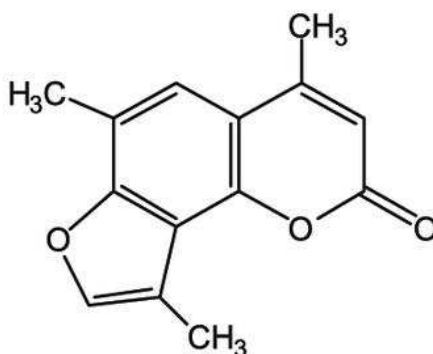
(iv) *Autoionization.*



Possibili reazioni degli psoraleni in seguito ad irradiazione

1.5 4,6,4'-Trimetilangelicina

La 4,6,4'-trimetilangelicina (TMA) è una furocumarina angolare che, in associazione con luce UVA, esercita una significativa attività antiproliferativa grazie alla sua capacità di produrre ROS e di formare addotti al DNA. È in grado, inoltre, di fotolegarsi ai lipidi e di fotoossidare sia lipidi che proteine (Cadet et al., 1990; Chen et al., 1994). Su questa base, la TMA è stata valutata come potenziale agente terapeutico non solo per patologie cutanee ma anche per malattie ematologiche, tra cui β -talassemia, leucemia, ed anemia falciforme (Lampronti et al., 2003).



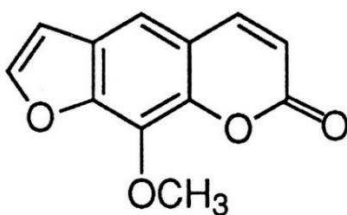
4,6,4'-Trimetilangelicina

Struttura chimica della 4,6,4'-Trimetilangelicina

Inoltre, è stato dimostrato che TMA, anche in assenza di fotoattivazione, può legare proteine intracellulari, quali il Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) e il Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (Borgatti et al., 2011). Queste ultime interazioni sono alla base dell'utilizzo della molecola nel trattamento della fibrosi cistica, malattia genetica su base autosomica recessiva causata da un difetto del gene CFTR. La proteina CFTR è una proteina transmembrana che funziona da canale per gli ioni cloro e una sua anomalia porta alla produzione di muco denso e viscoso che può ostruire i rami dell'albero bronchiale. Si instaura uno stato infiammatorio sostenuto da una forte attivazione di NF- κ B, fattore di trascrizione, che legandosi al DNA induce l'espressione di citochine proinfiammatorie, e dal rilascio di interleuchina (IL)-8 (Becker et al., 2004). Si ha, quindi, un'alterazione nella regolazione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella risposta immunitaria alle infezioni batteriche, che negli stadi avanzati possono cronicizzare (Laselva et al., 2016). In questa patologia, TMA si è rivelata in grado di modulare il fenomeno infiammatorio, di inibire il legame di NF- κ B con il DNA e di potenziare l'efflusso del cloro. Per tali motivi, nel giugno 2013, TMA è stata riconosciuta dall'EMA (European Medicines Agency) come farmaco orfano per il trattamento della fibrosi cistica (EU/3/13/1137).

1.6 8-Metossipsoralene

Alla classe delle furocumarine lineari, gli psoraleni, appartiene l'8-metossipsoralene (8-MOP). Questa molecola è attualmente utilizzata in PUVA terapia per la cura di malattie cutanee, quali vitiligine, psoriasi ed eczemi. Questo composto trova, inoltre, impiego nella fotoferesi per la cura di alcune malattie autoimmuni, quali il lupus eritematoso, come trattamento antirigetto nel caso di trapianti d'organo e contro linfomi cutanei.



8-Metossipsoralene

Struttura chimica dell'8-Metossipsoralene

La fotoferesi extracorporea (ECP) è una terapia immunomodulante su base cellulare che prevede la separazione del plasma ricco di leucociti seguita dalla somministrazione *ex vivo* di un PS irradiato successivamente con UVA prima della reinfusione nell'organismo.

Nel trattamento delle malattie autoimmuni il meccanismo d'azione di 8-MOP non è stato ancora del tutto chiarito e sembra essere dovuto ad un insieme di fattori; nel caso invece del linfoma cutaneo a cellule T e del rigetto del trapianto d'organo si ritiene che la sua efficacia sia dovuta alla sua capacità di legarsi covalentemente al DNA dei leucociti, separati tramite fotoferesi, provocandone l'arresto del ciclo cellulare e la morte cellulare per apoptosi (Alfred et al., 2017).

In virtù della sua conformazione planare, che gli consente di intercalarsi al DNA, e alla sua capacità di formare legami covalenti con le basi pirimidiniche dell'acido nucleico, esercitando un effetto antiproliferativo, 8-MOP è stato studiato anche come possibile agente chemioterapico in diversi tumori solidi, come ad esempio i melanomi. Il suo buon effetto antiproliferativo è tuttavia controbilanciato dalla sua capacità di dare legami crociati al DNA in seguito ad irradiazione con UVA; questo tipo di legame covalente è sì alla base del suo meccanismo d'azione, ma rappresenta anche un grave danno genotossico qualora avvenga in cellule sane. I legami crociati infatti, a differenza dei monoaddotti che la molecola può formare, sono molto più difficilmente riparabili dalle cellule e possono dar luogo a mutazioni genetiche dannose.

2. SCOPO

L'attività antiproliferativa delle furocumarine (psoraleni e angelicine), in seguito ad attivazione con luce UVA è ben nota e in gran parte dovuta alla loro capacità di interagire con il DNA formando monoaddotti e legami crociati. Tuttavia, il maggior svantaggio dato dall'utilizzo delle furocumarine in associazione a luce UVA è rappresentato dal rischio di mutagenicità legato sia alla formazione di addotti all'acido nucleico, che alla tossicità della stessa radiazione utilizzata. Altro svantaggio legato all'utilizzo della luce UVA per fotoattivare tali molecole è dato dalla scarsa penetrazione a livello tissutale di tale radiazione. È noto invece che, contrariamente ad UVA, BL possiede un profilo di tossicità intrinseca minore e presenta una maggiore penetrazione nei tessuti. 8-MOP e TMA si dimostrano in grado di assorbire nel campo della luce visibile, anche se con coefficienti di estinzione molto bassi. Sulla base di questi presupposti, in questa tesi si è verificato se le due molecole, in associazione con BL, potessero inibire la crescita di cellule di carcinoma prostatico e vescicale, fornendo una prima indicazione su un loro possibile utilizzo nella fototerapia locale di tali tipologie di tumore. A tal fine, come modello *in vitro*, sono state utilizzate le linee cellulari DU145, derivata da adenocarcinoma prostatico umano, e T24 da carcinoma dell'epitelio di transizione. In particolare, l'attività di ricerca si è sviluppata nel modo seguente:

- valutazione delle lesioni indotte al DNA;
- identificazione delle condizioni (dose di irradiazione Vis o UVA e concentrazione delle sostanze) in grado di inibire completamente la formazione di sferoidi cellulari o di indurre un'inibizione pari al 50% della proliferazione in colture in monostrato;
- valutazione del meccanismo di morte cellulare indotto da 8-MOP e TMA;
- studio del meccanismo d'azione di TMA/BL alla base degli effetti biologici: valutazione tramite immunofluorescenza, RT-PCR e/o Western blot dell'espressione di molecole coinvolte nella via Wnt canonica (β -catenina, GSK3 β), di alcune protein chinasi attivate dai mitogeni (MAPK) e di CD44;
- studio del profilo di genotossicità tramite analisi western blot dello stato di fosforilazione dell'istone H2AX.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Sostanze

8-MOP (PM 216.2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA) e TMA (PM 228.247, sintetizzata nel Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova, nel laboratorio della Prof.ssa Adriana Chilin) sono state sciolte in etanolo assoluto alla concentrazione 10 mM (soluzione madre). Le molecole sono state ulteriormente diluite in etanolo alle concentrazioni 1 mM, 100, 10 e 1 μ M e poi somministrate alle cellule nel terreno di coltura raggiungendo una concentrazione massima di etanolo pari al 2%. La concentrazione delle sostanze è stata verificata tramite spettrofotometria utilizzando lo spettrofotometro Varian Cary 50 (Palo Alto, CA). Alle lunghezze d'onda di utilizzo le sostanze in esame presentavano i valori di assorbività molare (ϵ) riportati nella tabella seguente.

Sostanza	λ (nm)	ϵ
8-MOP	365	978
	420	50
TMA	365	280
	420	89

Le irradiazioni sono state eseguite utilizzando la lampada Philips HPW 125 e l'apparato Waldmann UV236, che emettono, rispettivamente, principalmente a 365 nm e a 420 nm.

3.2 Isolamento dei fotoaddotti

Le soluzioni in etanolo di 8-MOP e TMA 10 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, US) sono state aggiunte goccia a goccia a DNA di salmon testes 10 mg/mL (Sigma-Aldrich) in 5 mL di NaCl 10 mM ed EDTA 1 mM (1.5×10^{-3} M) fino al raggiungimento di un rapporto DNA/sostanza di circa 40. Questa miscela è stata irradiata con 15 J/cm² di BL o luce UVA in dischetti di vetro. Al termine dell'irradiazione, il DNA è stato precipitato con 1 M NaCl ed etanolo freddo. Il DNA precipitato è poi stato raccolto, lavato con etanolo all'80%, disidratato ed in seguito disciolto in acqua. Le soluzioni finali sono state idrolizzate con 0.5 M HCl, riscaldate a 100°C per 1 h, neutralizzate con NaOH ed estratte per 3 volte con cloroformio (Sigma-Aldrich). In seguito è stata recuperata la fase organica, portata a secco e dissolta in etanolo (Sigma-Aldrich). Le

miscele idrolizzate sono state infine separate tramite cromatografia su strato sottile (TLC; F254 plates, 0.25 mm, Merck) eluite con etile acetato/etanolo (9:1).

3.3 Relaxation assay

Ogni campione di DNA pBR322 (160 ng) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) è stato dissolto in 10 μ L di tampone TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) e poi irradiato con dosi crescenti di BL e luce UVA (0, 2.0, 5.0, 7.5, 12.0, 15.0 J/cm²) in presenza di 300 μ M 8-MOP o TMA. Ai campioni è stato poi aggiunto 1 μ L di loading buffer (0.25% blu di bromofenolo, PBS, 0.25% xilene cianolo, 40% p/v, saccarosio) e in seguito sono stati caricati su gel di agarosio all'1% precolorato con Gel Red (0.1 μ L/mL) (Biotium, Hayward, California, USA). La corsa elettroforetica è stata effettuata in tampone TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 25 V per 6 h. Il gel è stato poi lavato con acqua e le bande di DNA visualizzate sotto radiazione UV Gel Doc 2000 Gel Documentation System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La frazione di DNA non danneggiato (supercoiled, SC) e DNA danneggiato (open circular, OC) è stata calcolata utilizzando ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad). Campioni di solo DNA al buio e dopo irradiazione sono stati usati come controllo.

3.4 Fotoossidazione

Ogni campione di DNA pBR322 (200 ng) dissolto in tampone fosfato (10 mM, pH 7.2) è stato irradiato con BL e luce UVA (0, 2.0, 7.5 J/cm²) in presenza di 300 μ M 8-MOP o TMA. Dopo irradiazione, il DNA è stato precipitato con etanolo/sodio acetato e dissolto nel tampone di reazione (10 mM Bis Tris propano-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DDT, pH 7.0) (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Ogni campione è stato incubato per 30 min a 37° C con l'enzima Endo III (New England BioLabs). Ai campioni è stato poi aggiunto il loading buffer (3 μ L, 0.25% BPB, 0.25% xilene cianolo, 30% glicerolo in acqua) ed in seguito caricato su gel di agarosio all'1%. La corsa è stata effettuata in tampone TAE a 80 V per 2 h. Campioni di solo DNA al buio e dopo irradiazione sono stati usati come controllo.

3.5 Cross-linking assay

Il DNA (160 ng per campione) disciolto in tampone TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) è stato linearizzato utilizzando l'enzima di restrizione EcoRI (New England BioLabs). Il DNA è stato successivamente precipitato ed irradiato con dosi crescenti di BL e luce UVA (0, 2.0, 5.0, 7.5, 12.0, 15.0 J/cm²) in presenza di 300 μ M di 8-MOP o TMA. Metà dei campioni sono stati denaturati con NaOH (0.2 M concentrazione

finale), in seguito posti in bagnetto termostato a 100° C per 10 min ed immediatamente posti in ghiaccio. I campioni non denaturati, trattati ed irradiati con BL e luce UVA, pBR322 linearizzato non trattato ed irradiato con BL e luce UVA ed il pBR322 tenuto al buio sono stati utilizzati come controllo. I campioni sono stati poi caricati su gel di agarosio all'1% e fatti correre come precedentemente descritto.

3.6 Colture cellulari

La linea cellulare di carcinoma prostatico DU145 (Eppelheim, GER) e la linea di carcinoma vescicale T24 (ATCC, Manassas, USA) sono state coltivate in monostrato con terreno proliferativo composto da Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS, Sigma-Aldrich), 1% L-glutamina, 0.1mM aminoacidi non essenziali, 1% soluzione antibiotica ed antimicotica e, rispettivamente, in presenza e in assenza di 0.1 mM piruvato di sodio e (Sigma-Aldrich) a 37 °C in atmosfera umidificata e al 5% di CO₂.

3.7 Trattamenti

- **DU145:** Le cellule sono state seminate in terreno di proliferazione a una densità pari a 10⁵ cellule per pozzetto in piastre a 24 pozzetti (Sarstedt, Nümbrecht, Germania). Dopo 24 h, il terreno è stato rimosso e sostituito con MEM w/o rosso fenolo (Sigma-Aldrich), quindi le cellule sono state irradiate con varie dosi di BL o UVA (da 2 a 7.5 J/cm²). Immediatamente dopo irradiazione, il terreno contenente la sostanza è stato rimosso e sostituito con terreno proliferativo. In alternativa, le colture sono state incubate per 1 h al buio con MEM w/o rosso fenolo contenente diverse concentrazioni di TMA e 8-MOP e successivamente irradiate con 2 J/cm² di BL o UVA.
- **T24:** Le cellule sono state seminate in terreno di proliferazione a una densità pari a 5x10⁴ cellule per piastra Petri da 35 mm (P35, Sarstedt). Dopo 24 h, il terreno è stato rimosso, e sostituito con MEM w/o rosso fenolo (Sigma-Aldrich); successivamente, le cellule sono state trattate con varie concentrazioni di TMA (da 1 a 10 µM) e mantenute per 1 h, al buio, in incubatore. I campioni sono stati poi irradiati con 2 J/cm² di BL e successivamente riposti in incubatore. Immediatamente dopo irradiazione, il terreno contenente la sostanza è stato rimosso e sostituito con terreno proliferativo. Alternativamente, il terreno è stato addizionato di LiCl (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 1 mM e mantenuto in esso fino alla successiva analisi. Le colture non trattate sono state considerate come controlli.

3.8 Saggio di formazione delle sfere

La formazione *in vitro* di strutture sferoidali è dovuta alla presenza di cellule staminali tumorali (CST) e, per tal motivo, rappresenta un utile modello cellulare per verificare l'efficacia di trattamenti progettati per eradicare la componente staminale del tumore. Le prime sfere da CST in sospensione (denominate tumorosfere) sono state ottenute da tumori cerebrali (Singh et al., 2003) e, successivamente, da una vasta gamma di tumori solidi, quali carcinoma mammario, tumore al polmone (Eramo et al., 2008), al colon (Ricci-Vitiani et al., 2007), alla prostata (Collins et al., 2005), e al pancreas (Li et al., 2007).

Subito dopo irradiazione, le cellule sono state tripsinizzate e contate con camera di Burker. Ne sono state seminate 5×10^3 per ciascun pozzetto di piastra a 24 pozzetti (Sarstedt), utilizzando un terreno privo di siero, composto da DMEM/F-12 (3:1, v/v) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplementato con 0.4 % BSA (Sigma- Aldrich), 0.4% B27 (Gibco), 1% L-glutamina, 1% antibiotici. Dopo 13 giorni dalla semina, ogni pozzetto è stato osservato al microscopio a contrasto di fase Nikon T-s e fotografato utilizzando l'obiettivo 40x. La determinazione del numero delle sfere e dei rispettivi diametri è stata effettuata utilizzando il programma ImageJ.

3.9 Immunofluorescenza

3.9.1 CD44

Le colture in monostrato, sono state lavate con PBS 1X, staccate con EDTA-Tripsina, centrifugate per 3 min a 1500 rpm, risospese in PBS 1X e contate. Le cellule sono state trasferite su vetrino tramite Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific) a 800 rpm per 3 min. Per ogni spot su vetrino sono state seminate 3×10^4 cellule; quindi sono state preparate due aliquote da 1 mL contenenti 6×10^4 cellule in totale. I campioni sono stati fissati con formalina (Sigma-Aldrich) al 10% in PBS 1X per 15 min a 4°C. Dopo 3 lavaggi con PBS 1X, l'inattivazione dei siti aspecifici è stata effettuata tramite incubazione per 1 h a temperatura ambiente (TA) con 3% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS 1X. Dopo un ulteriore lavaggio con PBS 1X, è stato successivamente aggiunto l'anticorpo primario non coniugato monoclonale mouse anti-CD44 (AbD Serotec, Kidlington, UK), diluito 1:100 in PBS 1X, ed è stato lasciato in incubazione overnight a 4°C in camera umida. L'aggiunta dell'anticorpo secondario goat anti-mouse Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific), diluito 1:200 in soluzione 1.5% BSA in PBS 1X è stata effettuata dopo tre lavaggi con PBS 1X; il campione è stato lasciato incubare per 30

min al buio a temperatura ambiente. Il vetrino è stato montato con DAPI (Vector Laboratories, Peterborough, UK), che evidenzia in blu il nucleo delle cellule.

3.9.2 β -Catenina

Come precedentemente descritto, le cellule citospinate sul vetrino sono state fissate con formalina (Sigma-Aldrich) al 10% in PBS 1X per 20 min a TA e, successivamente, lavate per tre volte con PBS 1X contenente 0.1% di Triton X-100 (Sigma-Aldrich) per 5 min. In seguito, la permeabilizzazione è stata effettuata mantenendo i campioni in una soluzione di Triton X-100 allo 0.5% per 15 min a TA. Dopo ulteriori lavaggi effettuati con PBS 1X addizionato con 0.1% di Triton X-100, è stata effettuata la disattivazione dei siti aspecifici con BSA al 10% per 1 h. La marcatura è stata eseguita con l'anticorpo primario non coniugato monoclonale mouse anti- β -catenina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas USA) diluito 1:200 in BSA 1% overnight a 4 °C in camera umida. In seguito, i campioni sono stati trattati con anticorpo secondario goat anti-mouse Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific), diluito 1:200 in soluzione 1.5% BSA in PBS 1X per 30 min a TA. I vetrini sono stati colorati per 5 min con ioduro di propidio (50 μ g/mL, Sigma-Aldrich), che evidenzia i nuclei in rosso, e montati con FLUORO-GEL (with tris buffer) (Thermo Fisher Scientific) nel caso delle cellule T24 o montati con DAPI nel caso delle cellule DU145.

3.9.3 Prostatifere

È stato utilizzato il protocollo di Weiswald (2004). Le sfere ottenute da cellule DU145 sono state prelevate, centrifugate, lavate con PBS 1X, ed infine citospinate su vetrino per 3 min a 500 rpm. In seguito, sono state fissate e permeabilizzate, per 3 h a 4 °C, con una soluzione di formalina al 4% e Triton X100 all'1% (Sigma- Aldrich). Sono stati eseguiti 3 lavaggi di 10 min ciascuno con PBS 1X. Per il processo di disidratazione, si è proseguito con lavaggi di 15 min a 4 °C con concentrazioni crescenti di metanolo in PBS 1X (25-50-75-95%); infine, i vetrini sono stati immersi in metanolo assoluto per 30 min a 4 °C. Successivamente, è stata effettuata la reidratazione degli stessi campioni, con metanolo in concentrazioni decrescenti (95-75-50-25%), seguita da 3 lavaggi di 3 min con PBS 1X.

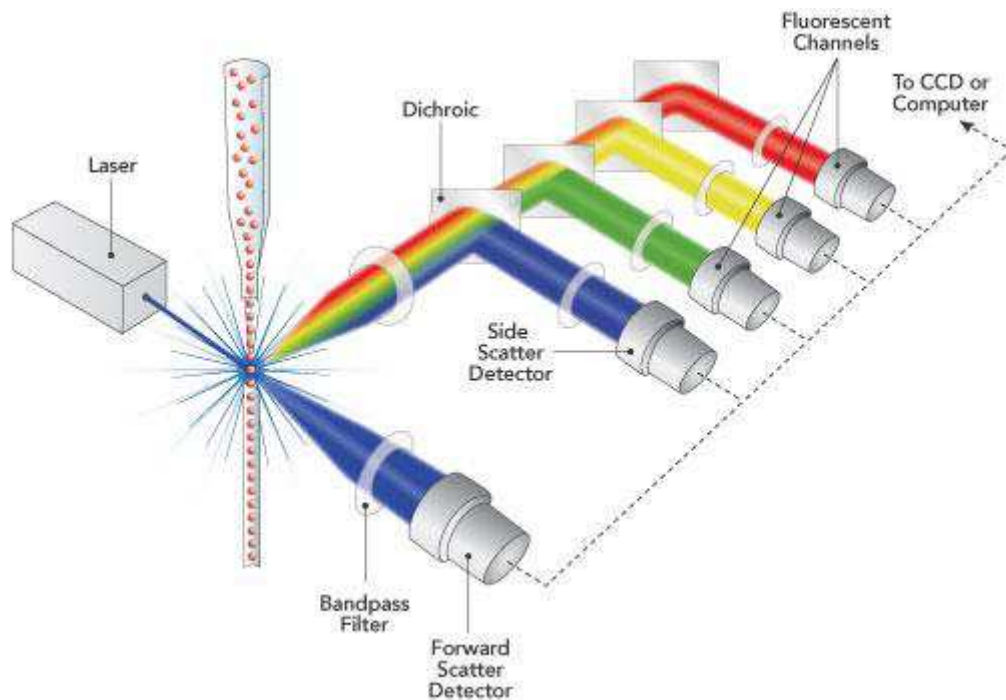
La disattivazione dei siti aspecifici è stata effettuata con 3% BSA e 0.1% Triton in PBS 1X per 1 h a TA, seguita da un lavaggio per 5 min con 0.1% Triton in PBS 1X. È stato utilizzato l'anticorpo primario non coniugato monoclonale mouse anti-CD44 (AbD Serotec), diluito 1:100 in PBS 1X e 0.1% Triton, ed è stato lasciato in incubazione overnight a 4 °C in camera umida. Il giorno seguente, dopo 3 lavaggi con PBS 1X per 10 min, è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti-mouse Alexa 488 (Thermo Fisher

Scientific), diluito 1:200 in 1.5% BSA in PBS 1X, ed è stato incubato per 30 min al buio, a TA. È stato eliminato l'eccesso di anticorpo con gli ultimi 3 lavaggi con PBS 1X e, infine, è stato effettuato il montaggio con DAPI.

Come controlli negativi, sia per le cellule in monostrato che per le sfere, alcuni campioni sono stati trattati con il solo anticorpo secondario, omettendo quello primario. L'osservazione è stata effettuata al microscopio confocale (Zeiss LSM800).

3.10 Citofluorimetria

La Citometria a flusso o Citofluorimetria (CFM) è una tecnica che consente la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido, in modo rapido e dettagliato, sia a livello quantitativo che qualitativo. Le informazioni che si possono ottenere da questo tipo di analisi riguardano parametri biochimici caratteristici della cellula che possono essere analizzati indirettamente per mezzo di marcatori molecolari fluorescenti. Tramite CFM si possono valutare le dimensioni cellulari, la granularità superficiale, il contenuto di acidi nucleici (DNA, RNA), l'organizzazione del citoscheletro, il potenziale di membrana, i recettori di superficie ed intracellulari, le attività enzimatiche o lo stato di fosforilazione delle proteine. La tecnica prevede la preparazione del campione nella forma di una sospensione cellulare monodispersa, che viene poi marcato con marcatori fluorescenti specifici; trascorso il tempo di incubazione, il campione viene caricato in un sistema fluidico di trasporto o *sheath fluid*, ed eccitato nella camera di flusso mediante un fascio di luce laser. Il sistema fluidico controlla la captazione ed il flusso cellulare; qui le cellule in sospensione vengono iniettate in singola fila nella camera di flusso. Nel sistema ottico le cellule attraversano singolarmente un fascio di luce polarizzata, che viene riflessa e genera così dei segnali, che verranno raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici, filtrati, amplificati ed inviati a specifici sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. Nel sistema elettronico vengono raccolti ed analizzati i dati, grazie ad un software che converte i segnali in valori digitali, e inviati al computer in modo da poter ottenere una rappresentazione grafica e statistica dei parametri in analisi. Dopo trattamento (vedi punto 3.7), il terreno è stato rimosso, sostituito con terreno di proliferazione e le colture sono state mantenute in incubatore per 24 o 48 h. Successivamente, sono stati determinati l'espressione di CD44 e il tasso di apoptosi, come di seguito descritto.



Rappresentazione schematica di un'analisi citofluorimetrica

3.10.1 Valutazione dell'espressione di CD44

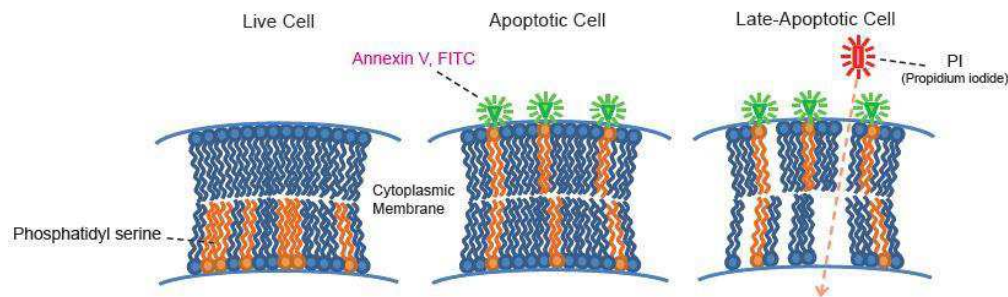
Le colture sono state lavate con PBS 1X e tripsinizzate; le sospensioni cellulari sono state centrifugate per 3 min a 1500 rpm e risospese in 0.5% BSA in PBS 1X. Dopo centrifugazione, la BSA è stata rimossa ed è stata effettuata la marcatura indiretta dei campioni con 2 μ L di anticorpo primario non coniugato monoclonale mouse anti-CD44 (AbD Serotec) incubando per 15 min al buio a TA. L'anticorpo primario è stato poi disattivato con la soluzione di BSA e i campioni sono stati nuovamente centrifugati. È stato aggiunto 1 μ L di anticorpo secondario coniugato Alexa 488 (Santa Cruz) e, dopo 15 min di incubazione al buio, è stato effettuato un ultimo lavaggio con BSA. I campioni sono stati centrifugati e il surnatante è stato allontanato; i campioni sono stati mantenuti in opportuno tampone e posti in ghiaccio fino al momento dell'analisi effettuata con citofluorimetro FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). Come controlli negativi, alcuni campioni sono stati trattati con il solo anticorpo secondario, omettendo quello primario.

3.10.2 Determinazione dell'apoptosi

In seguito a trattamento ed irradiazione, le colture sono state lavate con PBS 1X, tripsinizzate, le cellule contate e le sospensioni cellulari sono state centrifugate per 3 min a 1500 rpm, risospese in PBS 1X, centrifugate nuovamente e risospese in 100 μ L di Buffer. I campioni sono stati infine trattati con 5 μ L di FITC-annessina V e 5 μ L

di ioduro di propidio (Biosciences BD, Franklin Lakes, NJ, USA), incubati al buio per 15 min a TA e analizzati al citofluorimetro.

Questo tipo di analisi è stata effettuata per valutare il tipo di morte che TMA e 8-MOP possono indurre nelle colture cellulari. Lo ioduro di propidio (PI) è un colorante sintetico caratterizzato da una bassa fluorescenza in grado di legarsi selettivamente agli acidi nucleici. Perché il PI possa entrare nella cellula, è necessaria la rottura della membrana plasmatica, processo che avviene nella cellula in necrosi. L'Annexina, invece, in virtù delle sue caratteristiche strutturali, è in grado di legare i fosfolipidi di membrana, in particolare presenta una forte affinità con la fosfatidilserina che, durante l'apoptosi, passa dallo strato citosolico a quello non citosolico della membrana plasmatica (Riccardi e Nicoletti, 2006). Le cellule vive, quindi, non sono fluorescenti, quelle necrotiche sono caratterizzate da una fluorescenza rossa, quelle apoptotiche da una fluorescenza verde. Nella tarda fase dell'apoptosi si osserva invece una doppia fluorescenza, dovuta a fenomeni di necrosi secondaria.



Rappresentazione schematica dell'effetto di Annessina e PI su cellule apoptotiche e necrotiche

3.11 Produzione di specie reattive dell'ossigeno

Per questo tipo di saggio, sono state seminate, in ciascun pozzetto di una piastra nera a 96 pozzetti con fondo trasparente (Corning, New York, USA), 2.5×10^4 cellule DU145 in 100 μ L di terreno proliferativo. Il test è stato eseguito utilizzando il kit Abcam (Cambridge, UK), seguendo le indicazioni della casa produttrice.

Questo saggio si basa sull'utilizzo della 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFDA), un composto che, dopo la diffusione nella cellula, viene deacetilato da esterasi cellulari ad un composto non fluorescente, successivamente ossidato dai ROS a 2',7'-diclorofluoresceina (DCF). La DCF è un composto altamente fluorescente che può essere rilevato allo spettrofluorimetro con un massimo di eccitazione a 495 nm e di emissione a 529 nm.

Dopo 24 h le cellule sono state lavate con PBS 1X ed incubate con 20 μ M DCFDA in Buffer 1X per 45 min. Dopo aver ripetuto il lavaggio con PBS 1X, alcuni pozzetti

(controlli positivi) sono stati trattati con 100 μM e 200 μM t-butil perossido di idrogeno (TBHP) per 3 h come controllo positivo per la formazione di ROS, mentre gli altri sono stati trattati con varie concentrazioni di TMA e 8-MOP per 1 h. Dopo aver irradiato la piastra con 2 J/cm^2 di BL o UVA, si sono raccolti i dati relativi all'emissione di ciascun pozzetto utilizzando un lettore per micropiastre (Es/Em = 485/535) (Viktor, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti).

3.12 Estrazione delle proteine

L'estrazione delle proteine nucleari e citoplasmatiche è stata effettuata usando il kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific), seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Dopo 24 e 48 h dal trattamento, le cellule in adesione sono state tripsinizzate e lavate con PBS 1X. Al pellet cellulare sono stati aggiunti 100 μL di CER I e 10 μL di inibitori di proteasi e fosfatasi (Thermo Fisher Scientific). I campioni sono stati in seguito vortexati e incubati in ghiaccio per 10 min. Dopo l'aggiunta di 5.5 μL di CER II, i campioni sono stati centrifugati per 5 min a 16000 g per separare il surnatante contenente le proteine citoplasmatiche dal pellet contenente quelle nucleari. Al rimanente pellet sono stati aggiunti 50 μL di NER e 5 μL di inibitori di proteasi e fosfatasi. In seguito, i campioni sono stati alternativamente vortexati e incubati per 10 min per un totale di 40 min. Successivamente, sono stati centrifugati per 10 min a 16000 g per separare il pellet, contenente solo le membrane cellulari, dal surnatante in cui erano presenti le proteine nucleari. Tutti i campioni sono stati conservati in ghiaccio fino alla successiva quantificazione delle proteine.

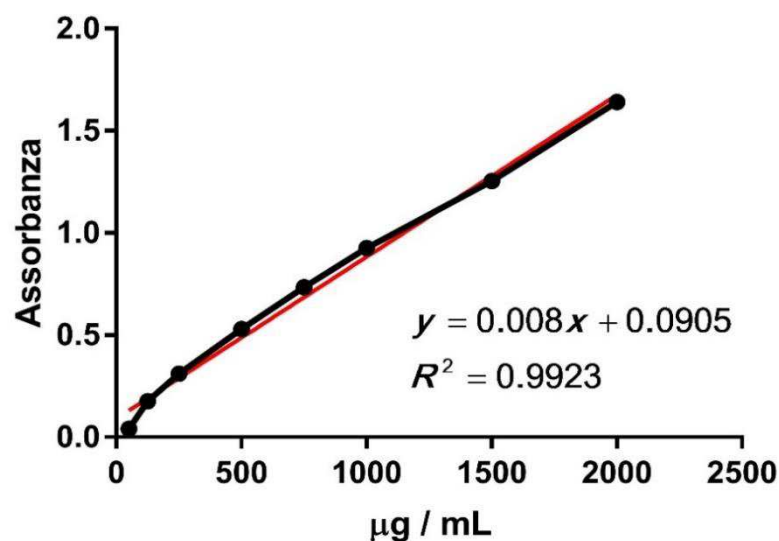
3.13 Estrazione degli istoni

Per l'estrazione degli istoni è stato utilizzato il kit Histone Extraction Kit - Rapid/Ultra-pure (Abcam) seguendo le istruzioni della casa produttrice. Dopo 4 h dall'irradiazione le cellule sono state raccolte, lavate e pellettizzate; il pellet è stato poi risospeso in 200 μL di Pre-Extraction Buffer addizionato di inibitori di proteasi e ditiotreitolo (DTT) ed incubato in ghiaccio per 10 min. La sospensione così ottenuta è stata poi centrifugata per 2 min a 1000 g a 4 °C. In seguito il surnatante è stato allontanato e il pellet nuovamente risospeso in 200 μL di Pre-Extraction buffer + Pre-Extraction supplement addizionato di inibitori di proteasi e DTT. Dopo incubazione di 10 min in ghiaccio la sospensione è stata centrifugata per 2 min a 10000 g a 4 °C. Il pellet così ottenuto è stato poi addizionato di 200 μL di Extraction buffer contenente il cocktail di inibitori di proteasi e il DTT. Dopo incubazione per 30 min in ghiaccio i campioni sono

stati centrifugati per 2 min a 10000 g a 4 °C. Il surnatante contenente gli istoni è stato in seguito trasferito in una nuova eppendorf e addizionato di 20 µL di Neutralization buffer. I campioni così ottenuti sono stati analizzati tramite SDS-PAGE come specificato al punto 3.15. Il controllo positivo di fotogenotossicità è stato ottenuto trattando le cellule DU145 con 8-MOP alla concentrazione di 0.1 µM e irradiandole con 5 J/cm² di luce UVA (Toyooka et al., 2011).

3.14 Quantificazione delle proteine

La quantificazione delle proteine in ogni campione è stata eseguita utilizzando il BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology). Il kit dispone di una formulazione a base di acido bicinconinico (BCA) per la rilevazione colorimetrica e la quantificazione delle proteine totali. Con questo metodo si ha la riduzione del rame (da Cu²⁺ a Cu¹⁺) ad opera delle proteine, in ambiente alcalino (reazione biureto); in particolare, due molecole di BCA complessano uno ione rameoso. Il complesso risultante è molto solubile e presenta una forte assorbanza a 562 nm, che è proporzionale alla concentrazione proteica. Le soluzioni A (Na₂CO₃, NaHCO₃, Tartrato di Sodio, Acido Bicinconinico in 0.1 M di NaOH) e B (4% Cu₂SO₄) sono state miscelate in proporzione 50:1, rispettivamente. Il rilevamento colorimetrico è altamente sensibile e selettivo e dipende anche dalla struttura delle proteine, dal numero di legami peptidici e in particolare dalla presenza di cisteina, triptofano e tirosina. Le concentrazioni proteiche sono generalmente determinate e indicate in riferimento ad uno standard comune come l'albumina sierica bovina (BSA), grazie alla quale è stato possibile ottenere la seguente retta di taratura.



Retta di taratura con BSA

Per quanto riguarda la quantificazione proteica nei campioni preparati, 25 μ L di ogni standard sono stati aggiunti a 200 μ L di reagente in ogni pozzetto di piastre low adhesion a 96 pozzetti (Sarstedt). I dati relativi all'assorbimento di ciascun pozzetto sono stati ottenuti utilizzando un lettore per micropiastre a 570 nm (Viktor, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti).

3.15 Western Blot

Il western blot, o immunoblot, è una tecnica che prevede la separazione di proteine native o denaturate mediante elettroforesi su gel, in base al loro peso molecolare. Oltre ad essere uno strumento analitico essenziale per identificare la proteina di interesse in una miscela complessa, i dati che si possono ottenere da questa analisi possono essere utilizzati per determinare e confrontare in modo semi-quantitativo l'espressione di proteine specifiche in cellule e tessuti (Ghosh et al., 2014).

Operativamente, le proteine sono state caricate su gel di poliacrilammide. La percentuale di gel è stata stabilita in base al peso molecolare delle proteine da separare, considerando quindi la grandezza delle maglie del gel (*mesh*) attraverso le quali avviene la corsa delle proteine. Per le proteine citoplasmatiche e nucleari sono stati usati gel al 10% di acrilamide mentre nel caso degli istoni al 18%. I gel erano così composti:

- **Running Gel al 10%** composto da 33% di acrilamide al 30%, 25% tris 1.5 M HCl pH 8.8, 1% SDS 10%, in acqua milliQ
- **Running Gel al 18%** composto da 60% di acrilamide al 30%, 25% tris 1.5 M HCl pH 8.8, 1% SDS 10%, in acqua milliQ
- **Stacking gel** composto da 13% di Acrilamide al 30%, 25% 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS 10%, in acqua milliQ.

Per garantire la polimerizzazione del gel, è stata aggiunto 0.5% di ammonio persolfato (APS) al 10% e 0.01% di TEMED. Le condizioni riducenti sono state ottenute grazie all'aggiunta di 4% β -mercaptoetanololo nei campioni, al momento della preparazione. Per ogni pozzetto sono stati caricati 40 μ g di proteine per ogni tipologia di campione. È stato aggiunto il Loading Buffer 1X, diluito dal Loading Buffer 6X preparato con 15% SDS, 0.075% blu di bromofenolo, in 4.7 mL di glicerolo, 1.2 mL 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (Sigma-Aldrich) e 2.1 mL di acqua milliQ. Una volta caricati 5 μ L di marker (Precision Plus Protein WesternC, Bio-Rad), è stata avviata la corsa elettroforetica a 120V, 12mA per 1 h circa.

Per il trasferimento sulla membrana, il Transfer Buffer 1X, composto da 0.3 % tris-base, 14.4% glicina, 10% metanolo (Sigma-Aldrich), in acqua milliQ, è stato posto nell'apparato di trasferimento, dove è stata inserita la membrana, precedentemente attivata con metanolo (Sigma-Aldrich) per 15 sec. È stata poi ottenuta una struttura a *sandwich*, dove gel e membrana erano interposti tra una spugna e carta bagnata.

In seguito, per visualizzare le proteine, la membrana è stata lavata con PBS Tween, tagliata, e lasciata in agitatore per 90 min in apposite vaschette di plastica immersa nella soluzione di Blocking (5% di BSA in TBS 1X).

Come proteina house-keeping per gli estratti citoplasmatici è stata utilizzata la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), rivelata con anticorpo primario monoclonale rabbit (Cell Signaling, Danvers MA, USA); per le proteine nucleari è stata utilizzata la lamina B1, come normalizzatore, rilevata tramite anticorpo primario monoclonale mouse (Santa Cruz, Dallas, TX, USA). Gli istoni sono stati, invece, normalizzati verso l'istone H4, preso come riferimento, marcato tramite anticorpo primario policlonale rabbit (Millipore, Burlington, MA, USA). Per rilevare le proteine β -catenina e p- β -catenina (Ser 33/Ser 37) sono stati usati anticorpi primari monoclonali mouse (Santa Cruz); per le proteine p-P44/42 (Thr202/Tyr204), p-P38 (Thr180/Tyr182), istone p-H2AX (Ser139) (Cell Signaling), p-GSK3 β (Tyr 216) un anticorpo policlonale rabbit (abcam, Cambridge, UK). Gli anticorpi primari per le proteine house-keeping sono stati utilizzati ad una diluizione 1:1000, mentre gli altri 1:500 in BSA al 2.5% in TBS 1X. Gli anticorpi secondari, coniugati HRP goat anti-rabbit (Bio-Rad) e donkey anti-mouse (abcam), erano diluiti 1:2000 in BSA al 2.5% in TBS 1X.

Dopo aver lasciato incubare gli anticorpi, e dopo averne eliminato gli eccessi con diversi lavaggi con PBS-Tween, è stato effettuato lo sviluppo e la rilevazione dei campioni, trattando le membrane per 5 min con 5 mL di ECL (Bio-Rad) al riparo dalla luce. Per la rivelazione delle proteine fosforilate è stato usato un ECLextend (Euroclone, Milano). L'immunoreattività è stata visualizzata tramite il sistema di analisi di immagine VersaDoc (Bio-Rad). I livelli di espressione delle proteine sono stati normalizzati a quelli di GAPDH, lamina B1 o istone H4 e quantificati utilizzando il software ImageJ.

3.16 Analisi di espressione mediante RT-PCR

La reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica che consente di ricostruire *in vitro* uno specifico passaggio della duplicazione cellulare: la ricostruzione (*sintesi*) di un segmento di DNA a doppia elica a partire da un filamento a singola elica. Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato.

3.16.1 Estrazione di mRNA totale dalle cellule

L'estrazione di mRNA è stata effettuata tramite Trizol® Reagent (Sigma-Aldrich), una soluzione monobasica di fenolo e guanidina isotiocianato. Dopo 3 h dal trattamento, le cellule sono state tripsinizzate, centrifugate e lavate con PBS 1X. I pellet sono stati incubati in 1 mL di Trizol® Reagent per 5 min, a TA. In seguito all'aggiunta di una soluzione di cloroformio (0.2 mL) (Sigma-Aldrich), i campioni sono stati vortexati per 15 sec ed incubati per 3 min a TA. Dopo centrifugazione a 12000 g per 15 min a 4°C, la fase superiore acquosa, contenente l'RNA, è stata prelevata e trasferita in una eppendorf da 1.5 mL. Successivamente, è stata eseguita la precipitazione dell'acido nucleico RNA mediante l'aggiunta di 0.5 mL di soluzione di isopropanolo (Sigma-Aldrich) ed incubazione per 10 min a TA. I campioni sono stati poi centrifugati a 12000 g per 10 min a 4°C e i pellet lavati in 1 mL di soluzione di etanolo al 75% e nuovamente centrifugati a 7500 g per 5 min a 4°C. Dopo rimozione del surnatante ed evaporazione delle tracce di etanolo, i campioni di RNA sono stati risospesi nella soluzione acquosa DEPC (diethylpirocarbonato) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), contenente l'inibitore delle RNase cellulari. I campioni sono stati trasferiti in eppendorf da 0.2 mL RNase-free e conservati a -80°C.

3.16.2 Quantificazione spettrofotometrica di RNA

La quantificazione degli RNA estratti è stata effettuata con lo spettrofotometro NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific). Utilizzando 1 µL di ciascun campione, è stata determinata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm. In parallelo, l'identificazione dell'assorbanza a 280 e a 230 nm, corrispondenti, rispettivamente, alla lunghezza d'onda di assorbimento di proteine e carboidrati, ha consentito di valutare la purezza degli RNA. Per lo studio di espressione genica, sono stati impiegati solo i campioni per i quali il rapporto 260/280 è risultato superiore a 1.95.

3.16.3 Retrotrascrizione dell'mRNA

Consente di ottenere un filamento di DNA complementare al filamento di mRNA che funge da stampo. Tale filamento di DNA è il DNA copia (cDNA) dell'mRNA e non copia del gene. Nella miscela di reazione sono presenti tutti gli mRNA che sono stati prodotti dalle cellule e poi estratti. Per ottenere i cDNA solo degli mRNA d'interesse vengono aggiunti all'ambiente di reazione dei primer che sono brevi sequenze di nucleotidi ottenute per sintesi e disegnate in modo da essere complementari solo al mRNA di interesse. Nella tabella sottostante sono riportate le sequenze dei primers utilizzati.

Marcatore	Sigla	Sequenza (5'-3')	Sequenza di riferimento	pb
<i>β-Actina</i>	ACTB	F-TGACGTGGACATCCGCAAAG R-TGGAAGGTGGACAGCGAGG	NM_001101	205
<i>β-Catenina</i>	CTNNB1	F-CTTCACCTGACAGATCCAAGTC R-CCTTCCATCCCTTCTGTTTAG	NM_001904	98
<i>Ciclina D1</i>	CCND1	F- GCGGAGGAGAACAAACAGAT R- GAGGGCGGATTGGAAATGA	NM_053056.2	92
<i>C-myc</i>	MYC	F- CTCCACACATCAGCACAATA R- TGTCCAACCTGACCCTCTTG	NM_002467	80
<i>CD44v6</i>	CD44R2	F- TCCAGGCAACTCCTA R- CAGCTGTCCCTGTTG	NM_001202555.1	129

Coppie di primers utilizzate nello studio di RT-PCR F: Forward; R: Reverse.

I primer così costruiti si accoppiano selettivamente, secondo Watson e Crick, ai filamenti di mRNA complementari. L'ibrido mRNA-primer di DNA è l'innesco ideale per l'enzima virale Trascrittasi Inversa che da uno stampo di mRNA riesce a trascrivere un filamento copia di DNA.

3.16.4 Reazione di retrotrascrizione e PCR: reazione a catena della polimerasi

I campioni di RNA sono stati retrotrascritti e amplificati tramite OneStep RT-PCR Kit (QUIAGEN, Hilden, GE) seguendo il protocollo della ditta. Ogni tubo di reazione era composto da: 5 µL di Buffer 5X, 5 µL di Qsolution 5X, 1 µL di dNTPs mix, 1.5 µL di

primer Forward (10 μ M), 1.5 μ L di primer Reverse (10 μ M), 1 μ L di enzima, 1 μ L di RNA (80 ng/ μ L) e 9 μ L di Acqua. La reazione è stata eseguita utilizzando il termociclatore C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) alle condizioni indicate nella tabella sottostante.

Fasi	Tempo	Temperatura
Retrotrascrizione	30 min	50 °C
Attivazione DNA polimerasi	15 min	95 °C
Denaturazione DNA	1 min	94 °C
Annealing	1 min	57 °C
Estensione	1 min	72 °C
Numero di cicli: 39		
Estensione finale	10 min	72 °C

3.16.5 Elettroforesi su gel di agarosio

L'analisi elettroforetica dei prodotti di reazione PCR è stata eseguita su gel di agarosio (Sigma-Aldrich) preparato al 3% in soluzione tampone TBE 1X (0.04 mM tris-Borato, 0.001 M EDTA, pH 8) (Sigma-Aldrich) e Gel Red (0.1 μ L/mL) (Biotium). La soluzione è stata versata in una vaschetta per elettroforesi avente già fissati i pettini. Questi pettini formano nel gel dei pozzetti dove viene introdotto il campione da analizzare. L'EDTA del tampone serve ad impedire alle nucleasi eventualmente presenti di agire distruggendo il campione, perché chela gli ioni Mg²⁺ indispensabili al funzionamento delle nucleasi. L'agarosio ha la proprietà di formare spontaneamente reticoli 3D: maggiore è la concentrazione di agarosio, più piccole saranno le maglie del gel che si otterranno. Il gel di agarosio funge quindi da setaccio molecolare per separare gli acidi nucleici in base al loro raggio idrodinamico, che è direttamente proporzionale al PM: se non ci fosse il reticolo 3D, tutti i diversi frammenti di acido nucleico elettromigrerebbero allo stesso modo senza poter essere separati. Per ciascun campione, sono stati caricati su gel 8 μ L di prodotto di amplificazione e 2 μ L di soluzione colorante Gel Loading Buffer (Sigma-Aldrich). In parallelo, è stato caricato il PCR Marker (Thermo Fisher Scientific), un marcatore di riferimento di peso molecolare compreso tra 25 e 700 pb. La corsa elettroforetica è stata eseguita

applicando una differenza di potenziale al sistema di 80 Volt: il polianione elettromigrava nel gel di agarosio lungo le linee di campo elettrico dal polo negativo verso il polo positivo. Alla fine della corsa le bande dei prodotti di amplificazione sono state visualizzate tramite transilluminatore UV Gel Doc 2000 Gel Documentation System (Bio-Rad). L'analisi quantitativa delle bande è stata eseguita con il software ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad) e la normalizzazione dei marcatori di interesse è stata effettuata verso la β -actina.

3.17 Analisi statistica

I risultati, ottenuti da tre esperimenti indipendenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard e l'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con il t test di Student.

4. RISULTATI

4.1. Lesioni al DNA indotte da 8-MOP e TMA attivate da UVA e BL

La capacità delle furocumarine di fotolegarsi al DNA dopo attivazione con BL è stata verificata irradiando DNA isolato con le sostanze e confrontando i risultati con quelli ottenuti in seguito ad irradiazione con le stesse dosi di UVA.

Monoaddotti. La formazione di cicloaddotti con la timina (monoaddotti al lato furanico, MA), tramite il doppio legame 4',5' di TMA e di 8-MOP con il doppio legame 5,6 della timina, è stata verificata tramite idrolisi acida della miscela di irradiazione seguita da TLC e successiva caratterizzazione dei MA isolati tramite $[^3\text{H}]$ NMR (dati non mostrati). Il DNA impiegato per questo esperimento proveniva da testicoli di salmone e, dopo irradiazione, sia con UVA che con BL, in presenza di 8-MOP e TMA mostrava una fluorescenza di colore viola, come solitamente avviene quando le furocumarine si fotolegano alla macromolecola al livello del furano (Dall'Acqua et al., 1984). Le bande corrispondenti ottenute con le due irradiazioni e separate tramite TLC in seguito ad idrolisi acida a caldo ed estrazione con cloroformio, presentavano non solo lo stesso tipo di fluorescenza viola ma anche lo stesso fronte di corsa ($R_f=0.52$ per 8-MOP e per TMA). Inoltre, le sostanze possedevano la stessa capacità di fotoreversione quando irradiate con "mineral light" a 254 nm, dando origine a timina e 8-MOP o TMA di partenza (visualizzati attraverso una cromatografia bidimensionale), comportamento tipico del cicloaddotto al C₄ al furano tra le timine e le furocumarine (Kanne et al., 1984). Questa evidenza indica che 8-MOP e TMA erano in grado di formare cicloaddotti con le timine attraverso il doppio legame sul furano (4',5'-MA) anche quando attivate da BL. Tuttavia, la minor intensità di fluorescenza delle bande formatesi in seguito ad irradiazione con BL, rispetto a quella ottenuta con UVA, indica che la formazione di MA era meno efficiente con luce blu.

Legami crociati. I MA al lato furanico degli psoraleni, assorbendo un ulteriore fotone, sono in grado di formare legami crociati (XL) attraverso il fotolegame con un'altra pirimidina posta nel filamento complementare di DNA. La capacità di 8-MOP e TMA di formare XL, in seguito a fotoattivazione, è stata verificata tramite corsa elettroforetica denaturante in gel di agarosio alcalino di DNA plasmidico pBR322. Il trattamento del DNA a doppio filamento (ds-DNA) con una base forte (NaOH) rompe

i legami idrogeno tra i due filamenti, traducendosi nella denaturazione e nella separazione del DNA nei due singoli filamenti (ss-DNA). Il ds-DNA corre, all'interno di un gel di agarosio, più lentamente del ss-DNA e talvolta nel gel alcalino si possono facilmente identificare i due filamenti denaturati che corrono separati. Di conseguenza, il ds-DNA che è stato covalentemente cross-linkato attraverso la fotocicloaddizione delle sostanze non può essere denaturato e rimane in forma di doppio filamento. La denaturazione del DNA pBR322 fotosensibilizzato, precedentemente linearizzato tramite l'enzima di restrizione EcoRI e irradiato con entrambe le tipologie di luce in presenza di 8-MOP e TMA (Fig.1), ha dimostrato che 8-MOP formava un numero crescente di XL al crescere della dose di BL (Fig. 1B).

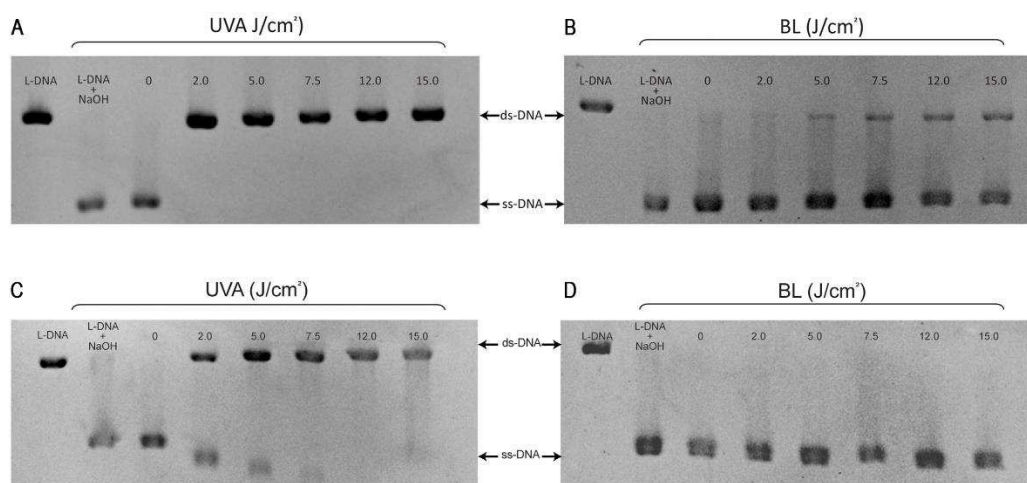


Figura 1. Fotosensibilizzazione di DNA pBR322 linearizzato con 8-MOP (A e B) e TMA (C e D) con dosi crescenti di luce UVA (A e C) e BL (B e D). Campioni di L-DNA denaturato o meno sono stati considerati come controlli. L-DNA: campione di DNA non denaturato; L-DNA+NaOH: DNA denaturato e irradiato; ds-DNA: DNA a doppio filamento; ss-DNA: DNA a singolo filamento.

Questo è dimostrato dalla presenza della banda più alta (ds-DNA) di intensità via via maggiore, corrispondente a DNA cross-linkato che non è stato denaturato. Questo DNA dovrebbe contenere sia MA che almeno un XL per molecola. Le percentuali di ss- e ds-DNA dei campioni irradiati con luce UVA e BL in presenza di 8-MOP e TMA rispetto ai controlli sono riportate in Tabella 1. È interessante notare che in tutti i campioni irradiati con luce UVA e trattati con 8-MOP (Fig. 1A) la sola banda presente era quella del ds-DNA a tutte le dosi di irradiazione usate, mentre con TMA alla dose minore era presente anche quella relativa a ss-DNA. Inoltre, osservando la posizione delle bande del ds-DNA si poteva notare che, all'aumentare della dose di luce, il ds-DNA cross-linkato si muoveva più lentamente a causa del crescente numero di monoaddotti e di XL formati. In seguito ad irradiazione con UVA (Fig. 1C), anche TMA era in grado di formare legami crociati a partire dalla dose minore di luce

utilizzata (2 J/cm²). La formazione di queste lesioni sembrava essere completa a 15 J/cm² di luce UVA con la scomparsa di ss-DNA.

Al contrario, TMA si comportava come un agente monofunzionale a tutte le dosi di BL (Fig. 1D). Questo è dimostrato dalla presenza esclusiva di ss-DNA presente come banda allargata senza alcuna traccia di DNA cross-legato. Inoltre, le due bande di ss-DNA nei campioni trattati sembravano correre più velocemente rispetto a quelle dei controlli all'aumentare della dose di luce. Con BL, 8-MOP manteneva la capacità di formare XL ma a livelli notevolmente inferiori rispetto a quanto rilevato con UVA.

A

Campioni	UVA		BL	
	% ds-DNA	% ss-DNA	% ds-DNA	% ss-DNA
L-DNA	100.0	n.d.	100.0	n.d.
L-DNA + NaOH	n.d.	100.0	n.d.	100.0
0 J/cm ²	n.d.	100.0	n.d.	100.0
2.0 J/cm ²	100.0	n.d.	4.4 ± 0.2*	95.6 ± 0.2*
5.0 J/cm ²	100.0	n.d.	9.9 ± 0.5*	90.1 ± 0.5*
7.5 J/cm ²	100.0	n.d.	15.3 ± 1.1*	84.7 ± 1.1*
12.0 J/cm ²	100.0	n.d.	24.4 ± 0.8*	75.6 ± 0.8*
15.0 J/cm ²	100.0	n.d.	28.0 ± 0.4*	72.0 ± 0.4*

B

Campioni	UVA		BL	
	% ds-DNA	% ss-DNA	% ds-DNA	% ss-DNA
L-DNA	100.0	n.d.	100.0	n.d.
L-DNA + NaOH	n.d.	100.0	n.d.	100.0
0 J/cm ²	n.d.	100.0	n.d.	100.0
2.0 J/cm ²	52.2 ± 2.3*	47.8 ± 2.3*	n.d.	100.0
5.0 J/cm ²	72.4 ± 1.5*	27.6 ± 1.5*	n.d.	100.0
7.5 J/cm ²	81.1 ± 3.5*	18.9 ± 3.5*	n.d.	100.0
12.0 J/cm ²	93.7 ± 2.7*	6.3 ± 2.7*	n.d.	100.0
15.0 J/cm ²	100.0	n.d.	n.d.	100.0

Tabella 1. Analisi densitometrica dei gel di agarosio di 8-MOP (A) e TMA (B) di figura 1. L'intensità delle bande è stata calcolata usando il software ImageLab. I campioni di L-DNA sono stati considerati come controlli. *p<0.05 vs L-DNA. L-DNA: campione di DNA non denaturato; L-DNA+NaOH: DNA denaturato e irradiato; ds-DNA: DNA a doppio filamento; ss-DNA: DNA a singolo filamento.

Questo comportamento può essere attribuito alla formazione di derivati furoidrossicinnamici (Kozma et al., 1991), che si formano dalle rotture dell'anello piranico nelle condizioni alcaline usate nell'esperimento. Pertanto, ulteriori due cariche negative presenti per ogni molecola di TMA legata al DNA (4',5'-MA) possono aumentare la migrazione dei filamenti separati di DNA verso l'elettrodo positivo. Queste cariche negative sicuramente presenti nel ds-DNA cross-legato da TMA, contenente anche MA, potrebbero essere nascoste all'interno della doppia elica rispetto al più esposto ss-DNA senza rallentare la migrazione. Una ipotetica struttura della molecola di TMA idrolizzata è rappresentata in figura 2.

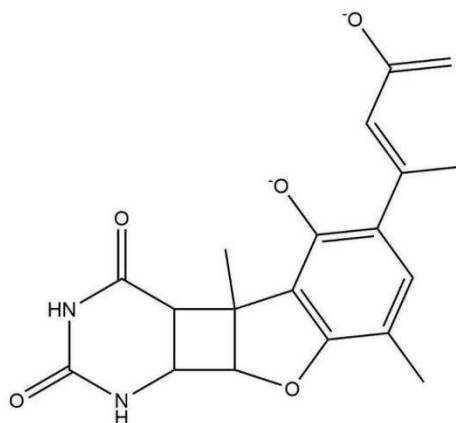


Figura 2. Ipotesi di struttura del monoaddotto TMA-timicina in seguito ad idrolisi alcalina dell'anello piranico, con conseguente formazione di un derivato furoidrossicinnamico con due cariche negative.

Tagli al DNA. I composti fotoattivi che legano il DNA spesso possono provocare tagli ad uno o ad entrambi i filamenti dell'acido nucleico e possono anche fotossidare le basi. Utilizzando il DNA isolato pBR322 superavvolto (SC), le sostanze che inducono rotture al singolo filamento portano al rilassamento della molecola di DNA, con passaggio dalla forma SC a quella svolta (OC). L'introduzione di tagli ad entrambi i filamenti, invece, si traduce nella formazione di DNA linearizzato (L) a doppio filamento. Queste strutture sono topologicamente differenti e presentano, quindi, una diversa migrazione elettroforetica all'interno di un gel di agarosio. In particolare, grazie alle sue ridotte dimensioni collegate ai ripetuti avvolgimenti, la forma SC migra più velocemente di quella OC; la forma L presenta una velocità di migrazione intermedia. Il "relaxation assay" (Fig. 3) ha evidenziato che 8-MOP, quando irradiato con luce UVA (Fig. 3A), cominciava ad indurre tagli al singolo filamento già alla dose di 2 J/cm². Il danno era poi maggiormente evidente a 5.0 J/cm² e aumentava all'aumentare della dose di luce UVA. A 12 e 15 J/cm², OC era la forma maggiormente presente insieme ad un incremento della "sbavatura" ed un più lento movimento della banda di SC, suggerendo la presenza di forme multiple di DNA differentemente modificato da un vario numero di fotoaddotti (Chen et al., 1994). Analoghi risultati sono stati ottenuti con TMA associata a luce UVA (Fig. 3C) con un rilassamento del DNA crescente all'aumentare della dose di luce. Le percentuali di SC e OC dei campioni irradiati con luce UVA e BL in presenza di 8-MOP e TMA rispetto ai controlli sono riportate in Tabella 2.

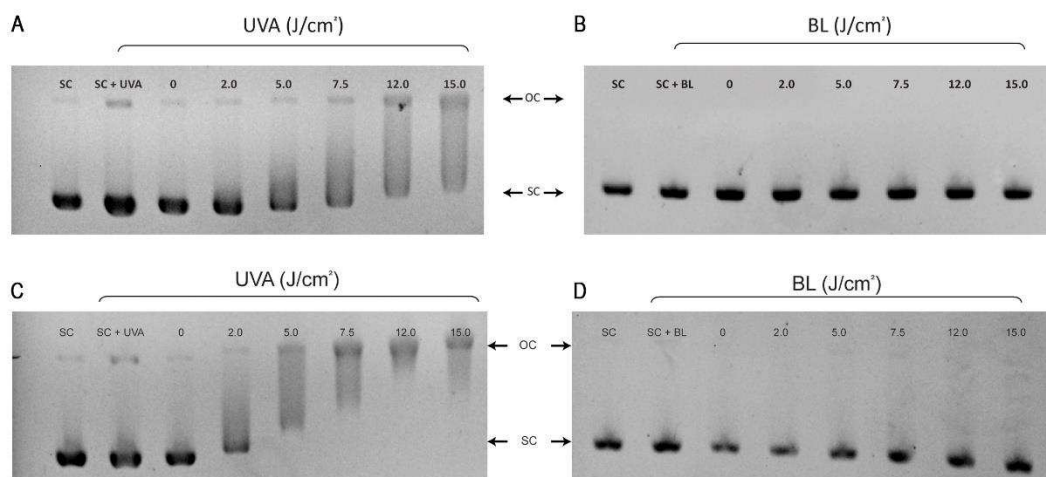


Figura 3. "Relaxation assay". Tagli al DNA pBR322 trattato con 8-MOP (A e B) e TMA (C e D) con dosi crescenti di luce UVA (A e C) e BL (B e D). I campioni SC di DNA non irradiato sono stati considerati come controlli. SC: forma superavvolta; OC: forma svolta.

Quando attivate con BL, sia 8-MOP che TMA (Fig. 3B e D) non hanno invece indotto alcun taglio rilevabile sul DNA plasmidico e solo la forma SC era presente in tutti i campioni. Inoltre, nessuna rottura al doppio filamento, che convertisse la forma SC in quella L, è stata indotta dalle sostanze in entrambe le condizioni di irradiazione. Quindi, come per la formazione di XL, la luce UVA risultava molto più efficace della BL. È da notare come la forma SC migrava più lentamente con l'aumentare dell'irradiazione UVA, mentre con BL accadeva il contrario.

Questo comportamento può essere dovuto a due differenti tipi di fotoaddotti formati con le due diverse luci e le risultanti strutture acquisite dal plasmide: con UVA, il DNA SC è ricco di XL e i MA sono lesioni minori, mentre con BL si formano solo MA.

Campioni	UVA		BL	
	% OC	% SC	% OC	% SC
SC	2.9 ± 0.6	97.1 ± 0.6	3.3 ± 0.3	96.7 ± 0.3
SC + Luce 15.0 J/cm ²	10.3 ± 0.8*	89.7 ± 0.8*	4.5 ± 1.2	95.5 ± 1.2
0 J/cm ²	3.1 ± 0.4	96.9 ± 0.4	2.9 ± 0.8	97.1 ± 0.8
2.0 J/cm ²	4.8 ± 1.4	95.2 ± 1.4	2.4 ± 1.1	97.6 ± 1.1
5.0 J/cm ²	6.3 ± 0.5*	93.7 ± 0.5*	2.6 ± 0.8	97.4 ± 0.8
7.5 J/cm ²	5.8 ± 1.3*	94.2 ± 1.3*	3.3 ± 0.5	96.7 ± 0.5
12.0 J/cm ²	21.2 ± 0.8*	78.8 ± 0.8*	2.7 ± 0.5	97.3 ± 0.5
15.0 J/cm ²	27.8 ± 1.1*	72.2 ± 1.1*	2.5 ± 1.2	97.5 ± 1.2

Campioni	UVA		BL	
	% OC	% SC	% OC	% SC
SC	5.7 ± 1.7	94.3 ± 1.7	2.1 ± 1.5	97.9 ± 1.5
SC + Luce 15.0 J/cm ²	13.6 ± 3.1*	86.4 ± 3.1*	2.2 ± 0.7	97.8 ± 0.7
0 J/cm ²	7.9 ± 1.2*	92.1 ± 1.2*	3.1 ± 1.2	96.9 ± 1.2
2.0 J/cm ²	5.6 ± 3.2	94.4 ± 3.2	3.3 ± 0.9	96.7 ± 0.9
5.0 J/cm ²	15.3 ± 2.6*	87.4 ± 2.6*	4.6 ± 1.6	95.4 ± 1.6
7.5 J/cm ²	55.5 ± 1.1*	44.5 ± 1.1*	4.0 ± 0.8	96.0 ± 0.8
12.0 J/cm ²	70.4 ± 2.9*	29.6 ± 2.9*	2.2 ± 1.4	97.8 ± 1.4
15.0 J/cm ²	82.4 ± 1.7*	17.6 ± 1.7*	5.4 ± 2.1	94.6 ± 2.1

Tabella 2. Analisi densitometrica dei gel di agarosio di 8-MOP (A) e TMA (B) di Fig. 3. L'intensità delle bande è stata calcolata usando il software ImageLab. I campioni di SC sono stati presi come controlli. *p<0.05 vs SC. SC: forma superavvolta; OC: forma svolta.

Danno ossidativo. La formazione di ROS, spesso coinvolti nella fotosensibilizzazione indotta dalle furocumarine, può contribuire alla rottura dei filamenti di DNA. Infatti, le basi del DNA, soprattutto la guanina, sono sensibili ai ROS, con formazione di derivati 8-ossoguaninici e 5,6-diidropirimidinici (Cadet e Wagner, 2013). La rilevazione del danno ossidativo (Fig. 4) è stata effettuata con l'ausilio dell'enzima Endo III, il quale riconosce le 5,6-diidropirimidine indotte dal radicale idrossilico e rimuove le basi ossidate lasciando siti abasici. Questo permette il rilassamento della forma SC del DNA plasmidico pBR322. La sola luce UVA alla maggior dose impiegata nell'esperimento induceva un lieve danno fotossidativo, visibile nel DNA di controllo (campione 0). 8-MOP aumentava, rispetto alla sola luce UVA, questo tipo di lesioni solo quando attivato dalla dose più alta di UVA (7.5 J/cm²) (Fig. 4A). Lo stesso comportamento è stato osservato anche in seguito a irradiazione con BL (Fig. 4C), ma, in questo caso, 8-MOP non ha prodotto danni fotoossidativi maggiori di quelli presenti nel campione trattato con la sola luce; sembrava anzi avere un effetto protettivo sul DNA probabilmente conseguente all'assorbimento della radiazione incidente. Risultati analoghi a quelli descritti per 8-MOP sono stati ottenuti con TMA sia con UVA che con BL (Fig. 4C e D).

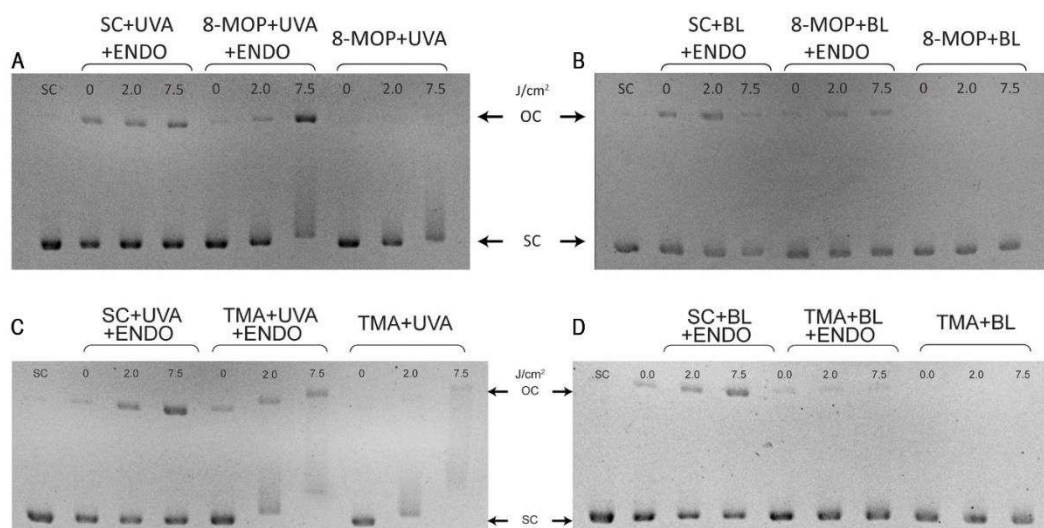


Figura 4. Danni fotoossidativi al DNA. Modificazioni alle basi del DNA fotoindotte da 8-MOP (A e B) e TMA (C e D) irradiati con dosi crescenti di luce UVA (A e C) e BL (C e D). SC: forma superavvolta; OC: forma svolta.

4.2 Effetti sulla linea cellulare DU145

L'attività antiproliferativa di 8-MOP e TMA, fotoattivati da UVA e BL, è stata inizialmente valutata sulle cellule DU145, derivate da un carcinoma prostatico di origine umana. Queste cellule formavano colonie di discrete dimensioni quando non confluenti e un monostrato una volta raggiunta la confluenza (Fig. 5A). Le colture possedevano una elevata percentuale (circa 98%) di cellule positive al marcatore CD44, che risultava maggiormente localizzato a livello della membrana citoplasmatica (Fig. 5C). Quando coltivate in condizioni di non aderenza, invece, in un terreno privo di siero, le cellule DU145 erano in grado di formare sferoidi, anch'essi esprimenti CD44, il cui diametro variava tra gli 80 e i 100 μm (Fig. 5B e D).

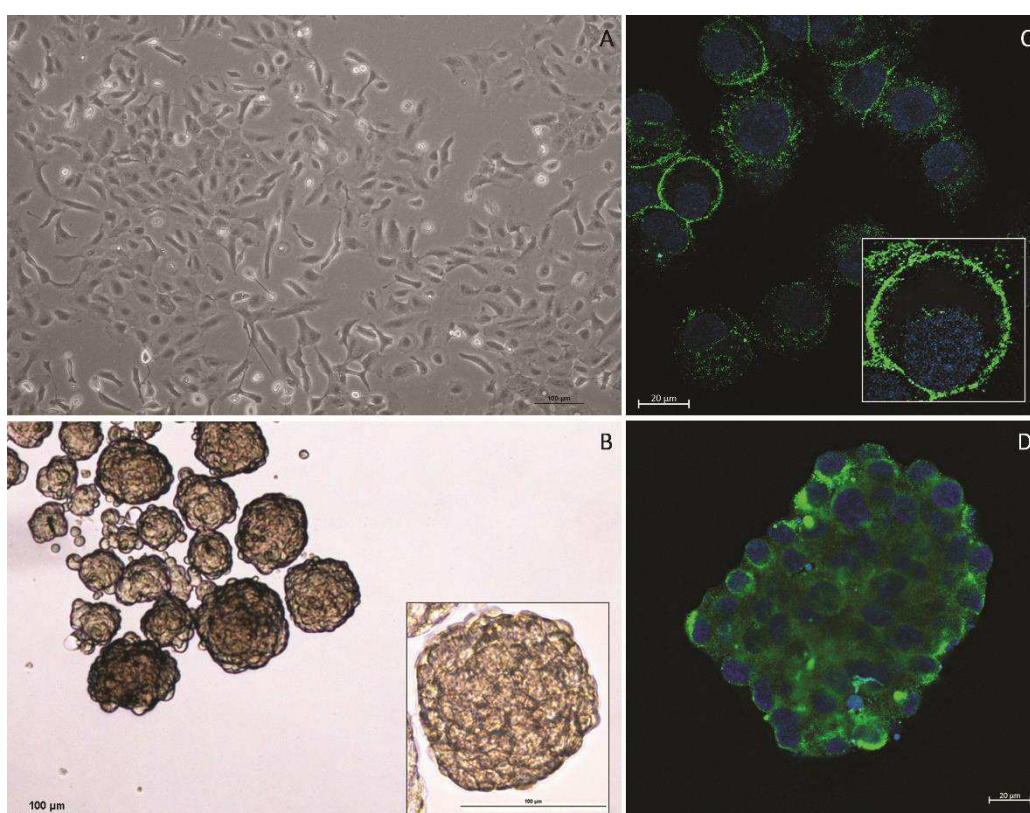


Figura 5. Immagine di microscopia a contrasto di fase (A e B) e immunofluorescenza (C e D) di cellule DU145 in monostrato (A e C) e in condizioni di assenza di siero (B e D). L'immunoreattività verso il CD44 è rappresentata dal colore verde mentre i nuclei colorati con DAPI appaiono di colore blu. Barre: 100 μm (A e B), 20 μm (C e D).

Per valutare l'attività antiproliferativa dei composti, il monostrato cellulare è stato trattato con varie concentrazioni di 8-MOP e TMA (da 0.01 μM a 30 μM e da 0.01 μM a 10 μM , rispettivamente) e successivamente irradiato con la dose di 2 J/cm^2 di luce UVA o di BL. È stata usata la dose di 2 J/cm^2 in quanto era la più bassa dose di UVA e BL che non induceva diminuzioni nel numero delle (dati non mostrati). In seguito ad irradiazione le cellule sono state staccate e riseminate in condizioni di privazione di

siero per testarne la capacità di formazione di sfere. Come evidenziato in figura 6, entrambi i composti presentavano un maggior effetto inibitorio quando attivati da luce UVA rispetto a BL. 8-MOP fotoattivato da UVA era in grado di inibire completamente la formazione di sferoidi cellulari a partire dalla concentrazione di 0.5 μM (Fig. 6A), mentre TMA presentava la stessa capacità alla concentrazione di 0.05 μM (Fig. 6C). Quando irradiati con BL, invece, la mancata formazione di sfere si osservava alla concentrazione di 5 μM per TMA (Fig. 6D), mentre per 8-MOP si raggiungeva solamente un 70% di inibizione alla concentrazione di 30 μM (Fig. 6B). TMA è risultata quindi più efficace di 8-MOP nell'inibire la proliferazione cellulare sia quando attivata da UVA che da BL. Nessuna variazione significativa è stata, invece, riscontrata nei campioni trattati solo con luce o con le sostanze mantenute al buio.

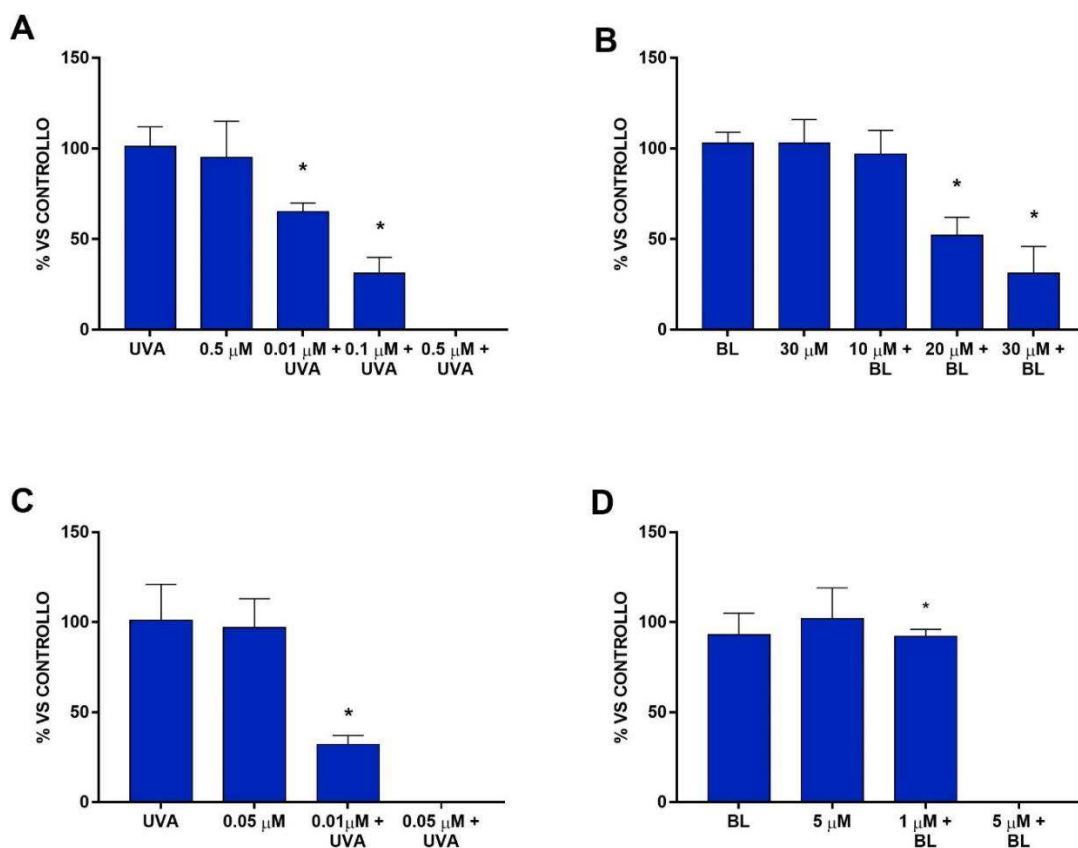


Figura 6. Saggio di formazione delle sfere. Colture trattate con 8-MOP (A e B) e TMA (C e D) e irradiate con 2.0 J/cm² di UVA (A e C) e BL (B e D). Le colture non trattate sono state considerate come controllo. **p*<0.05 vs controllo, Student's *t*-test. BL: blue light.

Per approfondire il meccanismo biologico alla base dell'effetto osservato, i successivi esperimenti sono stati condotti trattando le cellule in monostrato con le concentrazioni delle sostanze che avevano inibito completamente, o quasi, la formazione delle sfere (0.5 μM e 30 μM 8-MOP e 0.05 μM e 5 μM TMA).

La diminuita vitalità cellulare era associata a una morte cellulare per apoptosi (Fig. 7). Infatti, come dimostrato dall'analisi citofluorimetrica, a 48 h dal trattamento, sia le colture trattate con 8-MOP che con TMA presentavano una elevata percentuale di cellule apoptotiche, positive all'annessina V. In linea con i dati ottenuti dal saggio di formazione delle sfere l'effetto proapoptotico di 8-MOP risultava maggiore quando la molecola veniva attivata da UVA (Fig. 7A) rispetto a quando irradiata con BL (Fig. 7B), inducendo anche un significativo aumento di cellule necrotiche (PI+/ANX-). Nelle colture trattate con TMA, invece, non è stato possibile apprezzare alcuna differenza nel tasso di apoptosi tra le due modalità di irradiazione (Fig. 7C e D); è stato, invece, registrato un sensibile incremento della percentuale di cellule necrotiche nei campioni trattati con la sostanza irradiata con BL. Un lieve ma significativo aumento di cellule necrotiche è stato registrato nelle colture trattate con la sola BL, mentre nessuna variazione significativa è stata osservata nei campioni irradiati con UVA e in quelli incubati con le sostanze e mantenuti al buio. Le colture non trattate sono state usate come controllo.

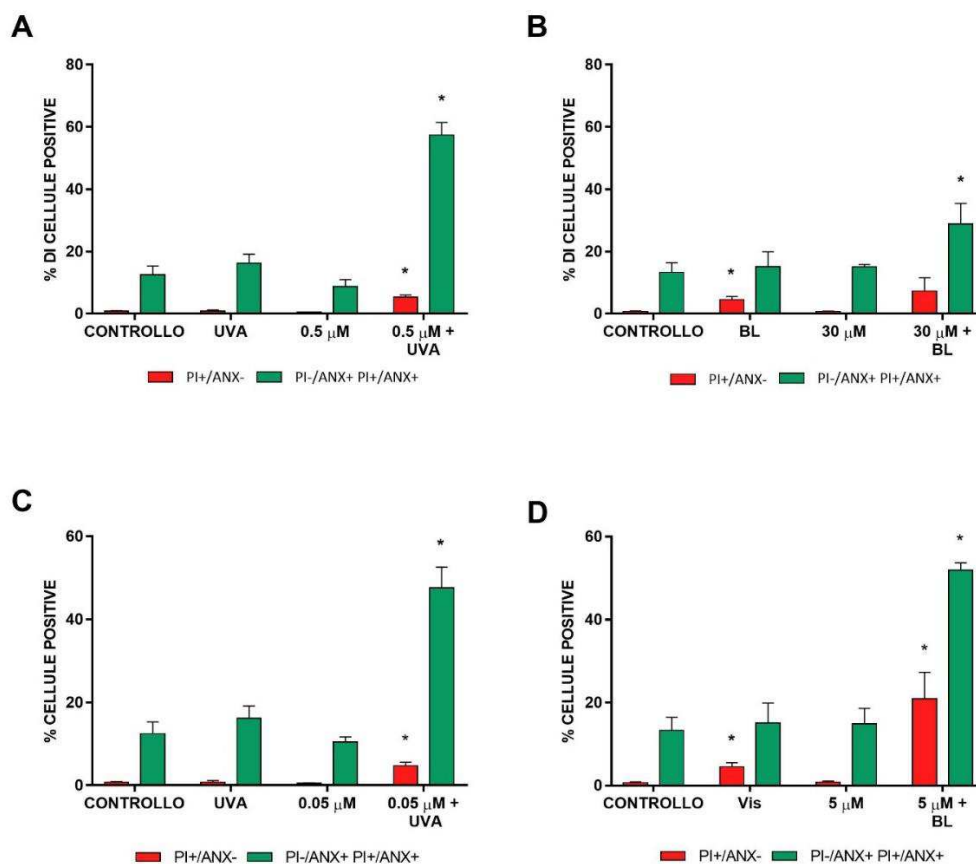


Figura 7. Effetto di 8-MOP (A e B) e TMA (C e D) sull'apoptosi quando attivati da 2.0 J/cm² di UVA (A e C) o BL (B e D). **p*<0.05 vs controllo, Student's *t*-test. PI: ioduro di propidio; ANX: annessina V; BL: blue light.

L'effetto proapoptotico osservato nelle colture trattate con le sostanze fotoattivate può essere in parte dovuto alla capacità delle furocumarine di formare ROS. Infatti, come illustrato in figura 8, immediatamente dopo irradiazione, sia 8-MOP (Fig. 8A) che TMA (Fig.8B) erano in grado di formare un'ingente quantitativo di ROS sia quando attivati da UVA che da BL. L'ammontare di ROS risultava maggiore quando le molecole erano irradiate con UVA rispetto a BL, probabilmente in virtù della radiazione più energetica; inoltre, con BL, 8-MOP dimostrava una maggiore capacità di formare di specie reattive rispetto a TMA. Un lieve ma significativo aumento di ROS è stato riscontrato anche nelle colture trattate con le sostanze mantenute al buio, mentre non si è osservata nessuna variazione significativa nei campioni trattati con la sola luce. Le colture non trattate sono state usate come controllo, mentre come controllo positivo di formazione di ROS sono stati usati alcuni campioni tratti con TBHP alla concentrazione di 200 μ M.

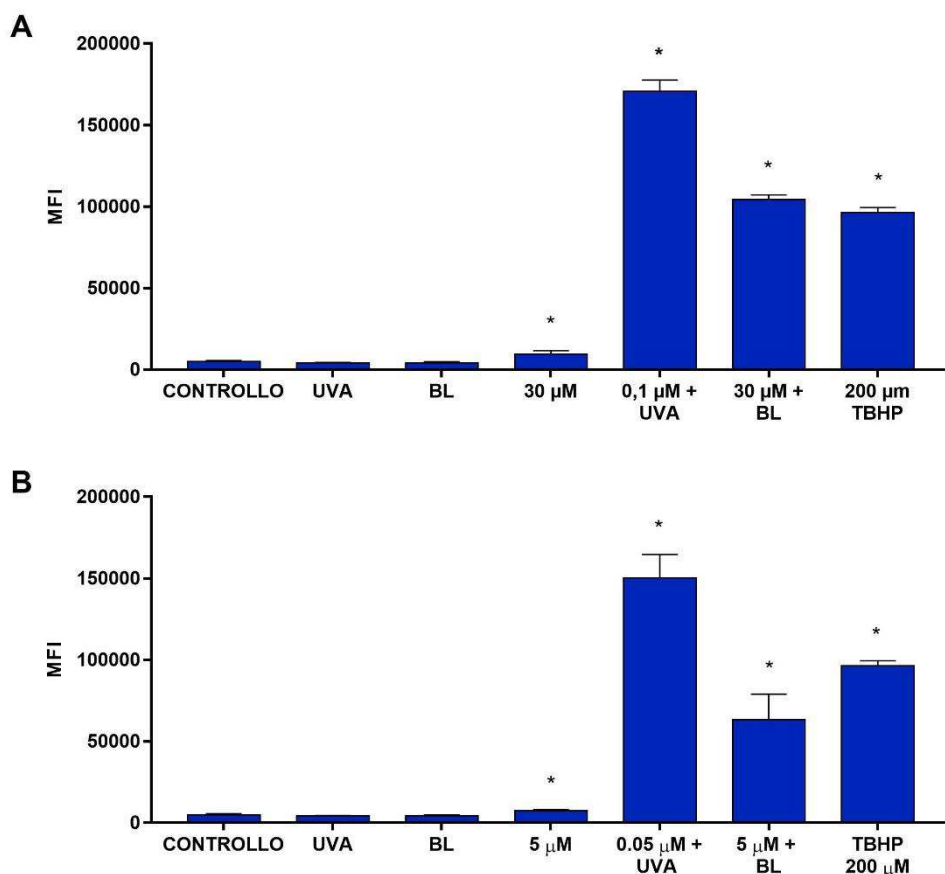
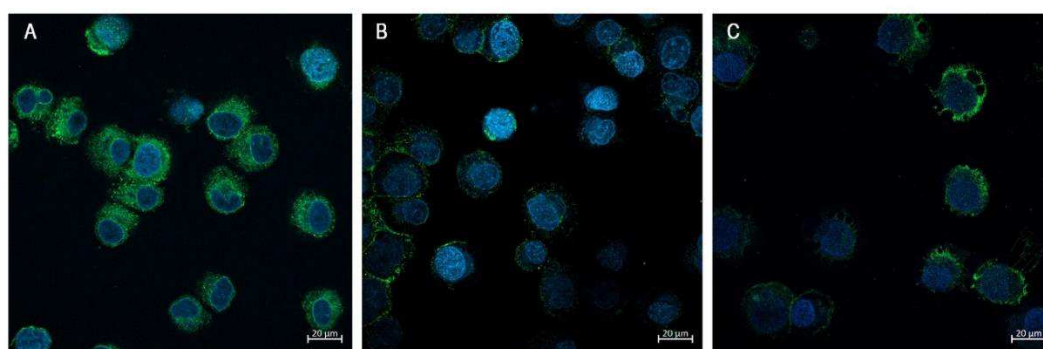


Figura 8. Formazione di ROS. Colture trattate con 8-MOP (A) e TMA (B) e irradiate con 2.0 J/cm² di UVA o BL. * p <0.05 vs controllo, Student's t -test. BL: blue light; TBHP: tert-butil-idroperossido.

A 48 h dal trattamento è stata valutata anche l'immunoreattività delle cellule DU145 verso il CD44. L'analisi citofluorimetrica, i cui valori sono riportati nelle tabelle in figura 9, ha evidenziato una significativa diminuzione nella percentuale di cellule CD44⁺ nei

campioni trattati sia con 8-MOP sia in quelli incubati con TMA con entrambi i tipi di radiazione luminosa. Nelle colture esposte a 8-MOP il maggiore decremento di immunoreattività si verificava quando la fotoattivazione veniva effettuata con UVA; al contrario, TMA presentava una maggiore diminuzione della percentuale di cellule positive per il CD44 nelle colture irradiate con BL rispetto a quelle esposte alla luce UVA. Una lieve ma significativa riduzione di CD44 si è verificata anche nei campioni esposti solamente a BL e in quelli trattati con le sostanze alla concentrazione maggiore e mantenuti al buio. Con entrambi i tipi di luce, TMA, ha dimostrato una maggiore capacità nel ridurre l'immunoreattività verso il CD44 rispetto ad 8-MOP. I dati ricavati dall'analisi citofluorimetrica sono stati, in seguito, confermati dall'analisi in immunofluorescenza.



8-MOP	
Campioni	% cellule CD44 ⁺ ± DS
CONTROLLO	97.6 ± 1.2
UVA	96.7 ± 0.6
0.5 µM	96.0 ± 1.6
0.5 µM + UVA	75.3 ± 3.5*
BL	91.2 ± 0.8*
30 µM	91.5 ± 1.0*
30 µM + BL	89.3 ± 2.7*

TMA	
Campioni	% cellule CD44 ⁺ ± DS
CONTROLLO	97.6 ± 1.2
UVA	96.7 ± 0.6
0.05 µM	97.7 ± 0.2
0.05 µM + UVA	35.5 ± 11.7*
BL	91.2 ± 0.8*
5 µM	90.1 ± 0.4*
30 µM + BL	12.8 ± 1.3*

Figura 9. Espressione di CD44. Immagini rappresentative della diminuzione di immunoreattività per CD44 in colture trattate con 8-MOP (B) e TMA (C) rispetto a quelle di controllo (A). Le colture sono state irradiate con 2.0 J/cm² di UVA o BL. La positività a CD44 è evidenziata in verde mentre i nuclei colorati con DAPI appaiono di colore blu. Barre 20 µm. I dati di citofluorimetria sono riportati come percentuale di cellule CD44⁺. **p*<0.05 vs controllo, Student's *t*-test. BL: blue light.

Per analizzare più dettagliatamente il meccanismo alla base dell'effetto antiproliferativo e proapoptotico di 8-MOP e TMA, in seguito ad irradiazione, è stato valutato lo stato di attivazione di alcune protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK) tramite western blot, usando anticorpi in grado di riconoscere la forma fosforilata di queste proteine. Come mostrato in figura 10 l'attivazione di 8-MOP tramite luce UVA si traduceva in un significativo incremento della forma fosforilata della proteina p38 rispetto ai campioni non trattati (Fig. 10); al contrario, non si riscontrava alcun tipo di variazione nella forma attiva delle proteine ERK1/2 negli stessi campioni (Fig. 10C).

Piccoli ma significativi aumenti della forma fosforilata di p38 sono stati riscontrati anche nei campioni trattati con la sostanza tenuta al buio e in quelli irradiati con UVA. Quando fotoattivato da BL, 8-MOP induceva un incremento della forma fosforilata di ERK1/2 (Fig. 10B), osservato anche nel campione trattato con sola BL, ma nessun effetto a livello di p38 (Fig. 10D).

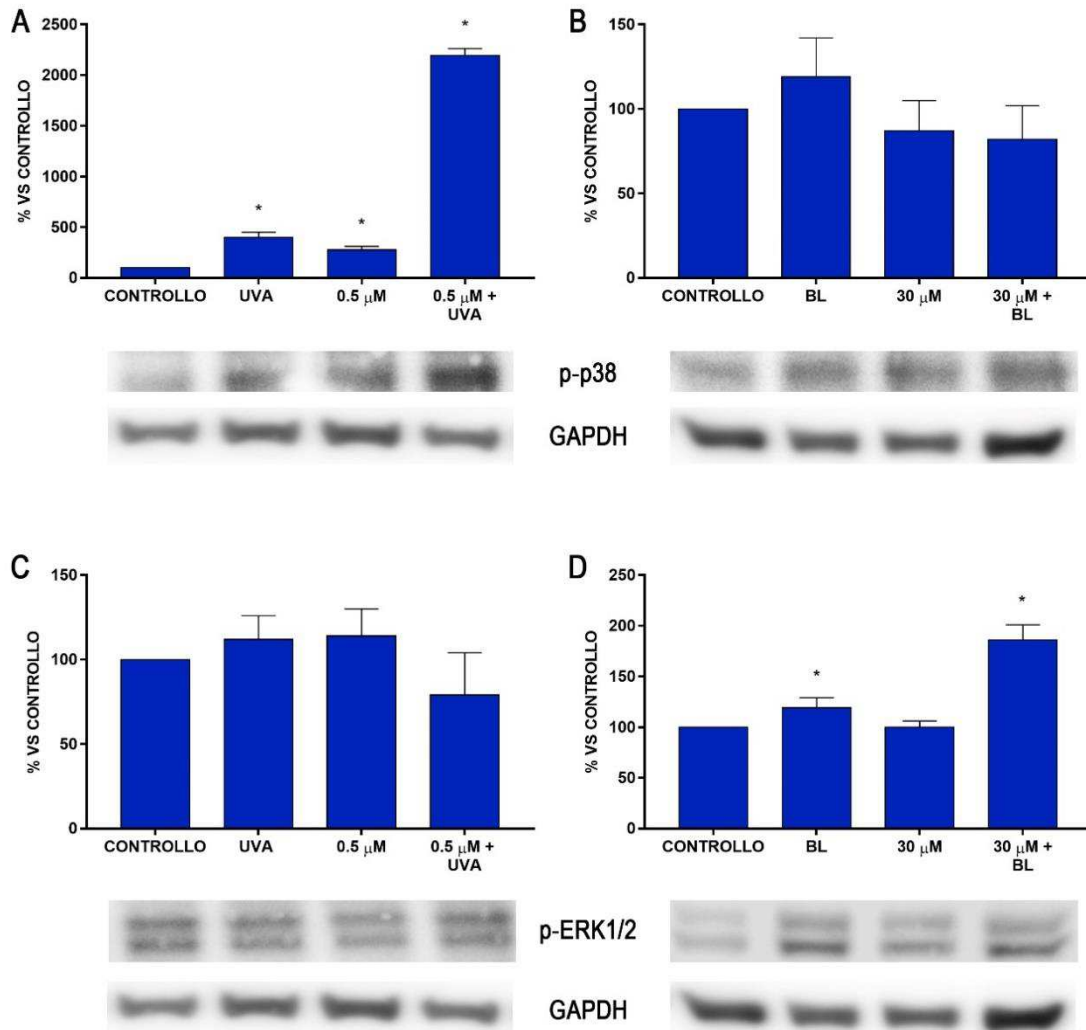


Figura 10. Analisi tramite western blot delle forme fosforilate di p38 (A e B) e ERK1/2 (C e D). Le colture sono state trattate con 0.5 μ M 8-MOP piú 2.0 J/cm² UVA o 30 μ M piú BL. La quantificazione dell'espressione proteica è stata eseguita tramite analisi densitometrica usando il software ImageJ. I dati, normalizzati alla proteina *house-keeping* GAPDH, sono riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. * p <0.05 vs controllo. BL: blue light.

TMA presentava, invece, un comportamento differente: provocava un significativo aumento della forma fosforilata di p38 quando attivata sia con UVA (Fig. 11A) che con BL (Fig. 11B). Al contrario, si verificava una cospicua diminuzione della forma attiva di ERK1/2 nei campioni trattati con TMA e irradiati sia con UVA (Fig. 11C) che BL (Fig. 11D). Decrementi significativi della fosforilazione di ERK1/2 sono stati

registrati anche nei campioni trattati con la sola sostanza mantenuta al buio. Inoltre, quando fotoattivata sia da UVA (Fig. 11E) che da BL (Fig. 11F) TMA è risultata in grado di ridurre i livelli nucleari di β -catenina.

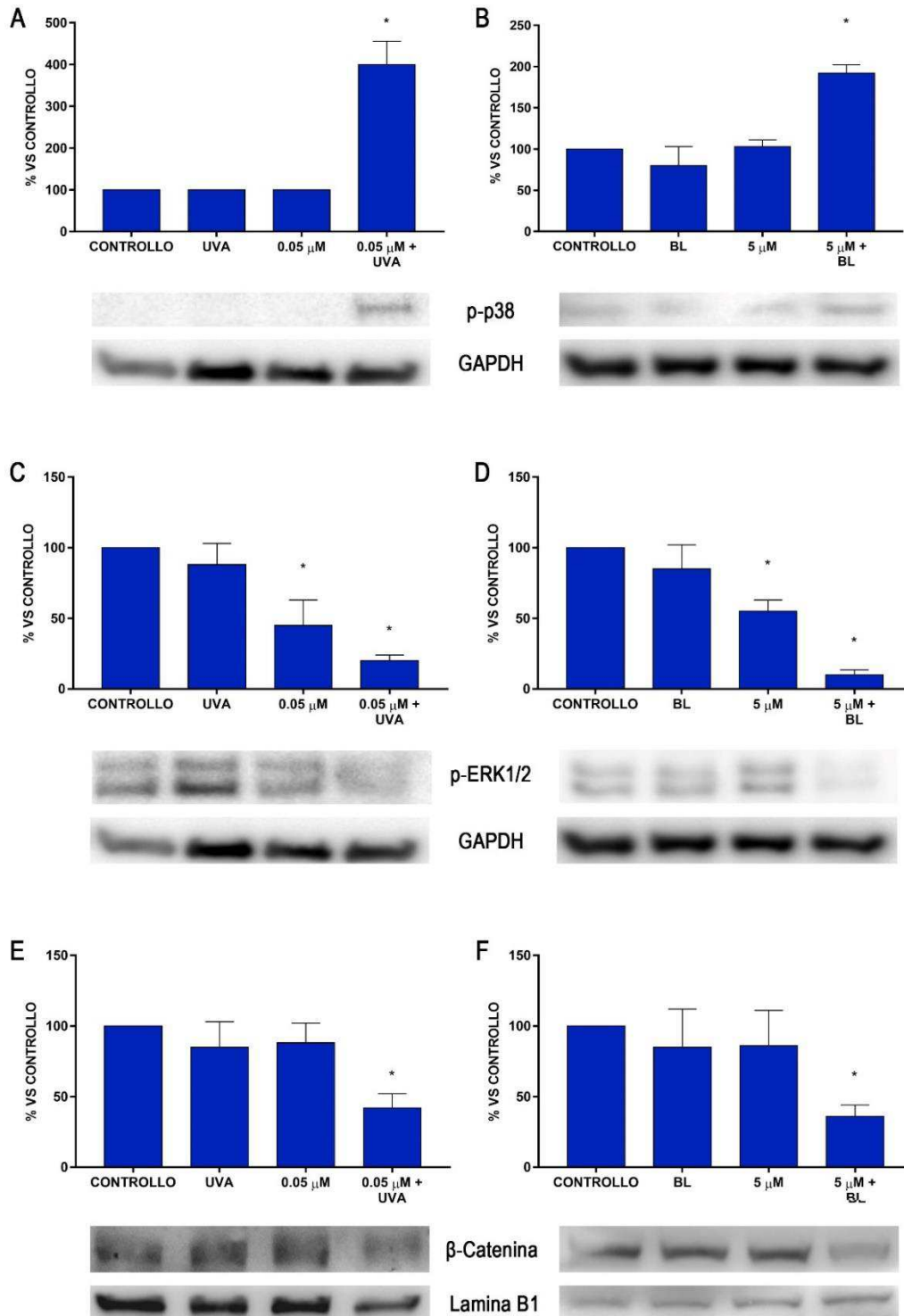


Figura 11. Analisi tramite western blot delle forme fosforilate di p38 (A e B), ERK1/2 (C e D) e dei livelli nucleari di β -catenina (E e F). Le colture sono state trattate con 0.05 μ M TMA più 2.0 J/cm² UVA o 5 μ M più BL. La quantificazione dell'espressione proteica è stata eseguita tramite analisi densitometrica usando il software ImageJ. I dati, normalizzati alle proteine *house-keeping* GAPDH ed a Lamina B1, sono riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. * p <0.05 vs controllo. BL: blue light.

Infine, in virtù della loro capacità di interagire e di legare il DNA, è stata verificata la genotossicità di 8-MOP e TMA, attraverso la valutazione della forma fosforilata dell'istone H2AX (Fig. 12). L'analisi tramite western blot ha dimostrato che 8-MOP provocava un incremento significativo di p-H2AX quando fotoattivato sia da UVA che da BL. Al contrario, non è stato registrato nessun considerevole aumento della forma fosforilata dell'istone nei campioni trattati con TMA in entrambe le condizioni di irradiazione. Come atteso, un piccolo ma significativo aumento di p-H2AX è stato riscontrato nei campioni trattati con sola luce UVA. Le colture non trattate sono state usate come controlli, mentre il controllo positivo di marcatura era rappresentato da cellule DU145 trattate con 8-MOP alla concentrazione di 0.1 μM e irradiate con 5.0 J/cm^2 .

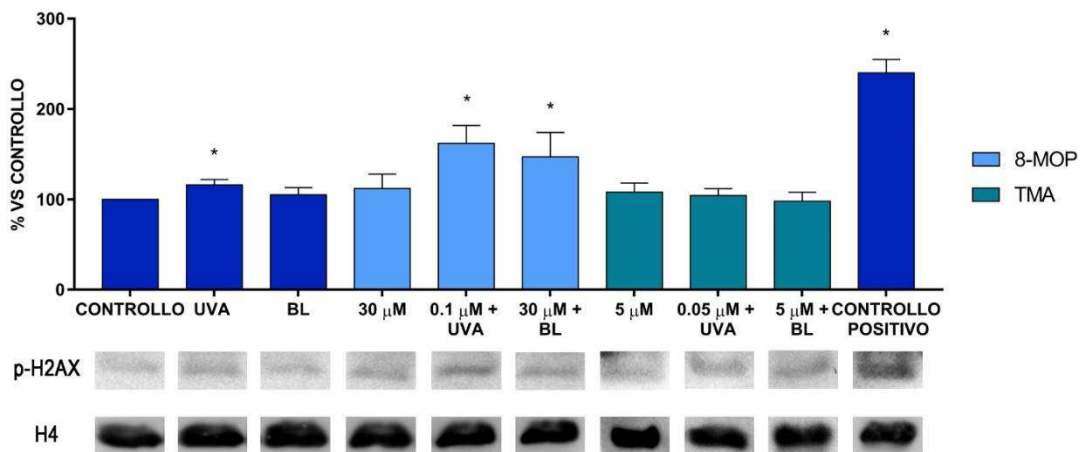


Figura 12. Analisi tramite western blot della forma fosforilata dell'istone H2AX. Le colture sono state trattate con 0.5 μM 8-MOP più 2.0 J/cm^2 UVA o 30 μM più BL e con 0.05 μM TMA più 2.0 J/cm^2 UVA o 5 μM più BL. La quantificazione dell'espressione proteica è stata eseguita tramite analisi densitometrica usando il software ImageJ. I dati, normalizzati all'istone H4, sono riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. * $p < 0.05$ vs controllo. BL: blue light.

4.3 Effetti sulla linea cellulare T24

Sulla base dei risultati ottenuti e dell'ultima evidenza sulla fosforilazione dell'istone H2AX, la sperimentazione si è focalizzata sulla condizione non genotossica che nel contempo garantisse una buona attività antiproliferativa: TMA fotoattivata da BL. In particolare, è stata valutata l'efficacia di questa combinazione sulla linea T24 di cellule tumorali vescicali umane derivate da un carcinoma dell'epitelio di transizione. Le cellule, coltivate in monostrato (Fig. 13A), presentavano una morfologia poligonale simil epiteliale e, il 70-80% di esse, esprimeva l'antigene di superficie CD44, come rilevato dall'analisi citofluorimetrica. Quando coltivate in condizione di non aderenza e in terreno privo di siero, formavano, a circa 10 giorni dalla semina, aggregati sferoidali (Fig. 13B) che erano fortemente immunoreattivi per CD44 (Fig. 13C).

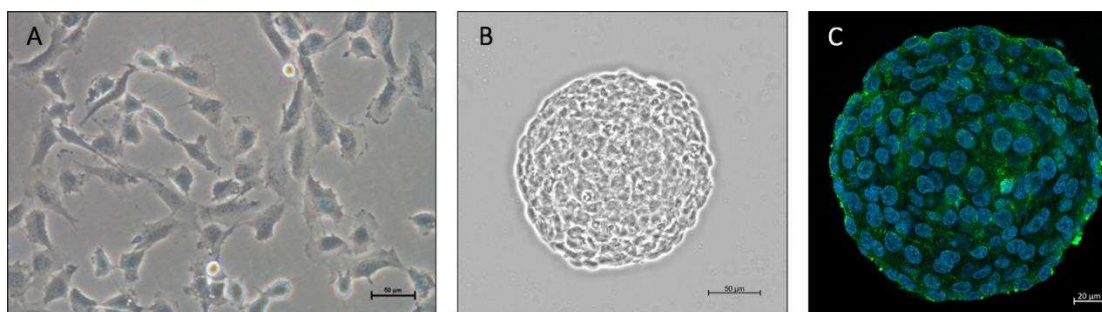


Figura 13. Microscopia ottica a contrasto di fase di colture in monostrato di cellule T24 (A, bar 50 µm) e di sferoide cellulare (B, bar 50 µm). Immunofluorescenza con anticorpo anti-CD44 (C, bar 20 µm); le zone immunoreattive sono fluorescenti in verde, i nuclei in blu.

Il trattamento con TMA è stato effettuato utilizzando una dose di BL pari a 2 J/cm², che non aveva alcun effetto sulla crescita cellulare. Dosi superiori, al contrario, inibivano in modo dose-dipendente la proliferazione (dati non mostrati). Come illustrato in figura 14, l'associazione TMA/BL si traduceva in significative diminuzioni del numero di cellule rispetto ai controlli non trattati con la sostanza e non irradiati, con un andamento dose-risposta. Confrontando i due time-point l'effetto inibitorio sulla crescita cellulare aumentava leggermente a 48 h, ma in modo non significativo. Il trattamento delle colture con la dose massima di TMA (10 µM) ma senza irradiazione non aveva alcun effetto.

L'attività antiproliferativa di TMA era legata ad un effetto pro-apoptotico. Infatti, come evidenziato in figura 14, la percentuale di cellule apoptotiche era significativamente elevata nelle colture trattate con la sostanza, sia a 24 che a 48 h (Fig. 14C e D).

Come per la linea cellulare DU145, gli esperimenti successivi sono stati effettuati utilizzando TMA in concentrazione pari a 5 µM, corrispondente a circa un 50% di inibizione della crescita cellulare.

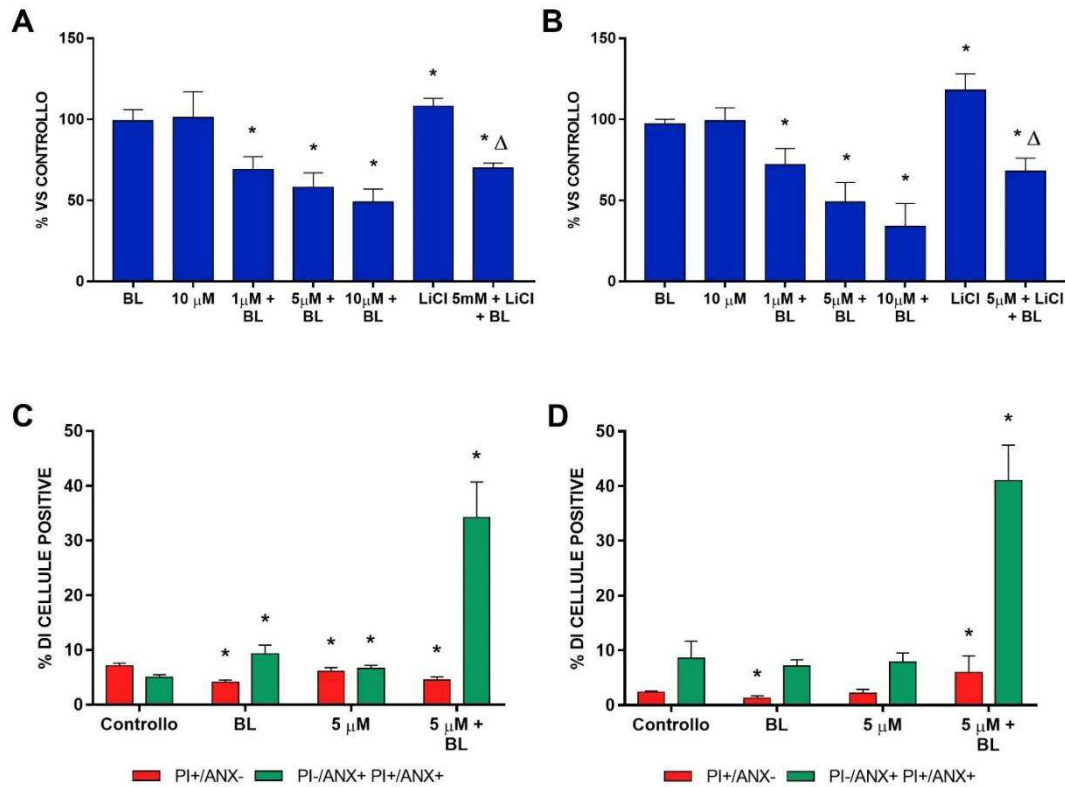


Figura 14. Determinazione della vitalità cellulare effettuata tramite colorazione con trypan blue di cellule T24 dopo 24 (A) e 48 (B) h dal trattamento con TMA e BL (2 J/cm²). I risultati, espressi come percentuale rispetto alle colture non trattate, sono stati ottenuti da 3 esperimenti effettuati in triplicato ed espressi come media \pm SD. Analisi citofluorimetrica con Annessina (V) e Ioduro di Propidio (PI) dopo 24 (C) e 48 h (D) dal trattamento con TMA e BL (2 J/cm²). I risultati, espressi come percentuale di cellule positive alla marcatura, sono stati ottenuti da 3 esperimenti effettuati in triplicato ed espressi come media \pm SD. * = p<0.05 verso colture non trattate, Δ = p<0.05 verso colture trattate con TMA/BL Student's t test.

In seguito, il profilo di genotossicità del trattamento combinato TMA e BL è stato valutato anche su questa linea cellulare (Fig. 15). L'analisi della forma fosforilata dell'istone H2AX non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i campioni trattati e i relativi controlli, confermando quindi che il trattamento combinato non risultava genotossico.

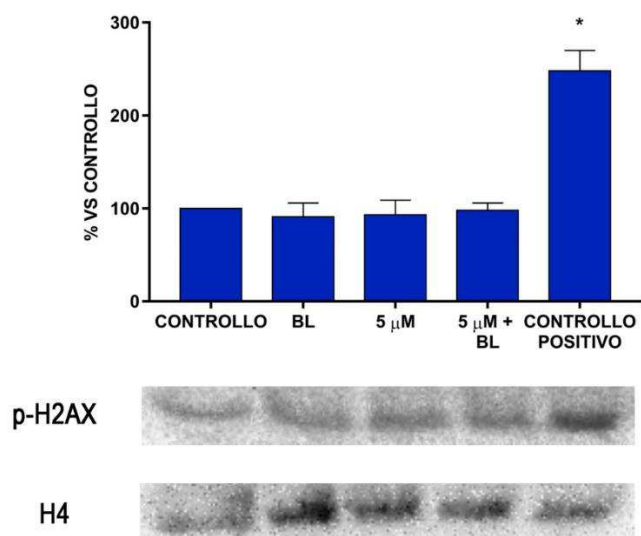


Figura 15. Analisi tramite western blot della forma fosforilata dell'istone H2AX. Le colture sono state trattate 5 μ M TMA piú BL. La quantificazione dell'espressione proteica è stata eseguita tramite analisi densitometrica usando il software ImageJ. I dati, normalizzati all'istone H4, sono riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. * p <0.05 vs controllo. BL: blue light.

Il trattamento con TMA e BL modulava in modo negativo la via Wnt canonica. Infatti, l'espressione della β -catenina a livello nucleare diminuiva rispetto alle colture non trattate. A 24 e 48 h, decrementi significativi si registravano solo nei campioni esposti a TMA e BL (Fig. 16). Nelle colture di controllo, era visibile una diffusa fluorescenza non solo a livello del nucleo, ma anche del citoplasma e della membrana citoplasmatica (Fig. 17). Nei campioni trattati con TMA/BL in queste due ultime localizzazioni la positività alla β -catenina risultava ridotta e completamente assente nel nucleo.

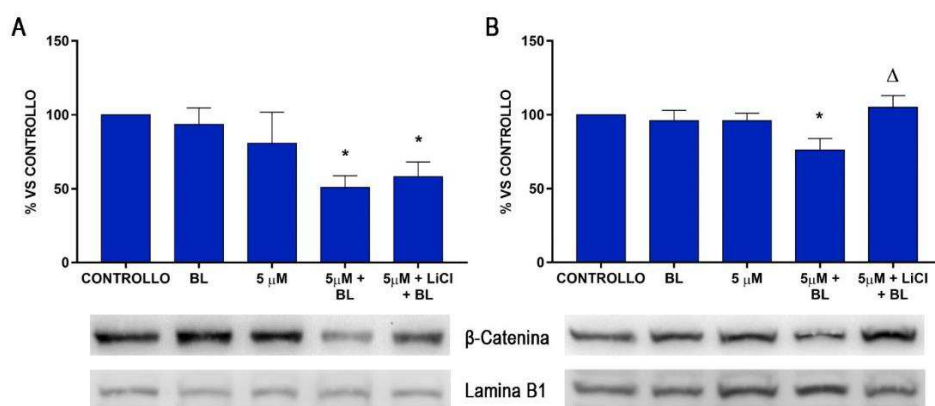


Figura 16. Espressione di β -catenina nucleare dopo 24 h e 48 h dal trattamento con TMA e BL (2 J/cm^2). La quantificazione dei livelli di espressione proteica è stata effettuata tramite analisi densitometrica utilizzando il software ImageJ e i risultati espressi come percentuale rispetto alle colture di controllo * = p <0.05 verso colture non trattate, Δ = p <0.05 verso colture trattate con TMA/BL, Student's t test.

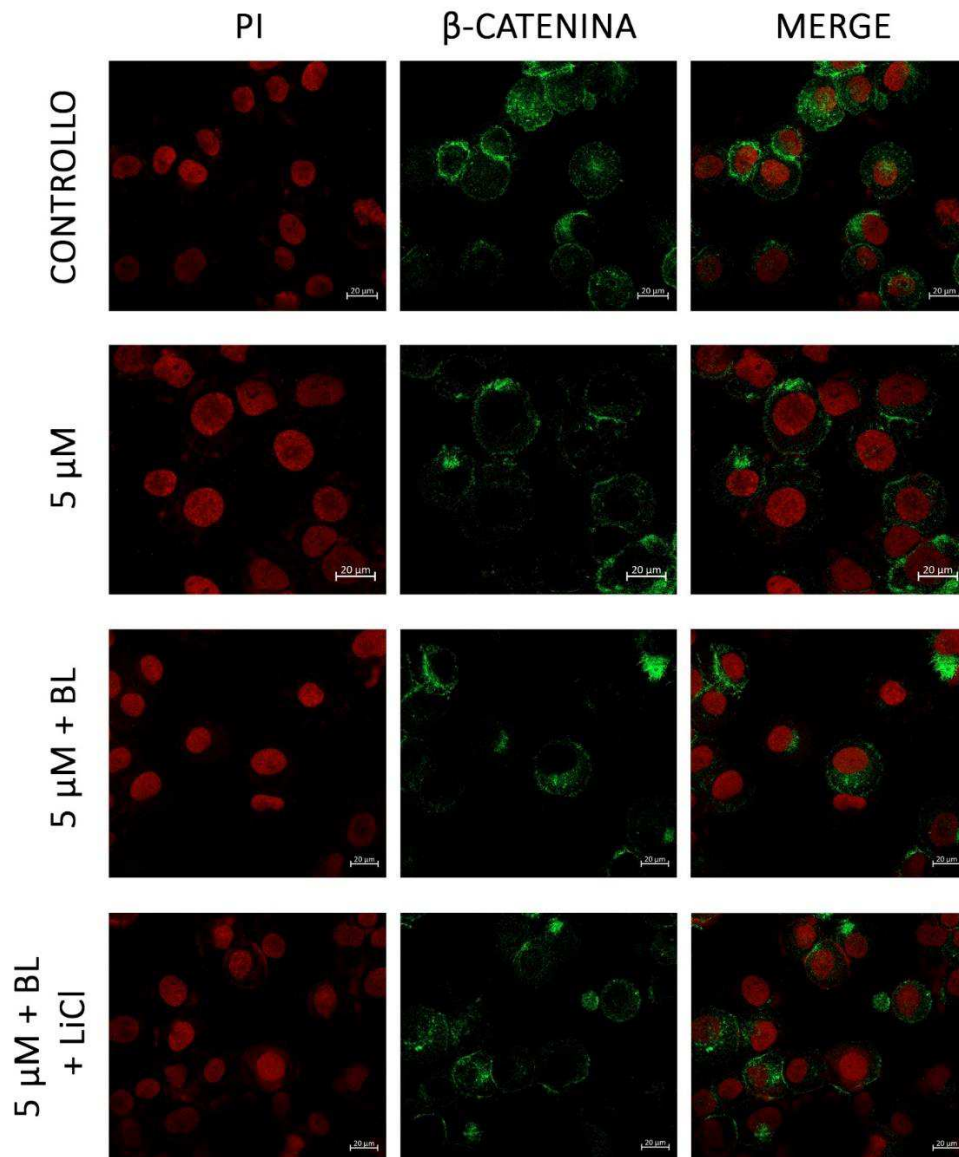


Figura 17. Immunofluorescenza con anticorpo anti- β -catenina dopo 48 h dal trattamento con TMA e BL. I nuclei sono fluorescenti in rosso, mentre le zone positive alla β -catenina in verde (bar 20 μ M).

L'inibizione della via Wnt/ β -catenina si traduceva in una riduzione dell'espressione di geni target della via (Fig. 18). A 3 h dal trattamento si osservavano decrementi significativi di ciclina D1, c-Myc, β -catenina e CD44v6 rispetto al controllo. Questi ultimi due venivano diminuiti anche in seguito al trattamento con TMA in assenza di BL.

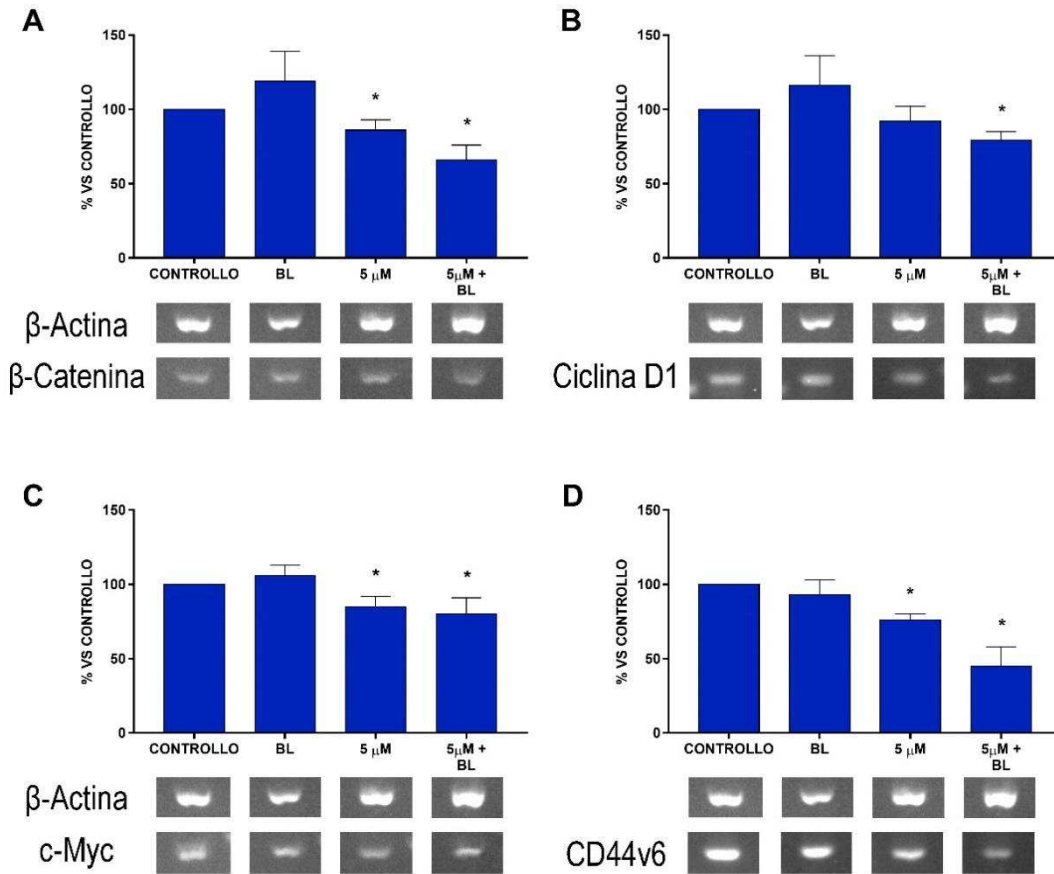


Figura 18. Analisi RT-PCR di β -catenina (A), ciclina D1 (B), c-Myc (C) e CD44v6 (D) a 3 ore dal trattamento con TMA e BL (2 J/cm²). La quantificazione dei livelli di espressione è stata effettuata tramite l'analisi densitometrica utilizzando il software ImageLab e i risultati sono stati espressi in percentuale rispetto alle colture di controllo. *p<0.05 verso culture non trattate, Student's t test.

Consistente con i risultati della RT-PCR, il trattamento con TMA riduceva in modo significativo la percentuale di cellule positive a CD44. In particolare, rispetto alle colture non trattate, si osservava una diminuzione di circa il 9% a 24 h (Fig. 19A) che raggiungeva circa il 45% a 48 h (Fig. 19B). I dati citofluorimetrici sono stati confermati dall'immunofluorescenza (Fig. 19C). Nelle colture di controllo e in quelle trattate con TMA, ma non irradiate, l'immunoreattività era principalmente localizzata a livello della membrana plasmatica, diffusa, in misura minore, all'interno del citoplasma e assente nel nucleo. Nelle colture incubate con la sostanza e irradiate, solo poche cellule erano debolmente positive per CD44.

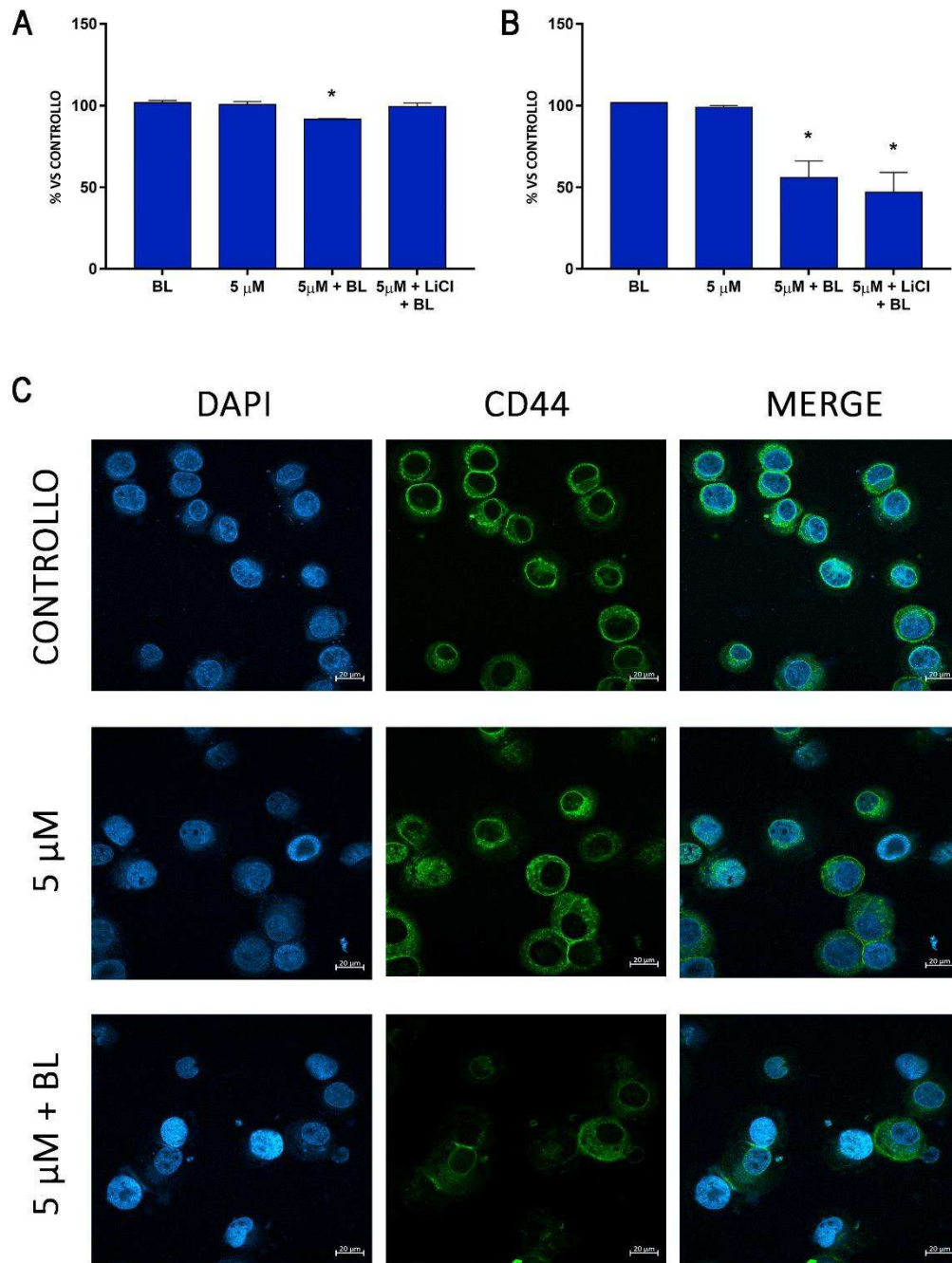


Figura 19. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di CD44 dopo 24 (A) e 48 h (B) dal trattamento con TMA e BL. I dati sono espressi come percentuale di cellule positive rispetto al controllo non trattato. I risultati, ottenuti da 3 esperimenti effettuati in triplicato, sono espressi come media \pm SD. * = $p < 0.05$ verso colture non trattate, Student's t test. (C) Immunofluorescenza con anticorpo anti-CD44 dopo 24 h dal trattamento con TMA e BL. I nuclei sono fluorescenti in blu, mentre le zone positive a CD44 in verde (bar 20 μ m).

Studi di docking di TMA sono stati condotti sulla proteina CD44, la cui superficie è riportata in figura 20.

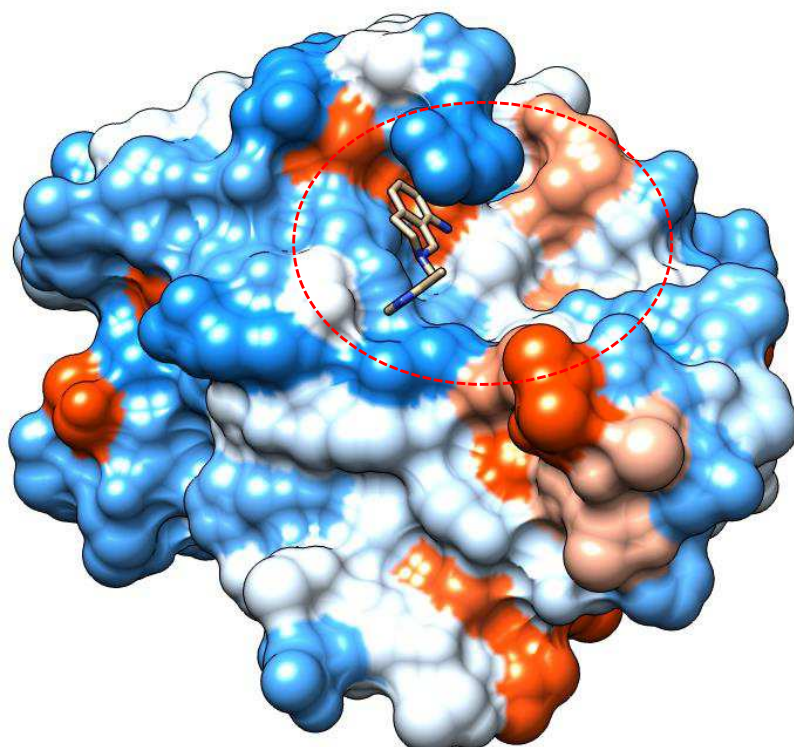


Figura 20. Struttura cristallografica di CD44. L'area in cui è stato eseguito il test di docking con TMA è racchiusa dalla linea tratteggiata rossa.

L'area in cui è stata effettuata l'analisi è evidenziata con un cerchio tratteggiato rosso. È interessante notare che, mediante simulazioni computazionali, non sono state ottenute posizioni di legame significative. Infatti, non sono state rilevate posizioni di interazione con energia di legame negativa. Inoltre, il protocollo di docking non ha portato a risultati riproducibili. Di conseguenza, si può concludere che, probabilmente, TMA non sia in grado di interagire in modo efficace con CD44.

I dati raccolti tramite Western blot hanno evidenziato che la diminuzione di β -catenina nucleare e, conseguentemente, l'inibizione della via Wnt, erano dovuti, almeno in parte, ad una induzione della rimozione della proteina a livello proteasomale. Infatti, il trattamento con TMA/BL determinava un aumento significativo della forma fosforilata della β -catenina e della fosforilazione alla tirosina 216 della chinasi GSK3 β , sia a 24 che a 48 h (Fig. 21).

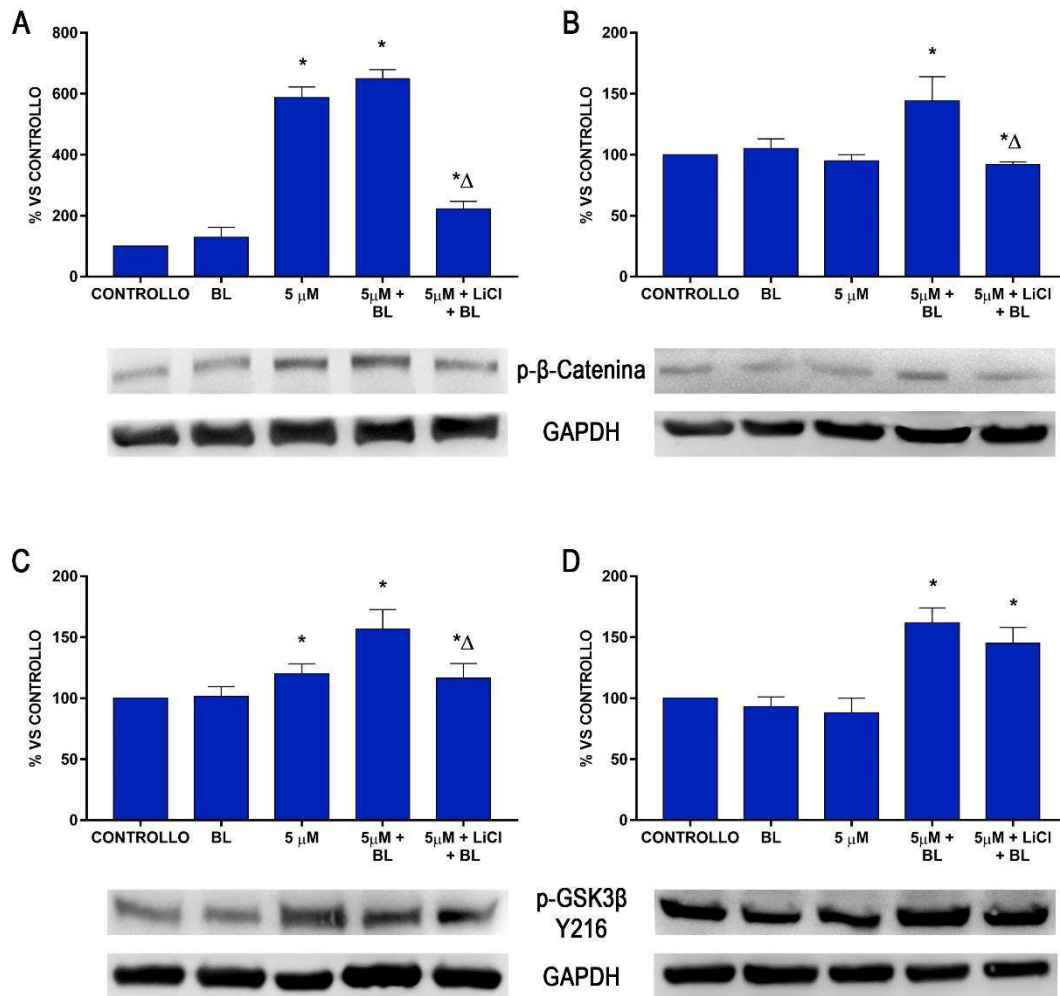


Figura 21. Espressione delle forme fosforilate di β -catenina (A e B) e GSK3 β (C e D) dopo 24 (A e C) e 48 (B e D) h dal trattamento con TMA e BL (2 J/cm²). La quantificazione dei livelli di espressione proteica è stata effettuata tramite analisi densitometrica utilizzando il software ImageJ e i risultati espressi come percentuale rispetto alle colture di controllo * = p<0.05 verso colture non trattate, Δ = p<0.05 verso colture trattate con TMA/BL, Student's t test.

Per verificare il ruolo dell'attivazione di GSK3 β come possibile target di TMA è stato utilizzato LiCl, che inibisce GSK3 β tramite fosforilazione alla serina 9, e, conseguentemente, stabilizza la β -catenina citoplasmatica stimolando la via Wnt (Zhang et al., 2003). Come riportato nella figura 14, sia a 24 che a 48 h, il trattamento delle colture con 1 mM LiCl aumentava la proliferazione cellulare rispetto alle colture di controllo. Il composto era in grado di contrastare, anche se non completamente, l'inibizione della crescita indotta da TMA/BL. Come atteso, a 24 h, LiCl in associazione con TMA/BL diminuiva, in modo significativo rispetto alle colture trattate con TMA/BL, sia l'espressione della forma fosforilata della β -catenina che quella attiva della GSK3 β , anche se non era in grado di riportare i valori di espressione a quelli delle colture non trattate (Fig. 21). A 48 h, nelle stesse condizioni sperimentali, l'aggiunta di LiCl non modificava in modo significativo l'espressione della forma attiva di GSK3 β

rispetto a TMA/BL. Parallelamente, a 48 h aumentava la β -catenina nucleare rispetto ai trattati con TMA/BL (Fig. 16); nelle colture corrispondenti era ben visibile un incremento diffuso della immunoreattività, specialmente a livello nucleare, rispetto alle colture esposte a TMA/BL (Fig. 17).

Infine, è stato verificato se l'attivazione di GSK3 β potesse essere una conseguenza della modulazione, da parte di TMA, di altre vie di segnale che risultano spesso sovraattivate nelle cellule tumorali, quali quelle delle MAPK.

A 24 e 48 h, non si riscontravano variazioni significative nell'espressione della forma fosforilata di Akt (dati non mostrati), mentre si osservava una diminuzione significativa della forma attivata di ERK1/2 in seguito a trattamento con TMA/BL (Fig. 22). In quest'ultimo caso, a 48 h si riscontrava una modulazione negativa anche con la sola TMA senza irradiazione. Aumenti significativi della forma fosforilata di p38 venivano rilevati con TMA/BL solamente a 48 h dal trattamento.

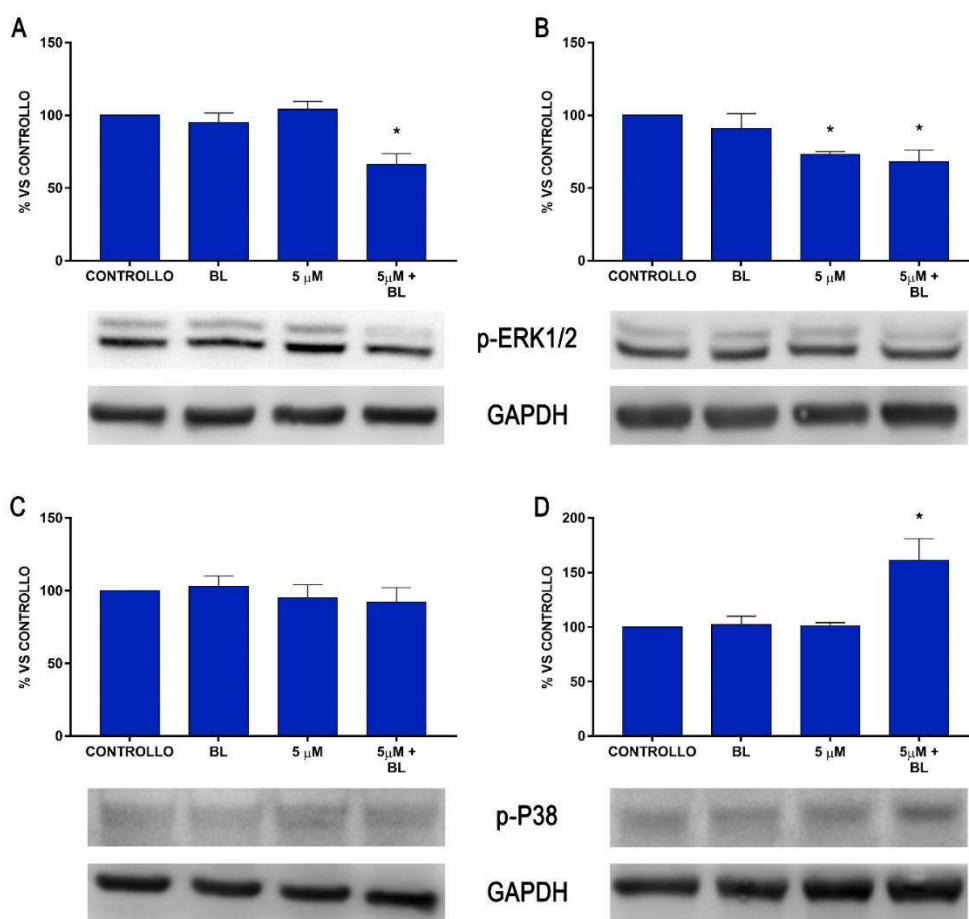


Figura 22. Espressione delle forme fosforilate di ERK1/2 (A e B) e di p38 (C e D) dopo 24 (A e C) e 48 (B e D) h dal trattamento con TMA e BL. La quantificazione dei livelli di espressione proteica è stata effettuata tramite analisi densitometrica utilizzando il software ImageJ e i risultati espressi come percentuale rispetto alle colture di controllo * = p<0.05 verso colture non trattate, Student's t test.

5. DISCUSSIONE

Gli psoraleni sono ad oggi usati in combinazione con luce UVA (terapia PUVA) per la cura di diverse patologie cutanee e anche per alcune malattie immunitarie grazie alla fotoferesi. Queste molecole posseggono una ben nota capacità antiproliferativa data dalla capacità di legarsi al DNA, una volta fotoattivati, formando legami covalenti con le basi pirimidiniche dell'acido nucleico, in particolar modo con le timine. Le addizioni possono avvenire all'interno di un singolo filamento (MA) o interessare due basi situate su filamenti complementari (XL). Inoltre, questi composti sono in grado di interagire e di fotolegarsi anche con i lipidi di membrana e proteine extra- ed intra-cellulari, anche a livello mitocondriale, danneggiando le strutture e portando all'attivazione del processo apoptotico (Dall'Acqua e Martelli, 1991; Canton et al., 2002).

Negli anni, nel tentativo di aumentare l'attività e l'efficacia degli psoraleni, evitando al contempo gravi effetti collaterali dovuti principalmente alla formazione di XL tra i filamenti di DNA, sono stati sintetizzati numerosi derivati monofunzionali. Tra questi, l'angelicina TMA, un isomero angolare, ha dimostrato buone capacità antiproliferative dopo attivazione con UVA e una ridotta genotossicità rispetto ad 8-MOP (Cristofolini et al., 1990; Bordin et al., 1991).

L'attività di psoraleni ed angelicine, in seguito ad irradiazione, origina dalla loro ampia struttura aromatica che ne aumenta la capacità di assorbire la radiazione UVA portandole ad uno stato eccitato dal quale poi si formano i legami covalenti con altre molecole. Sebbene il picco di maggior assorbimento di queste molecole si trovi nella regione dell'ultravioletto (320 nm), il loro spettro dimostra la capacità di captare anche la radiazione luminosa di lunghezza d'onda maggiore (BL), nonostante il basso coefficiente di estinzione molare a 420 nm (Gasparro et al., 1993).

Le evidenze sperimentali raccolte in questa tesi dimostrano che BL è in grado di attivare sia 8-MOP che TMA, nonostante le loro basse ϵ a queste lunghezze d'onda, traducendosi in una buona capacità antiproliferativa.

L'utilizzo di BL può aprire scenari interessanti per il trattamento locale di tumori, quali il carcinoma prostatico e quello vescicale, in quanto questa radiazione luminosa è meno tossica rispetto alla luce UVA, con un rischio di induzione di lesioni mutageniche sensibilmente minore, e possiede una maggiore capacità di penetrazione tissutale, permettendo di raggiungere punti situati più in profondità nei tessuti e riducendo gli effetti collaterali a carico delle cellule sane (Bjelland e Seeberg, 2003).

La fotoattivazione con BL dei due composti induceva una diminuzione quantitativa e una variazione qualitativa del tipo di lesioni a carico del DNA. Esperimenti condotti sull'acido nucleico isolato hanno confermato che 8-MOP e TMA erano in grado di formare MA e XL, produrre tagli ai filamenti e fotoossidare le basi dell'acido nucleico quando attivate da UVA. L'entità di queste lesioni risultava invece notevolmente ridotta, se non del tutto assente nel caso della TMA, quando l'attivazione delle molecole veniva effettuata tramite irradiazione con BL. A 2 J/cm^2 , dose utilizzata negli esperimenti effettuati sulle colture cellulari, 8-MOP formava una quantità di XL difficilmente rilevabile, mentre con UVA la formazione di queste lesioni era evidente a tutte le dosi di irradiazione utilizzate. TMA era in grado di formare una piccola quantità di XL quando irradiata da UVA, mentre, in seguito ad attivazione con BL, si formavano solamente MA; i tagli e le ossidazioni delle basi pirimidiniche riscontrati nei campioni trattati con la sostanza e UVA risultavano assenti in quelli trattati con BL.

Gli esperimenti effettuati sulle cellule DU145 hanno evidenziato che 8-MOP e TMA possedevano attività antiproliferativa, sia quando attivate da UVA che da BL, tramite l'induzione del processo apoptotico. Tuttavia, la concentrazione di composto richiesta per la completa inibizione della formazione di sferoidi cellulari era più elevata (circa 60 volte per 8-MOP e 100 per TMA) quando la fotoattivazione veniva effettuata con BL rispetto a UVA. Questa differenza può essere conseguente, almeno in parte, al diverso tipo e alla diversa entità di lesioni al DNA generatesi in base alla tipologia di irradiazione utilizzata. Inoltre, anche la produzione di ROS, i cui danni ossidativi sono comparabili ai tagli ai filamenti di DNA nel minare la vitalità cellulare (Cadet et al., 1993; Wallace, 2002), risultava minore nei campioni cellulari trattati con le sostanze esposte a BL.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una maggiore attività di TMA rispetto a 8-MOP in entrambe le condizioni di fotoattivazione. Infatti, l'angelicina inibiva completamente la formazione delle sfere a concentrazioni pari a $0.05 \mu\text{M}$ e $5 \mu\text{M}$ con UVA e BL, rispettivamente; $0.5 \mu\text{M}$ 8-MOP, invece, induceva un effetto simile con UVA, mentre con BL $30 \mu\text{M}$ 8-MOP provocava solo una riduzione di circa il 70% rispetto alle colture non trattate.

L'effetto antiproliferativo sulle cellule DU145 esercitato da 8-MOP e TMA fotoattivati da UVA o BL era legato alla modulazione dello stato di attivazione di p38 ed ERK1/2, MAPK implicate nei processi di vitalità cellulare, espressione genica e apoptosi. p38 modula i checkpoint del ciclo cellulare, l'apoptosi e l'autofagia in seguito ad attivazione tramite diversi stimoli intracellulari come lo stress ossidativo e la radiazione UV (Cuadrado e Nebreda, 2010).

In particolare, è stato evidenziato che 8-MOP regolava in modo differente queste due proteine in base al tipo di radiazione utilizzata, mentre con TMA la loro modulazione è simile in entrambe le condizioni.

8-MOP induceva un aumento della forma fosforilata di p38 solo in seguito a fotoattivazione con UVA, senza esercitare alcun effetto su ERK1/2. Questa evidenza concorda con Cappellini e colleghi (2005) che hanno dimostrato come la terapia PUVA inducesse la fosforilazione di p38, ma non di ERK1/2, nelle cellule Jurkat e nei linfociti T umani. Al contrario, la fotoattivazione di 8-MOP con BL aumentava la forma fosforilata di ERK1/2, lasciando invariato p38. Solitamente la via di segnale di ERK1/2, attivata da mitogeni e fattori di crescita, sostiene un effetto antiapoptotico, grazie alla regolazione negativa di fattori proapoptotici e/o all'attivazione di quelli antiapoptotici (Lu et al., 2006). Tuttavia, in alcuni casi, può agire in modo proapoptotico a seconda dei tipi di cellule e sotto stimoli specifici, quali ad esempio danni al DNA e alcune molecole antitumorali. Ad esempio, Li e collaboratori (2016) hanno riportato che l'angelicina, una furocumarina angolare, inibiva la crescita cellulare tramite l'attivazione della via di segnale di ERK senza alcun effetto sulla fosforilazione di p38. Inoltre, è stato dimostrato che l'attivazione di ERK1/2 può portare a tossicità nelle cellule neuronali e la sua inibizione riduce l'apoptosi indotta da adriamicina e composti del platino (Scuteri et al., 2010).

TMA aumentava la forma fosforilata di p38 e diminuiva quella di ERK1/2 con entrambe le radiazioni utilizzate. Questo dato suggerisce una regolazione indiretta di ERK1/2 da parte di p38 come già osservato in fibroblasti di origine umana, dove l'inibizione di p38 bloccava la defosforilazione di MEK1/2 e il processo apoptotico (Li et al., 2003). Una riduzione della forma attiva di ERK1/2 si è riscontrata anche nelle colture trattate con TMA ma non irradiate, suggerendo che il composto sia in grado di interagire con bersagli molecolari anche senza fotoattivazione. È già stato dimostrato, infatti, che alcune angelicine sono in grado di regolare l'espressione genica delle γ -globine umane senza irradiazione, suggerendo un loro possibile utilizzo in terapia per il trattamento di disordini ematologici come la beta talassemia e l'anemia falciforme (Lampronti et al., 2003). Inoltre, numerosi derivati hanno dimostrato buone proprietà antiinfiammatorie, utili nel trattamento della fibrosi cistica, inibendo l'interazione tra NF- κ B con il DNA. In particolare, TMA è un potente inibitore del processo infiammatorio indotto nelle cellule dell'epitelio bronchiale da *Pseudomonas Aeruginosa* e un efficace potenziatore di CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) (Marzaro et al., 2013; Favia et al., 2014). Il problema principale dei trattamenti con composti fotoattivabili in grado di interagire con il DNA è rappresentato dalla potenziale genotossicità associata. Quest'ultima può

progredire in carcinogenesi se i danni all'acido nucleico, che non vengono eliminati dai meccanismi di riparazione, non si traducono nella morte della cellula e causano mutazioni. Per determinare la fotogenotossicità di 8-MOP e TMA è stato valutato il tasso di fosforilazione dell'istone H2AX. Gli istoni sono proteine basiche attorno a cui si avvolge il DNA degli organismi eucariotici per formare i nucleosomi, le unità fondamentali della cromatina. Le proteine istoniche sono quattro: H2A, H2B, H3 e H4 e contengono una grande quantità di aminoacidi a carica positiva, come lisine e arginine, con cui i gruppi fosfato del DNA, caricati negativamente, possono interagire. L'istone H2AX è una variante di H2A e possiede una regione carbossi-terminale più lunga di quest'ultimo. In ogni nucleosoma sono presenti due istoni H2A e la variante H2AX è presente in percentuale variabile da circa 10% a 20% a seconda dell'origine tissutale delle cellule (Ibuki e Toyooka, 2014). H2AX presenta la peculiarità di venire fosforilata all'altezza della serina in posizione 139 in seguito a radiazioni ionizzanti o ad altri agenti che possono provocare rotture al doppio filamento dell'acido nucleico. Questo evento avviene anche in seguito ad altri danni al DNA, quali ossidazione delle basi, formazione di MA e XL e rotture di un singolo filamento.

La valutazione del livello di fosforilazione dell'istone H2AX sia nelle cellule DU145 che in quelle T24, suggerisce che TMA, al contrario di 8-MOP, non esercita effetti genotossici quando fotoattivata sia da UVA che da BL. Infatti, lo stato di fosforilazione dell'istone non veniva modificato dal trattamento con TMA, mentre veniva aumentato in modo significativo rispetto al controllo da 8-MOP, in accordo con quanto già evidenziato da Toyooka e colleghi (2011). Le differenze riscontrate tra le due sostanze correlano con l'entità e la tipologia di danno che le molecole sono in grado di indurre nel DNA isolato e che, probabilmente, si verificano anche nelle cellule alle condizioni testate.

Alla luce degli incoraggianti risultati ottenuti con la combinazione TMA e BL in termini di attività antiproliferativa e di mancanza di genotossicità, è stata indagata la possibilità di utilizzare l'associazione TMA/BL per il trattamento del carcinoma vescicale non invasivo. Anche questa tipologia di tumore potrebbe beneficiare di un trattamento endocavitario con PDT vista la ridotta invasività del metodo, data da fibre ottiche sempre più sottili e performanti, e la minima tossicità dei composti e della radiazione utilizzati.

Al pari di quanto precedentemente osservato, anche nelle cellule T24 il trattamento combinato TMA/BL non induceva effetti genotossici. Infatti, i livelli di fosforilazione dell'istone H2AX rimanevano invariati nei campioni sottoposti a trattamento rispetto a quelli rilevati nei controlli. TMA era, inoltre, in grado di ridurre la proliferazione cellulare e attivare il processo apoptotico. Lo studio di vitalità ha evidenziato come 5 μ M TMA

riducesse la vitalità cellulare del 50% sia a 24 che a 48 h dal trattamento. Alla medesima concentrazione il trattamento aumentava la percentuale di cellule apoptotiche sia a 24 che a 48 h e provocava un lieve aumento di cellule necrotiche a 48 h.

TMA era, inoltre, in grado di inibire la via canonica di Wnt. Infatti, come già evidenziato nelle cellule DU145, si osservava una diminuzione significativa dei livelli nucleari della β -catenina. Parallelamente, nelle cellule T24, si rilevava un aumento nel citoplasma delle forme fosforilate della β -catenina e del GSK3 β alla tirosina 216, sia a 24 che a 48 h dal trattamento. La β -catenina, oltre ad avere un ruolo nell'adesione cellulare partecipando al complesso con le caderine, agisce anche come trasduttore intracellulare della via di segnale canonica di Wnt, regolando lo sviluppo embrionale, l'omeostasi tissutale e la proliferazione sia nelle cellule staminali normali che in quelle tumorali. La traslocazione nel nucleo avviene in seguito al legame tra le proteine Wnt e il loro recettore Frizzled (Fz) associato al corecettore LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6), la cui attivazione comporta l'inibizione della degradazione citoplasmatica della β -catenina. La mancata regolazione di questa via di segnale è stata associata con numerose tipologie di tumori, compreso quello alla prostata (Kypta e Waxman, 2012).

GSK3 è un enzima coinvolto in una moltitudine di processi cellulari come il metabolismo del glicogeno, la via di segnale dell'insulina, la proliferazione cellulare, funzioni neurologiche e l'oncogenesi e lo sviluppo embrionale; risulta costitutivamente attivato e la sua regolazione avviene tramite fosforilazioni ai residui serinici e treoninici nella parte N-terminale e in quelli tirosinici nella C-terminale. Questo enzima è presente in due isoforme, α e β , codificate da due geni diversi ed aventi funzioni e ruoli differenti (Rayasam et al., 2009). GSK3 β svolge un ruolo molto importante a livello della via canonica di Wnt in quanto regola i livelli citoplasmatici di β -catenina; la chinasi, infatti, fa parte del complesso di distruzione insieme ad axina e APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). A livello di questo complesso proteico GSK3 β è deputato alla fosforilazione di β -catenina la quale, in seguito ad ubiquitinizzazione, viene distrutta. La regolazione dell'attività di GSK3 β avviene tramite fosforilazione su due siti differenti: l'enzima risulta maggiormente attivo quando fosforilato alla sua tirosina in posizione 216, mentre la sua attività viene ridotta in seguito a fosforilazione alla serina in posizione 9 (Doble e Woodgett, 2003).

L'inibizione della via canonica di Wnt indotta da TMA/BL si traduceva, inoltre, in una diminuzione dell'espressione di alcuni geni target della via. Infatti, è stata evidenziata una riduzione dei livelli di β -catenina, ciclina D1, c-Myc e CD44 nella sua variante v6

nei campioni trattati; diminuzioni significative si sono riscontrate anche nelle colture incubate con TMA mantenuta al buio nel caso di β -catenina, c-Myc e CD44v6.

La regolazione del ciclo cellulare da parte di ciclina D1 risulta finemente regolata dalla via di segnale di GSK3 β e da quella canonica di Wnt. Elevati livelli di questa proteina si registrano in numerosi tumori dove si comporta come protooncogene facilitando proliferazione e progressione del ciclo cellulare e promuovendo la trascrizione di numerosi fattori favorevoli alla trasformazione neoplastica (Zhang et al., 2012). Anche l'espressione dell'oncogene c-Myc è strettamente legata alla via Wnt in quanto i livelli di espressione di questa proteina sono regolati dall'inibizione di GSK3 β da parte delle vie di segnale attive di ERK1/2 e PI3K/Akt (Li et al., 2015). Nelle cellule T24 è stata rilevata una diminuzione della forma fosforilata di ERK1/2 e nessuna variazione di quella di Akt, suggerendo che l'inibizione di GSK3 β possa essere legata alla modulazione di ERK1/2.

CD44 è una glicoproteina transmembrana, ampiamente espressa nelle cellule di mammiferi; possiede un ruolo importante nell'adesione, nella migrazione e nella proliferazione cellulare principalmente attraverso vie di segnale attivate dalla sua interazione con l'acido ialuronico della matrice extracellulare o tramite legame con un'altra molecola di CD44. Numerose evidenze hanno dimostrato che CD44 è sovraespresso in numerosi tipi di cancro dove è stato identificato, da solo o in combinazione con altre molecole, come un marcatore delle cellule staminali tumorali (CSC). Le CSC sono responsabili dell'insorgenza del tumore, della sua progressione, invasione, metastatizzazione, recidività e resistenza alla chemio e radioterapia a causa del loro elevato livello di espressione di pompe di efflusso, la continua attivazione di vie di segnale antiapoptotiche e di meccanismi di riparazione del DNA (Jordan et al., 2015; Yan et al., 2015). Ciò è vero anche nel caso del tumore prostatico e di quello vescicale, dove i livelli di espressione di CD44 sono positivamente correlati allo stadio della patologia e possono essere usati per monitorare la risposta terapeutica al trattamento. Numerosi studi hanno anche confermato che CD44 stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule tumorali prostatiche (Korski et al., 2014; Li et al., 2017). In particolare, la variante di CD44 contenente l'esone 10, nota anche come CD44v6 è strettamente associata ad un comportamento aggressivo e correlata con una prognosi sfavorevole in una varietà di tumori maligni umani, quali la leucemia e i carcinomi mammario, gastrico, coloretale e prostatico; si è dimostrata in grado di regolare la trasformazione maligna inducendo la proliferazione, l'adesione e la migrazione delle cellule tumorali. Nel tumore alla prostata, inoltre, è stato evidenziato che la diminuita espressione di questo marcatore sia connessa alla ridotta attività delle vie di segnale Wnt/ β -catenina e PI3K/Akt (Ni et al., 2014).

La fotoattivazione di TMA induceva una riduzione dei livelli di espressione della proteina CD44 in entrambe le linee cellulari. Nelle cellule DU145 questa tendenza era riscontrabile sia in seguito ad irradiazione con UVA che con BL con maggiore efficacia nel caso di quest'ultima (35.5% e 12.8% di cellule positive, rispettivamente). Inoltre, una piccola ma significativa riduzione è stata rilevata anche nei campioni trattati con 5 μ M TMA al buio. La riduzione della percentuale di cellule CD44⁺ riscontrata anche nei campioni trattati con TMA non irradiata potrebbe essere legata alla riduzione della forma attivata di ERK1/2 in quanto, come già dimostrato, queste MAPK sono responsabili anche della regolazione dell'espressione della glicoproteina (Roeder et al., 2017). Seppur in misura nettamente inferiore, anche 8-MOP si dimostrava in grado di indurre una riduzione di cellule CD44⁺ sia quando attivato da UVA (25%) che da BL (11%). Come riscontrato nella linea cellulare prostatica, anche in quella vescicale il trattamento TMA/BL induceva una diminuzione della percentuale di cellule CD44⁺, più marcata a 48 (40%) rispetto alle 24 h (9%).

I risultati ottenuti suggeriscono, quindi, che TMA e in minor misura 8-MOP siano in grado di colpire anche la componente staminale del tumore e di renderla più vulnerabile ai ROS, favorendo l'eradicazione del tumore. È stato dimostrato infatti che CD44 è coinvolto anche nella protezione delle CSC dagli effetti citotossici indotti da ROS tramite la sintesi di glutazione (Ishimoto et al., 2011).

I risultati raccolti concordano con numerose evidenze attestanti una stretta connessione tra CD44 e la via di segnale di Wnt. CD44 è non solo un gene bersaglio della via canonica di Wnt ma anche un regolatore positivo della stessa attraverso l'interazione con LRP6 e il riarrangiamento del citoscheletro. Ad oggi, la relazione CD44/Wnt è stata studiata in numerosi tumori evidenziando come il silenziamento di CD44 porti ad un'inibizione della traslocazione di β -catenina a livello nucleare (Chang et al., 2013; Schmitt et al., 2015). Tuttavia, TMA non sembra in grado di legarsi in modo covalente al recettore CD44. Infatti, studi sul docking della molecola con la glicoproteina hanno evidenziato come questa, sebbene sia in grado di interagire in più punti con CD44, in virtù della sua lipofilità e delle sue ridotte dimensioni, non riesca a formare con il recettore alcun tipo di legame. Quest'ultimo riscontro fa supporre, quindi, che la riduzione di cellule CD44⁺ e la diminuzione della traslocazione nucleare di β -catenina sia dovuta ad una inibizione della via canonica di Wnt e non conseguente ad una interazione diretta tra TMA e CD44.

L'aumentata attivazione di GSK3 β come evento responsabile, almeno in parte, dell'inibizione della via di Wnt è stata confermata dagli esperimenti effettuati con LiCl. Quest'ultimo è un ben noto attivatore della via canonica di Wnt grazie alla sua capacità di inibire GSK3 β legandolo in modo diretto, competendo per il sito di legame

del Mg^{2+} e favorendone la fosforilazione in serina 9, responsabile del suo stato meno attivo (Beurel et al., 2015). La conseguente inibizione porta alla mancata fosforilazione di β -catenina ed al suo accumulo a livello citoplasmatico, favorendone l'ingresso a livello del nucleo e la trascrizione dei geni bersaglio. I dati raccolti hanno evidenziato che l'aggiunta di LiCl alle colture cellulari esposte al trattamento con TMA/BL induceva un recupero della vitalità sebbene non ai livelli dei controlli sia a 24 che a 48 h. Inoltre, nelle colture incubate con solo LiCl si registrava un aumento di proliferazione cellulare rispetto alle colture di controllo sia a 24 che a 48 h dovuto all'attivazione della via di Wnt da parte del sale. Inoltre, l'aggiunta di LiCl ripristinava i livelli di CD44 ai valori delle colture di controllo solamente a 24 h e quelli di β -catenina nucleare a 48 h. Parallelamente, sono state rilevate variazioni significative, rispetto a quanto registrato nei campioni trattati con TMA/BL, nella fosforilazione di GSK3 β e β -catenina; infatti, l'aggiunta di LiCl nel terreno di coltura era in grado di ridurre l'entità di fosforilazione di queste proteine riportandola a livelli molto simili a quelli registrati nelle colture di controllo.

Analogamente a quanto rilevato nelle cellule DU145, TMA/BL diminuiva in modo significativo lo stato di attivazione di ERK1/2 e aumentava la forma fosforilata di p38 a 48 h quando sottoposta ad irradiazione con BL. GSK3 β rappresenta un punto in comune tra le vie PI3K/Akt, MEK/ERK e p38 in quanto tutte ne modulano l'attività in base agli stimoli ricevuti. È stato dimostrato che GSK3 β è un substrato di Akt, la cui forma attiva può fosforilarlo e inattivarlo, con accumulo di β -catenina e induzione della crescita cellulare (Huang e He, 2008) e che ERK1/2 attivata lo inibisce portando sempre ad un aumento nucleare di β -catenina (Ding et al., 2005; Caraci et al., 2008). I risultati raccolti sembrano quindi indicare che nelle cellule T24 TMA moduli l'espressione di β -catenina e l'azione della via Wnt in modo indipendente da Akt e parzialmente dipendente da ERK 1/2 modulando l'attività di GSK3 β .

6. CONCLUSIONI

I dati raccolti in questa tesi hanno evidenziato che, nonostante i loro bassi coefficienti di estinzione molare nel campo della luce visibile, 8-MOP e TMA sono in grado di inibire efficacemente la proliferazione cellulare tramite induzione del processo apoptotico e formazione di ROS anche in seguito ad irradiazione con BL. Questa modalità di fotoattivazione può rappresentare una innovazione nel campo della fotochemioterapia in quanto va a migliorarne i più comuni limiti operativi ed effetti collaterali riscontrati con l'utilizzo di UVA. BL, infatti, a differenza della radiazione UVA, possiede una migliore penetrazione a livello dei tessuti, permettendo quindi il potenziale trattamento di tumori più invasivi, e al contempo presenta una minore, se non assente, genotossicità. Inoltre, a livello tecnico, è noto che le fibre ottiche usate in PDT hanno un migliore rendimento quando trasportano BL rispetto ad UVA per quanto riguarda diffusione della luce e quantità di radiazione trasmessa.

TMA si è dimostrata più efficace di 8-MOP sia quando attivata da UVA che da BL. Nonostante fossero necessarie concentrazioni di TMA più elevate di quelle utilizzate con UVA per ottenere lo stesso effetto biologico, è importante ricordare che, come suggerito dai test su DNA isolato, con BL il composto non era in grado di formare legami crociati, principali responsabili dell'azione mutagenica delle furocumarine, suggerendo, quindi, un profilo di sicurezza migliore. Questa ipotesi è stata confermata dall'assenza della forma fosforilata dell'istone H2AX nei campioni trattati con TMA, rispetto a quelli incubati con 8-MOP. Questo differente comportamento potrebbe essere spiegato dal diverso tipo e dalla diversa entità di danni al DNA che le due molecole sono in grado di formare. Alle dosi di radiazione utilizzate, infatti, 8-MOP era comunque in grado di formare legami crociati e di produrre tagli al DNA.

L'effetto antiproliferativo di TMA era legato ad una modulazione negativa della via canonica di Wnt risultante dall'attivazione di GSK3 β . I dati raccolti suggeriscono che quest'ultimo effetto possa essere dovuto alla diminuzione della forma fosforilata di ERK1/2. Inoltre, la riduzione dell'espressione del marcatore tumorale CD44 è risultata essere indotta dalla modulazione della via Wnt e non da una diretta interazione di TMA con la glicoproteina, come dimostrato dagli studi sul docking.

In conclusione, TMA fotoattivata da BL può rappresentare un interessante opzione per la fotochemioterapia dei carcinomi prostatico e vescicale non invasivo, in quanto tale trattamento è in grado di inibire vie chiave per la crescita e la progressione tumorale in assenza di effetti genotossici.

In prospettiva, si intende valutare se il trattamento con TMA possa essere associato alla PDT effettuata con porfirine e attualmente in uso nella pratica clinica. Infatti, l'effetto antitumorale di queste ultime è conseguente ad un'ingente produzione di ROS che, tuttavia, spesso porta a resistenza alla terapia. L'associazione con altre molecole, quali la TMA, aventi altri meccanismi di azione e attivabili alle stesse lunghezze d'onda usate nella PDT, potrebbe aumentare l'efficacia del trattamento tramite un effetto sinergico, diminuendo le dosi di farmaco ed evitando il fenomeno della resistenza.

7. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la Prof.ssa Giorgia Miolo per il supporto e l'auto nello svolgimento degli esperimenti condotti su DNA isolato, la Prof.ssa Adriana Chilin per aver sintetizzato e fornito la TMA per la sperimentazione e il Prof. Giovanni Marzaro per la guida nello svolgimento dello studio di docking.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Naser MB, Krasagakis K, Garbe C, Eberle J. Direct effects on proliferation, antigen expression and melanin synthesis of cultured normal human melanocytes in response to UVB and UVA light. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003, 19 (3): 122-7.
- Abufaraj M, Gust K, Moschini M, Foerster B, Soria F, Mathieu R, Shariat SF. Management of muscle invasive, locally advanced and metastatic urothelial carcinoma of the bladder: a literature review with emphasis on the role of surgery. *Transl Androl Urol*. 2016 Oct;5(5):735-744.
- Alfred A, Taylor PC, Dignan F, El-Ghariani K, Griffin J, Gennery AR, Bonney D, Das-Gupta E, Lawson S, Malladi RK, Douglas KW, Maher T, Guest J, Hartlett L, Fisher AJ, Child F, Scarisbrick JJ. The role of extracorporeal photopheresis in the management of cutaneous T-cell lymphoma, graft-versus-host disease and organ transplant rejection: a consensus statement update from the UK Photopheresis Society. *Br J Haematol*. 2017 Apr;177(2):287-310.
- Amaro A, Esposito AI, Gallina A, Nees M, Angelini G, Albini A, Pfeffer U. Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: a long road to travel. *Cancer Metastasis Rev*. 2014 Sep;33(2-3):657-71.
- Arumainayagam N, Moore CM, Ahmed HU, Emberton M. Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate. *World J Urol*. 2010 Oct;28(5):571-6.
- Aubin F, Humbey O, Humbert P, Laurent R, Mouglin C. Melanoma: role of ultraviolet radiation: from physiology to pathology. *Presse Med*. 2001, 24; 30 (11): 546-51.
- Bader MJ, Stepp H, Beyer W, Pongratz T, Sroka R, Kriegmair M, Zaak D, WelschofM, Tilki D, Stief CG, Waidelich R. Photodynamic therapy of bladder cancer - a phase I study using hexaminolevulinate (HAL). *Urol Oncol*. 2012 Oct;31(7):1178-83
- Bahn DK, Lee F, Badalament R, Kumar A, Greski J, Chernick M. "Targeted cryoablation of the prostate: 7-year outcomes in the primary treatment of prostate cancer" *Urology* 2002 Aug;60(2 Suppl 1):3-11

- Becker MN, Sauer MS, Muhlebach MS, Hirsh AJ, Wu Q, Verghese MW, Randell SH. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Mar 1;169(5):645-53.
- Benov L. Photodynamic therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract*. 2015;24 Suppl 1:14-28.
- Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015 Apr;148:114-31.
- Bichai F, Léveillé S, Barbeau B. Comparison of the role of attachment, aggregation and internalisation of microorganisms in UVC and UVA (solar) disinfection. *Water Sci Technol*. 2011, 63 (9): 1823-31.
- Bissonnette L, Arnason JT, Smith ML. Real-time fluorescence-based detection of furanocoumarin photoadducts of DNA. *Phytochem Anal*. 2008 Jul-Aug;19(4):342-7
- Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res*. 2003 Oct 29;531(1-2):37-80.
- Bordin F, Dall'Acqua F, Guiotto A. Angelicins, angular analogs of psoralens: chemistry, photochemical, photobiological and phototherapeutic properties. *Pharmacol Ther*. 1991, 52 (3): 331-63.
- Borgatti M, Chilin A, Piccagli L, Lampronti I, Bianchi N, Mancini I, Marzaro G, dall'Acqua F, Guiotto A, Gambari R. Development of a novel furocoumarin derivative inhibiting NF- κ B dependent biological functions: design, synthesis and biological effects. *Eur J Med Chem*. 2011 Oct;46(10):4870-7
- Bracarda S, de Cobelli O, Greco C, Prayer-Galetti T, Valdagni R, Gatta G, de Braud F, Bartsch G. Cancer of the prostate. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Dec;56(3):379-96. Review.
- Butt SU, Malik L. Role of immunotherapy in bladder cancer: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018 Jan 24.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1997;131:1-87.
- Cadet J, Vigny P, Midden WR. Photoreactions of furocoumarins with biomolecules. *J Photochem Photobiol B*. 1990 Jun;6(1-2):197-206. Review. PubMed

- Cadet J, Wagner JR. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Feb 1;5(2). pii: a012559.
- Canton M, Caffieri S, Dall'Acqua F, Di Lisa F. PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore. *FEBS Lett.* 2002 Jul 3;522(1-3):168-72.
- Cappellini A, Tazzari PL, Mantovani I, Billi AM, Tassi C, Ricci F, Conte R, Martelli AM. Antiapoptotic role of p38 mitogen activated protein kinase in Jurkat T cells and normal human T lymphocytes treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet-A radiation. *Apoptosis.* 2005 Jan;10(1):141-52.
- Caraci F, Gili E, Calafiore M, Failla M, La Rosa C, Crimi N, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A, Vancheri C. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacol Res.* 2008 Apr;57(4):274-82
- Cavanagh H, Rogers KM. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. *Hered Cancer Clin Pract.* 2015 Aug 1;13(1):16.
- Chang G, Zhang H, Wang J, Zhang Y, Xu H, Wang C, Zhang H, Ma L, Li Q, Pang T. CD44 targets Wnt/ β -catenin pathway to mediate the proliferation of K562 cells. *Cancer Cell Int.* 2013 Nov 20;13(1):117.
- Chemotherapy in Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2015 Oct;17(10):44.
- Chen X, Kagan J, Miolo G, Dall'Acqua F, Averbeck D, Bisagni E. Photosensitized cross-linking and cleavage of pBR322 and M13 DNA: comparison of 4,4',6-trimethylangelicin and 3-carbethoxypsoralen. *J Photochem Photobiol B.* 1994 Jan;22(1):51-7.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, and Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005, 65 (23): 10946-51.
- Cristofolini M, Recchia G, Boi S, Pisciole F, Bordin F, Baccichetti F, Carlassare F, Tamaro M, Pani B, Baburdi N, et al. 6-Methylangelicins: new monofunctional photochemotherapeutic agents for psoriasis. *Br J Dermatol.* 1990 Apr;122(4):513-24.

- Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010 Aug 1;429(3):403-17.
- D. Kanne, H. Rapoport and J. E. Hearst, 8-Methoxypsoralen-nucleic acid photoreaction. Effect of methyl substitution on pyrone vs. furan photoaddition, *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 531–534.
- Dalla Via L, Gia O, Caffieri S, García-Argáez AN, Quezada E, Uriarte E. A novel tetrahydrobenzoangelicin with dark and photo biological activity. *Bioorg Med Chem.* 2012 Jun 1;20(11):3603-8.
- Dall'Acqua F, Martelli P. Photosensitizing action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events. *J Photochem Photobiol B.* 1991 Feb;8(3):235-54.
- Dall'Acqua F, Vedaldi D, Caffieri S, Guiotto A, Bordin F, Rodighiero G. Chemical basis of the photosensitizing activity of angelicins. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1984 Dec;66:55-60.
- Daniyal M, Siddiqui ZA, Akram M, Asif HM, Sultana S, Khan A. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(22):9575-8.
- Di Zazzo E, Galasso G, Giovannelli P, Di Donato M, Di Santi A, Cerneria G, Rossi V, Abbondanza C, Moncharmont B, Sinisi AA, Castoria G, Migliaccio A. Prostate cancer stem cells: the role of androgen and estrogen receptors. *Oncotarget.* 2016 Jan 5;7(1):193-208.
- Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell.* 2005 Jul 22;19(2):159-70
- Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003 Apr 1;116(Pt 7):1175-86.
- Epstein JH. Phototoxicity and photoallergy. *Semin Cutan Med Surg.* 1999, 18 (4): 274-84.
- Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, and De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008, 15 (3): 504-14.

- Favia M, Mancini MT, Bezzerri V, Guerra L, Laselva O, Abbattiscianni AC, Debellis L, Reshkin SJ, Gambari R, Cabrini G, Casavola V. Trimethylangelicin promotes the functional rescue of mutant F508del CFTR protein in cystic fibrosis airway cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Jul 1;307(1):L48-61.
- Gandaglia G, Abdollah F, Schiffmann J, Trudeau V, Shariat SF, Kim SP, Perrotte P, Montorsi F, Briganti A, Trinh QD, Karakiewicz PI, Sun M. Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. *Prostate*. 2014 Feb;74(2):210-6.
- Gasparro FP, Gattolin P, Olack GA, Deckelbaum LI, Sumpio BE. The excitation of 8-methoxypsoralen with visible light: reversed phase HPLC quantitation of monoadducts and cross-links. *Photochem Photobiol*. 1993 Jun;57(6):1007-10.
- Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*. 2014 Oct;11(5):549-60.
- Gözen AS, Umari P, Scheitlin W, Su FE, Akin Y, Rassweiler J. Effectivity of intravesical thermo-chemotherapy prophylaxis for patients with high recurrence and progression risk for non-muscle invasive bladder cancer. *Arch Ital Urol Androl*. 2017 Jun 30;89(2):102-105
- Grozescu T, Popa F. "Prostate cancer between prognosis and adequate/proper Therapy" *J Med Life* 2017 Jan-Mar;10(1):5-12
- Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Apr;20(2):119-25
- Ibuki Y, Toyooka T. Evaluation of chemical phototoxicity, focusing on phosphorylated histone H2AX. *J Radiat Res*. 2015 Mar;56(2):220-8.
- Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Suematsu M, Baba H, Saya H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*. 2011 Mar 8;19(3):387-400.

- Jordan AR, Racine RR, Hennig MJ, Lokeshwar VB. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front Immunol.* 2015 Apr 21;6:182.
- Kavouras I, Gomez T, Chalbot MC. UVA and cutaneous melanoma incidences: spatial patterns and communities at risk. *J Environ Health.* 2015, 77 (9): 8-14.
- Kitamura N., Kothani S., Nakagaki R. Molecular aspects of furocoumarins reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. *J. Photochem. Photobiol.* 2005, 6(2-3): 168-185.
- Korski K, Malicka-Durczak A, Bręborowicz J. Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens. *Pol J Pathol.* 2014 Dec;65(4):291-5.
- Kotsakis A, Matikas A, Koinis F, Kentepozidis N, Varthalitis II, Karavassilis V, Samantas E, Katsaounis P, Dermitzaki EK, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulis V. A multicentre phase II trial of cabazitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer progressing after docetaxel-based chemotherapy. *Br J Cancer.* 2016 Sep 27;115(7):784-8.
- Kozma L., Hornyák I., Székelyhidi L., Spectrofluorimetric analytical investigation of psoralens on adsorbents, *J. of Luminescence*, 1991; 48:438-440
- Kurpad R, Woods M. Robot-assisted radical cystectomy. *J Surg Oncol.* 2015 Dec;112(7):728-35.
- Kypka RM, Waxman J. Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2012 Aug;9(8):418-28.
- Lampronti I, Bianchi N, Borgatti M, Fibach E, Prus E, Gambari R. Accumulation of gamma-globin mRNA in human erythroid cells treated with angelicin. *Eur J Haematol.* 2003 Sep;71(3):189-95.
- Laselva O, Molinski S, Casavola V, Bear CE. The investigational CysticFibrosis drug Trimethylangelicin directly modulates CFTR by stabilizing the firstmembrane-spanning domain. *Biochem Pharmacol.* 2016 Nov 1;119:85-92
- Lee RK, Abol-Enein H, Artibani W, Bochner B, Dalbagni G, Daneshmand S, Fradet Y, Hautmann RE, Lee CT, Lerner SP, Pycha A, Sievert KD, Stenzl A, Thalmann G, Shariat SF. Urinary diversion after radical cystectomy for bladder

cancer: options, patient selection, and outcomes. *BJU Int.* 2014 Jan;113(1):11-23

- Lepor H. A review of surgical techniques for radical prostatectomy. *Rev Urol.* 2005;7 Suppl 2:S11-7.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, and Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007, 67, 1030–1037.
- Li G, He Y, Yao J, Huang C, Song X, Deng Y, Xie S, Ren J, Jin M, Liu H. Angelicin inhibits human lung carcinoma A549 cell growth and migration through regulating JNK and ERK pathways. *Oncol Rep.* 2016 Dec;36(6):3504-3512.
- Li SP, Junttila MR, Han J, Kähäri VM, Westermarck J. p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1,2. *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3473-7.
- Li W, Qian L, Lin J, Huang G, Hao N, Wei X, Wang W, Liang J. CD44 regulates prostate cancer proliferation, invasion and migration via PDK1 and PFKFB4. *Oncotarget.* 2017 May 11;8(39)Roeder SS, Barnes TJ, Lee JS, Kato I, Eng DG, Kaverina NV, Sunseri MW, Daniel
- Li X, Zhang XA, Li X, Xie W, Huang S. MYC-mediated synthetic lethality for treating tumors. *Curr Cancer Drug Targets.* 2015;15(2):99-115.
- Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life.* 2006 Nov;58(11):621-31.
- Ma JL, Hennessey DB, Newell BP, Bolton DM, Lawrentschuk N. Radiotherapy-related complications presenting to a urology department - a more common problem than previously thought? *BJU Int.* 2018 Jan 23
- Mari A, D'Andrea D, Abufaraj M, Foerster B, Kimura S, Shariat SF. Genetic determinants for chemo- and radiotherapy resistance in bladder cancer. *Transl Androl Urol.* 2017 Dec;6(6):1081-1089
- Marzaro G, Guiotto A, Borgatti M, Finotti A, Gambari R, Breveglieri G, Chilin A. Psoralen derivatives as inhibitors of NF- κ B/DNA interaction: synthesis, molecular modeling, 3D-QSAR, and biological evaluation. *J Med Chem.* 2013 Mar 14;56(5):1830-42.

- Master A, Livingston M, Sen Gupta A. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges. *J Control Release*. 2013 May 28;168(1):88-102.
- Michl U, Tennstedt P, Feldmeier L, Mandel P, Oh SJ, Ahyai S, Budäus L, Chun FK, Haese A, Heinzer H, Salomon G, Schlomm T, Steuber T, Huland H, Graefen M, Tilki D. Nerve-sparing Surgery Technique, Not the Preservation of the Neurovascular Bundles, Leads to Improved Long-term Continence Rates After Radical Prostatectomy. *Eur Urol*. 2016 Apr;69(4):584-9.
- Mohiuddin JJ, Baker BR, Chen RC. Radiotherapy for high-risk prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2015 Mar;12(3):145-54.
- Ni J, Cozzi PJ, Hao JL, Beretov J, Chang L, Duan W, Shigdar S, Delprado WJ, Graham PH, Bucci J, Kearsley JH, Li Y. CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. *Prostate*. 2014 May;74(6):602-17.
- Nordlund JJ, Lerner AB. Vitiligo. It is important. *Arch Dermatol*. 1982, 118 (1): 5-8.
- Ohishi T, Koga F, Migita T. Bladder Cancer Stem-Like Cells: Their Origin and Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2015 Dec 29;17(1).
- Okoye E, Choi EK, Divatia M, Miles BJ, Ayala AG, Ro JY. De novo large cell neuroendocrine carcinoma of the prostate gland with pelvic lymph node metastasis: a case report with review of literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Dec 1;7(12):9061-6.
- Panno ML, Giordano F. Effects of psoralens as anti-tumoral agents in breast cancer cells. *World J Clin Oncol*. 2014, 10; 5 (3): 348-58.
- Pezaro C, Woo HH, Davis ID. Prostate cancer: measuring PSA. *Intern Med J*. 2014 May;44(5):433-40.
- Powles T, Necchi A, Rosen G, Hariharan S, Apolo AB. Anti-Programmed Cell Death 1/Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Antibodies for the Treatment of Urothelial Carcinoma: State of the Art and Future Development. *Clin Genitourin Cancer*. 2017 Dec 6. pii: S1558-7673(17)30362-2
- Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol*. 2009 Mar;156(6):885-98.

- Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006, 1 (3): 1458-61.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, and De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007, 445, 111–115.
- Roeder SS, Barnes TJ, Lee JS, Kato I, Eng DG, Kaverina NV, Sunseri MW, Daniel C, Amann K, Pippin JW, Shankland SJ. Activated ERK1/2 increases CD44 in glomerular parietal epithelial cells leading to matrix expansion. *Kidney Int.* 2017 Apr;91(4):896-913.
- Rove KO, Crawford ED, Perachino M, Morote J, Klotz L, Lange PH, Andriole GL, Matsumoto AM, Taneja SS, Eisenberger MA, Reis LO. Maximal testosterone suppression in prostate cancer-free vs total testosterone. *Urology.* 2014 Jun;83(6):1217-22.
- Salinas CA, Tsodikov A, Ishak-Howard M, Cooney KA. Prostate cancer in young men: an important clinical entity. *Nat Rev Urol.* 2014 Jun;11(6):317-23.
- Scaffidi JP, Gregas MK, Lauly B, Zhang Y, Vo-Dinh T. Activity of psoralen-functionalized nanoscintillators against cancer cells upon X-ray excitation. *ACS Nano.* 2011, 28; 5 (6): 4679-87.
- Schmitt M, Metzger M, Gradl D, Davidson G, Orian-Rousseau V. CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation. *Cell Death Differ.* 2015 Apr;22(4):677-89.
- Scuteri A, Galimberti A, Ravasi M, Pasini S, Donzelli E, Cavaletti G, Tredici G. NGF protects dorsal root ganglion neurons from oxaliplatin by modulating JNK/Sapk and ERK1/2. *Neurosci Lett.* 2010 Dec 17;486(3):141-5.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, and Dirks PB. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.* *Cancer Res.* 2003, 63 (18): 5821-8.
- Song PS, Tapley KJ Jr. Photochemistry and photobiology of psoralens. *Photochem Photobiol.* 1979 Jun;29(6):1177-97.
- Soria F, Moschini M, Korn S, Shariat SF. How to optimally manage elderly bladder cancer patients? *Transl Androl Urol.* 2016 Oct;5(5):683-691. Review

- Sternberg CN, Petrylak DP, Madan RA, Parker C. Progress in the treatment of advanced prostate cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2014:117-31.
- Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2015 Aug;23:32-8.
- Tabayoyong W, Abouassaly R. Prostate Cancer Screening and the Associated Controversy. *Surg Clin North Am*. 2015 Oct;95(5):1023-39.
- Toyooka T, Ishihama M, Ibuki Y. Phosphorylation of histone H2AX is a powerful tool for detecting chemical photogenotoxicity. *J Invest Dermatol*. 2011 Jun;131(6):1313-21.
- Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*. 2002 Jul 1;33(1):1-14.
- Warde P, Mason M, Ding K, Kirkbride P, Brundage M, Cowan R, Gospodarowicz M, Sanders K, Kostashuk E, Swanson G, Barber J, Hiltz A, Parmar MK, Sathya J, Anderson J, Hayter C, Hetherington J, Sydes MR, Parulekar W; NCIC CTG PR.3/MRC UK PR07 investigators. Combined androgen deprivation therapy and radiation therapy for locally advanced prostate cancer: a randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2011 Dec 17;378(9809):2104-11.
- Weiswald LB, Guinebretière JM, Richon S, Bellet D, Saubaméa B, Dangles-Marie V. In situ protein expression in tumour spheres: development of an immunostaining protocol for confocal microscopy. *BMC Cancer*. 2010, 22; 10: 106.
- Wu JZ, Situ ZQ, Wang W, Chen JY, Liu B. Antitumor activity of psoralen on mucoepidermoid carcinoma cell line MEC-1. *Chin Med J (Engl)*. 1992, 105 (11): 913-7.
- Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Sep;4(9):1033-43.
- Zapala P, Dybowski B, Poletajew S, Bialek Ł, Niewczas A, Radziszewski P. Clinical rationale and safety of restaging transurethral resection in indication-stratified patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Surg Oncol*. 2018 Jan 15;16(1):6
- Zelefsky MJ, Fuks Z, Hunt M, Lee HJ, Lombardi D, Ling CC, Reuter VE, Venkatraman ES, Leibel SA. High dose radiation delivered by intensity

modulated conformal radiotherapy improves the outcome of localized prostate cancer. *J Urol*. 2001 Sep;166(3):876-81.

- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem*. 2003 Aug 29;278(35):33067-77.
- Zhang J, Gill AJ, Issacs JD, Atmore B, Johns A, Delbridge LW, Lai R, McMullen TP. The Wnt/ β -catenin pathway drives increased cyclin D1 levels in lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *Hum Pathol*. 2012 Jul;43(7):1044-50.
- Zhang X, Zhang Y. Bladder Cancer and Genetic Mutations. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Sep;73(1):65-9

9. PUBBLICAZIONI

Durante il triennio di dottorato sono state prodotte due pubblicazioni su riviste internazionali e due poster presentati a congressi internazionali:

- Poster: Cigolini G, **Sturaro G**, Cola F, Conconi MT, Miolo G. Effectiveness of photoactivatable drugs on prostate cancer stem cells: a pilot study (Joint Congress of the French and Italian Photochemists and Photobiologists, Bari, 19 to 22 September 2016);
- **Sturaro G**, Cigolini G, Menilli L, Cola F, Di Liddo R, Tasso A, Conconi MT, Miolo G. Antiproliferative activity of 8-methoxypsoralen on DU145 prostate cancer cells under UVA and blue light. *Photochem Photobiol Sci.* 2017 Jul 1;16(7):1182-1193. DOI: 10.1039/c7pp00116a.
- Miolo G, **Sturaro G**, Cigolini G, Menilli L, Tasso A, Zago I, Conconi MT. 4,6,4'-trimethylangelicin shows high anti-proliferative activity on DU145 cells under both UVA and blue light. *Cell Prolif.* 2018 Apr;51(2):e12430. doi: 10.1111/cpr.12430. Epub 2018 Jan 10.
- Cover Image, Volume 51, Issue 2, *Cell Proliferation*, Wiley; Apr 2018. doi: 10.1111/cpr.12430.
- Poster: Miolo G, **Sturaro G**, Menilli L, Tasso A, Conconi MT; "PBL (Psoralens + Blue light): how blue light activates furocoumarin derivatives triggering tumor cell apoptosis" (ASP 2018 Biennial Meeting of the American Society for Photobiology, May 12th-15th, 2018, Tampa, Florida USA)



Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2017, **16**, 1182

Antiproliferative activity of 8-methoxypsoralen on DU145 prostate cancer cells under UVA and blue light

Giulio Sturaro,[†] Giulia Cigolini,[†] Luca Menilli, Fabio Cola, Rosa Di Liddo, Alessia Tasso, Maria Teresa Conconi[†] and Giorgia Miolo[†]

The use of photoactivatable 8-methoxypsoralen (8-MOP) as potential focal treatment towards prostate cancer cells is proposed here. Our results, obtained on isolated DNA and DU145 cells, indicate that blue light, besides UVA, is able to activate 8-MOP. When compared to UVA, blue light irradiation led to a modulation of the extent and the types of 8-MOP-DNA damage, specially cross-links, coupled to a still valuable antiproliferative effect. Our data suggest that the proapoptotic activity of 8-MOP is related not only to DNA damage and reactive oxygen species generation but also to the modulation of cell signalling pathways. In particular, a different activation of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases was detected depending on the light wavelengths.

Received 29th March 2017,
Accepted 28th May 2017

DOI: 10.1039/c7pp00116a

rsc.li/pps

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common non-cutaneous male malignancy and the second leading cause of cancer-related deaths in males. External beam radiotherapy, brachytherapy or radical prostatectomy are the main options for localized PCa. Chemotherapy is also used for patients with recurrent PCa after prostatectomy. However, recurrence and progression of disease occur in a high percentage of patients.¹ In the last few years, interstitial photodynamic therapy (PDT) has also been proposed for the treatment of recurrent PCa and has entered clinical trials.² PDT involves a photosensitizer that upon activation by visible light, leads to cell death through the production of reactive oxygen species (ROS).

Furocoumarins are natural and synthetic compounds whose structure consists of a furan ring fused with coumarin leading to several isomers, *i.e.* linear molecules, so called psoralens, and the angular ones, angelicins. 8-Methoxypsoralen (8-MOP), 5-methoxypsoralen (5-MOP) and 4,5,8-trimethylpsoralen (TMP) are commonly used with ultraviolet A (UVA) light in PUVA (psoralen plus UVA) therapy to treat a number of skin conditions, *i.e.* psoriasis, vitiligo, and cutaneous T-cell lymphoma (CTCL).³ Another application is extracorporeal photopheresis (ECP), which involves exposure of white blood

cells to UVA with 8-MOP, for the treatment of autoimmune disorders, such as variants of cutaneous T cell lymphomas, graft-versus-host disease, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis and Crohn's disease.⁴ Furthermore, linear furocoumarins have been used for sterilising blood components under UV irradiation⁵ and some of them are also active without light activation, showing some activity against psychological depression.

As the photosensitizers used in PDT, furocoumarins produce ROS, singlet oxygen (¹O₂) or superoxide (O₂⁻), that impair cellular functions through lipid peroxidation, oxidation of guanine, strand breaks in nucleic acids, oxidation of proteins, and inactivation of enzymes.⁶ However, the photobiological effects of furocoumarins are mainly related to their capacity to bind DNA and form monoadducts and interstrand crosslinks, mainly with pyrimidine bases, under UVA irradiation (320–400 nm), a region of the electromagnetic spectrum in which nucleic acids are transparent. Moreover, furocoumarins photobind lipids and intra- and extra-cellular proteins, localize in mitochondria and, upon UVA irradiation, they are able to damage these organelles leading to cell death by apoptosis.⁷ Photoactivation of furocoumarins also yields stable species (photoproducts, mainly formyl-derivatives and dimers) which are cytotoxic products considered to play a relevant role in PUVA therapy.⁸ Although some long-term side-effects, such as skin phototoxicity, have been observed after PUVA therapy, it has been acknowledged that long-term multiple exposures appear to be necessary for a clinical meaningful increase of risk of genotoxicity and skin cancer.^{9,10} Furthermore, it has been proposed that photoactivation of furocoumarins under

Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, via Marzolo 5, 35131 Padova, Italy. E-mail: giorgia.miolo@unipd.it, mariateresa.conconi@unipd.it; Fax: +390498275366; Tel: +390498275705, +390498275714

[†]These authors equally contributed to the work.

longer wavelengths than the UVA range leads to less mutagenic lesions in the DNA, *i.e.* preferential formation of psoralen-monoadducts over crosslinks.¹¹

Herein, this work aimed to verify whether 8-MOP activated by UVA or blue light could target prostate cancer cells, providing some insights into mechanisms underlying the antiproliferative effect.

2. Materials and methods

2.1 Irradiation procedure

For UVA irradiation, a Philips HPW 125 lamp was used, mainly emitting at 365 nm. The total energy hitting the sample was monitored by means of a radiometer (Variocontrol, Waldmann, Villingen-Schwenningen, Germany), equipped with a Variocontrol UV Sensor (Waldmann). The radiant power emitted by the UVA lamp was about 8 mW cm⁻². For blue light (BL) experiments, samples were irradiated using Waldmann UV436HF apparatus, mainly emitting at around 420 nm (radiant power 20 mW cm⁻²). The total energy hitting the sample was monitored by means of the same radiometer equipped with a Variocontrol blue_v Sensor (Waldmann). The samples were maintained at room temperature during irradiation.

2.2 Isolation of photoadducts with salmon testes DNA

The volumes of 8-MOP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA) ethanol concentrated solution were added dropwise to salmon testes DNA (Sigma-Aldrich) in 10 mM NaCl and 1 mM EDTA (1.5 × 10⁻³ M) solutions to achieve a DNA/compound ratio of about 40. The mixture was irradiated with 15 J cm⁻² of blue or UVA light in a glass dish. After irradiation, the DNA was precipitated with 1 M NaCl and cold ethanol (2 volumes); the precipitated DNA was collected, washed with 80% ethanol, dried and then dissolved in water. The two final solutions were hydrolyzed with 0.5 M HCl, heated at 100 °C for 1 h, neutralized with NaOH and extracted three times with CHCl₃. Then, the organic layers were collected, dried under high vacuum and dissolved in ethanol. The hydrolyzed mixtures were separated by thin-layer chromatography (TLC; F₂₅₄ plates, 0.25 mm, Merck, Darmstadt, Germany) eluting with ethyl acetate/ethanol (9 : 1).

2.3 pBR322 DNA strand break-relaxation assay

Each pBR322 DNA sample (150 ng) (Life Technologies, Monza, Italy) dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) was irradiated with increasing blue and UVA radiation exposures (0, 2.0, 5.0, 7.5, 12.0, 15.0 J cm⁻²) in the presence of 300 μM 8-MOP. The samples were loaded on 1% agarose gel, after addition of 1 μL of gel loading buffer (0.25% Bromophenol blue, BPB; 0.25% xylene cyanol; and 40%, w/v, sucrose) to each of them. The electrophoretic run was carried out in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) at 25 V for 6 h, using GNA-100 electrophoretic apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden). After staining with ethidium

bromide solution (1 μg mL⁻¹ in TAE buffer) for 20 min, the gel was washed with water, and the DNA bands were visualized under UV radiation with a UV transilluminator and detected with Bio-Rad GelDoc EZ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The fraction of undamaged DNA (supercoiled, SC) and damaged DNA (open circular, OC) was calculated by using ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad). Samples of DNA alone in the dark and after irradiation were used as controls.

2.4 Photooxidation of pBR322 DNA

Each pBR322 DNA sample (200 ng) dissolved in phosphate buffer (10 mM, pH 7.2) was irradiated with UVA and BL (0, 2.0, 7.5 J cm⁻²) in the presence of 300 μM 8-MOP. After irradiation, DNA was precipitated by ethanol/sodium acetate, dissolved in the reaction buffer (supplied by BioLabs: 10 mM Bis Tris propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DDT, pH 7.0). Each sample was incubated for 30 min at 37 °C with Endo III (New England BioLabs, Ipswich MA, USA), as previously described.¹² Loading buffer (3 μL, 0.25% BPB, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in water) was added to the samples, then loaded on 1% agarose gel. The run was carried out in TAE buffer at 80 V for 2 h. After staining with ethidium bromide solution, the gel was washed with water and the DNA bands were detected and quantified as described above. Samples of DNA alone in the dark and after irradiation were used as controls.

2.5 Cross-linking assay

pBR322 DNA dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) was linearized using EcoRI restriction enzyme (New England BioLabs). DNA was precipitated and irradiated with increasing doses of blue and UVA light (0, 2.0, 5.0, 7.5, 12.0, 15.0 J cm⁻²) in the presence of 300 μM 8-MOP. Half of the samples were denatured with NaOH (0.2 M final), then placed in water bath at 100 °C for 10 min and immediately placed in ice. Non-denatured UVA and blue light treated samples (the second half), UVA and blue light irradiated pBR322 linearized untreated samples and pBR322 kept in the dark were taken as controls. The samples were loaded on 1% agarose gel and run as described above.

2.6 Cell cultures

Human prostatic cell line DU145 (Cell Lines Service, GmbH, Eppelheim, GER) was cultured as a monolayer in a proliferation medium composed of Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 0.1 mM sodium pyruvate and 1% antibiotics (Sigma-Aldrich) at 37 °C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.7 Cell treatments

Cells (2.6 × 10⁴ cm⁻²) were seeded into each well of 24-well plates (Sarstedt, Newton, NC, USA) in the proliferation medium. After 24 h, the medium was removed and replaced with MEM w/o phenol red (Sigma-Aldrich) containing various 8-MOP concentrations (ranging from 0.01 to 30 μM). After 1 h of incubation in the dark at 37 °C, cultures were irradiated

with 2 J cm^{-2} of UVA or blue light. After irradiation, media were removed and replaced with proliferation media. At 48 h, CD44 expression, apoptosis rates and cell viability were determined.

2.8 Sphere forming assay

To evaluate sphere formation, immediately after irradiation the cells were detached, seeded ($3.3 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$) into each well of low attachment 24-well plates and cultured for 13 days with a sphere formation medium composed of DMEM/F-12 (3:1, v/v) (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 0.4% BSA (Sigma-Aldrich), 0.4% B27 (Gibco), 1% L-glutamine, and 1% antibiotics. Then, cultures were observed by using a phase contrast microscope Nikon T-s (Shinagawa, Tokyo, Japan) and photographed at $\times 40$ magnification. Spheres' diameters and number were determined using ImageJ tools.

2.9 ROS production

The assay was performed using the Abcam's DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells (2.5×10^4) were seeded into each well of a 96-well black plate with a clear bottom (Corning, New York, U.S.) in the proliferation medium. After 24 h, cultures were incubated with $20 \mu\text{M}$ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) for 45 min and then treated with various concentrations of 8-MOP for 1 h. Afterwards the plate was irradiated with 2 J cm^{-2} of blue or UV-A light. Data were collected using a fluorescence microplate reader (Ex/Em = 485/535) (Victor, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, US). Cultures treated with 100 and $200 \mu\text{M}$ *tert*-butyl hydrogen peroxide (TBHP) were taken as positive controls.

2.10 CD44 expression

CD44 expression was evaluated by means of immunofluorescence and citofluorimetric analysis. The cells were detached, placed on glass slides using Cytospin 4 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, US) and fixed with 10% formalin (Sigma-Aldrich) in PBS for 15 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nonspecific binding sites were deactivated through incubation with 3% BSA (Sigma-Aldrich) for 1 h. Samples were treated overnight at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ with a non-conjugated monoclonal mouse anti-CD44 antibody (1:100, v/v) (AbD Serotech, Hercules, CA, USA) and, after washings with PBS, treated with secondary antibody goat anti-mouse Alexa 488 (1:200 in 1.5% BSA) (Gibco) for 30 min at room temperature. The samples were mounted with an aqueous mounting medium containing DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, Peterborough, UK). For citofluorimetric analysis, cell suspensions were incubated with the primary antibody non-conjugated mouse anti-CD44 (AbD Serotech) for 15 min in the dark at room temperature. Afterwards, the samples were washed with 0.5% BSA and treated with the secondary antibody Alexa 488-conjugated (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). The cells were analysed by using a FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose,

California, USA). Samples treated only with a secondary antibody were taken as controls.

2.11 Cell viability and apoptosis

Cell viability was assessed by trypan blue staining. Alternatively, cell suspensions were treated with FITC-Annexin V and propidium iodide (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and incubated in the dark for 15 min at room temperature. Data were collected with a FACSCanto II cytofluorimeter. Samples marked with only FITC-Annexin V or propidium iodide and not stained cells were used as control to set up the instrument.

2.12 Western blot

At 24 h from irradiation, cultures were treated with lysis buffer (0.3% Tris-Base, 1.4% Glycine, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitors $1\times$). Proteins were quantified using a BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Pierce Biotechnology) according to the manufacturer's protocols and then separated by 10% SDS/PAGE (Bio-Rad Laboratories). Electroblothing was performed by using a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon PVDF, Millipore, Watford, UK). Blocking of non-specific binding was achieved by incubation with 5% BSA in tris-buffered saline for 2 h at room temperature. Then, the membrane was incubated overnight, with gentle shaking, at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ with primary polyclonal rabbit anti-human GAPDH, phospho(Thr180/Tyr182)-p38, phospho(Thr202/Tyr204)-p44/42 (1:500, v/v) (Cell Signaling, Danvers MA, USA) antibodies. The detection of target proteins was performed using peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (Bio-Rad Laboratories). The development of immunoreactivity was enhanced by a chemiluminescence substrate (ECL) (Sigma-Aldrich) and then visualized by using the VersaDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The protein expression level was normalized to housekeeping protein GAPDH and quantified using the image processing software ImageJ. Data are reported as the ratio between target protein and relative housekeeping protein expression.

2.13 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm the standard error of the mean. The difference between groups was evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test.

3. Results

3.1 Formation of monoadducts

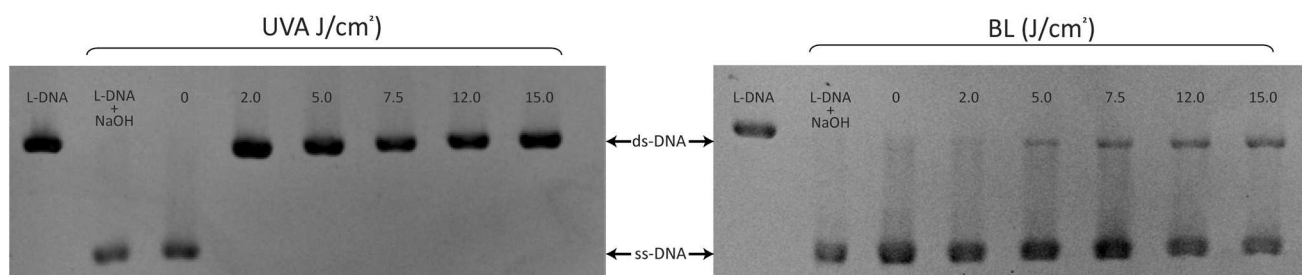
The capacity of 8-MOP to photobind DNA under BL was verified by irradiating salmon testes DNA with 8-MOP and comparing the results obtained under UVA at the same dose (15 J cm^{-2}). DNA irradiated in the presence of 8-MOP acquired a violet fluorescence under both blue and UVA light, as it usually happens when fluorescent furocoumarins photobind to the macromolecule.¹³ The corresponding fluorescent bands,

separated through TLC after hot acid hydrolysis, presented not only the same kind of violet fluorescence but also the same $R_f = 0.52$. Moreover, they showed the same capacity to photo-reverse under mineral light (254 nm), giving rise to thymine and 8-MOP (visualized through two-dimensional chromatography), thus showing the typical behaviour of the C₄-furan side cycloadduct between thymine and 8-MOP.¹⁴ This common behaviour indicated that 8-MOP was able to form cycloadducts with thymine through the furan side double bond (4',5'-monoadducts) even under BL. However, the lower fluorescence intensity of the band formed under BL with respect to UVA indicated that the formation of this monoadduct was less efficient under longer wavelengths. The 8-MOP pyrone side photoadducts (3,4-monoadducts) were not visualized on the TLC plate in the sample after BL irradiation. In contrast, a low amount of 3,4-monoadducts was formed under UVA light.

3.2 Interstrand cross-linking detection

Since the furan side monoadducts of psoralens, by absorbing a further photon, are able to form cross-links (XLs) through the photobinding to another front pyrimidine in the complementary DNA strand, the capacity of 8-MOP to crosslink DNA under BL was investigated with plasmid pBR322 DNA by alkaline agarose gel electrophoresis and compared with the experiment under UVA light. The treatment of double-stranded DNA (ds-DNA) with a base (NaOH) destroys the H-bonds of the

two strands linked together, thus leading to the denaturation and separation of the single-stranded DNA (ss-DNA). ds-DNA runs slower than ss-DNA and sometimes the two single strands which run separately in the agarose gel can be easily seen (Fig. 1). Consequently, ds-DNA, which has been covalently cross-linked through 8-MOP cycloaddition, is unable to alkali denature and remains double stranded. In our experiment, denaturation of photosensitized pBR322 DNA, previously linearized with EcoRI restriction enzymes and irradiated in the presence of 8-MOP with the two lights, proved that 8-MOP produced a growing amount of XLs under increasing BL doses, *i.e.* a growing amount of both crosslinked DNA molecules and XLs inside the same molecule. These can be seen from the presence of the upper band (double strand DNA, ds-DNA) of increasing intensity, corresponding to non-denatured-cross linked DNA. This DNA should contain both monoadducts and at least one cross-link per molecule. It is interesting to note that in all the samples irradiated with UVA light the only band present was the ds-DNA at all the light doses used, indicating that 8-MOP is a very efficient bifunctional agent under the conditions used, even at the lowest dose of light. Moreover, looking at the position of the ds-DNA bands it can be seen that, as the light increased, the ds-crosslinked DNA moved slightly slower under the effect of the increasing number of monoadducts and XLs formed. In contrast, at the BL dose of 2.0 J cm⁻², corresponding to the dose used in the photo-antiproliferative experiments, the XLs were hardly detectable.



Samples	UVA		BL	
	% ds-DNA	% ss-DNA	% ds-DNA	% ss-DNA
L-DNA	100.0	\	100.0	\
L-DNA + NaOH	\	100.0	\	100.0
0 J/cm ²	\	100.0	\	100.0
2.0 J/cm ²	100.0	\	4.4 ± 0.2*	95.6 ± 0.2*
5.0 J/cm ²	100.0	\	9.9 ± 0.5*	90.1 ± 0.5*
7.5 J/cm ²	100.0	\	15.3 ± 1.1*	84.7 ± 1.1*
12.0 J/cm ²	100.0	\	24.4 ± 0.8*	75.6 ± 0.8*
15.0 J/cm ²	100.0	\	28.0 ± 0.4*	72.0 ± 0.4*

Fig. 1 Photosensitization of linearized pBR322 DNA (L) with 300 μM 8-MOP under increasing UVA and blue light (BL) radiant exposures. The samples were treated with 0.2 M NaOH, boiled for 10 min, placed quickly on ice, and loaded in alkaline 1% agarose. L: non-denatured DNA sample. L + UVA + NaOH and L + BL + NaOH: denatured and irradiated (15.0 J cm⁻²) L samples. ds: double strand. ss: single strand. **p* < 0.05 vs. non-treated L sample taken as control.

Looking at the ss-DNA, this is split into the two complementary strands in the alkaline gel. The percentage of ss- (denatured, summing the two separate bands) and ds-DNA (non-denatured) of the blue and UVA light irradiated samples in the presence of 8-MOP with respect to the control are reported in Fig. 1.

3.3 Frank strand breaks on pBR322 DNA

We further investigated and compared the possible photo-damage of 8-MOP to the nucleic acid with the two light conditions. In particular, we performed the relaxation assay on pBR322 plasmid DNA, through which single strand breaks induced directly (frank strand breaks) from the photosensitizing agent converted a supercoiled (SC) DNA molecule to a relaxed single strand form (open circular, OC) that migrates separately in an agarose gel (Fig. 2). Relaxation assay showed that 8-MOP did not damage plasmid DNA under 2 J cm⁻² of BL and barely cleaved DNA under higher BL doses (5.0, 7.5, 12 and 15 J cm⁻²), as indicated by the presence of a very slight band corresponding to the OC form. In contrast, under UVA light 8-MOP started to directly induce single strand cleavage at the lowest dose of 2 J cm⁻². The damage was much more evident at 5.0 J cm⁻² and augmented at increasing UVA doses (12 and 15 J cm⁻²). At these last UVA doses, the OC was the main lasting form of the DNA along with the increasing broader and slower moving SC band, reflecting the presence of a population of DNA molecules, which differ in their extent of covalent photomodification.¹⁵ No double strand breaks, which

convert the SC plasmid DNA in a linear form, were generated by 8-MOP under both light conditions. Therefore, under BL only a small effect was observed by irradiating pBR322 DNA in the presence of 8-MOP, with the formation of a very low amount of OC form, indicating that 8-MOP is not able to induce a significant yield of frank strand breaks inside DNA upon BL irradiation. It is therefore conceivable that the furan-side monoadducts are the major lesions produced under this kind of light. The fractions of SC and OC DNA were quantified and the results are reported in the table of Fig. 2 below the electrophoretic run. In the case of UVA irradiated samples (2.0, 5.0, 7.5, 12 and 15 J cm⁻²) the quantification of the SC form was made including its smearing.

3.4 pBR322 DNA photooxidation

We further investigated the possible photooxidative damage on plasmid pBR322 DNA induced by 8-MOP under the two light conditions by using the Endonuclease III (Endo III) enzyme known to recognize 5,6-dihydropyrimidine derivatives, in addition to AP sites.¹² Single strand breaks (OC form) produced by 8-MOP under enzymatic incision at the endonuclease-sensitive sites were measured as in the previous experiments. Quantification of SC and OC DNA is shown in Fig. 3. The treatment with the base excision enzyme revealed that 8-MOP was able to photooxidize DNA bases under UVA light only under the highest UVA dose (7.5 J cm⁻²) with respect to the UVA light alone. Indeed, UVA alone induced a photooxidative damage but besides the endonuclease revealed a small oxi-

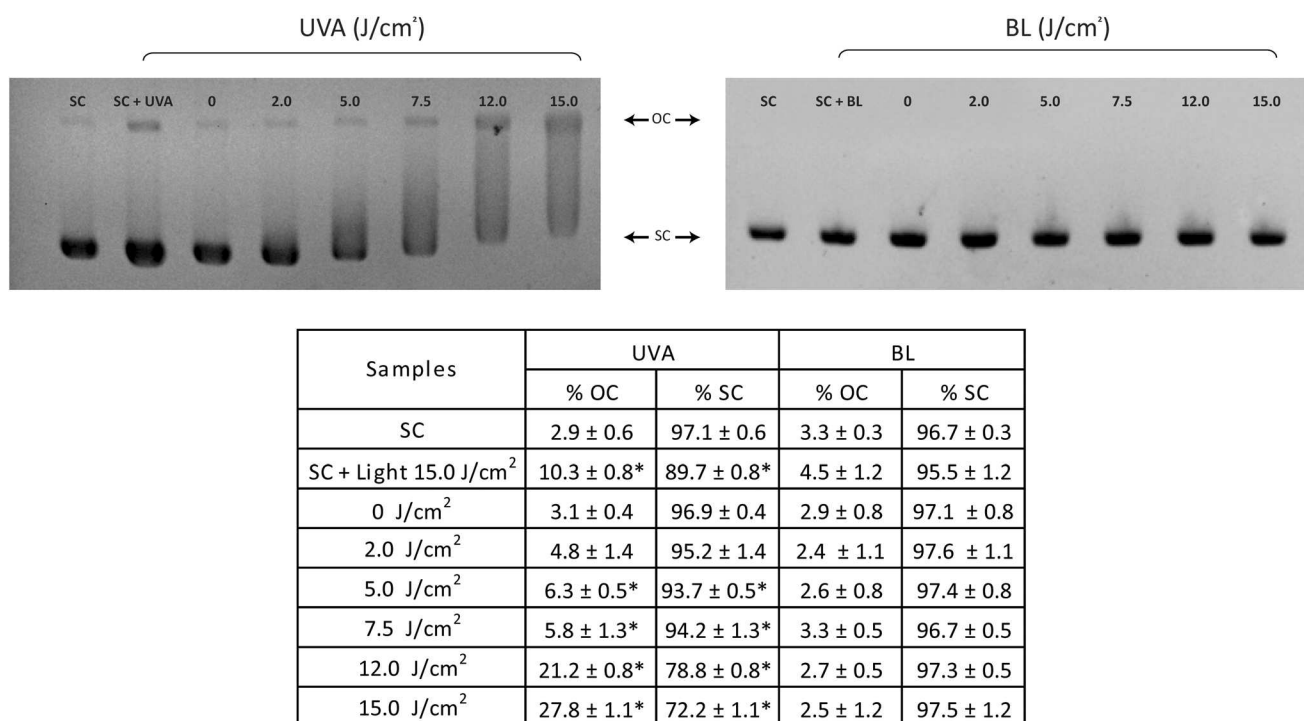


Fig. 2 Relaxation assay-frank strand breaks. pBR322 DNA in the presence of 300 μM 8-MOP was irradiated with increasing doses of UVA and blue light (BL). In the first two wells dark (SC) and irradiated pBR322 DNA samples (UVA and BL, 15 J cm⁻²) were loaded. **p* < 0.05 vs. non-treated DNA sample (SC) taken as control. OC: open circular. SC: supercoiled.

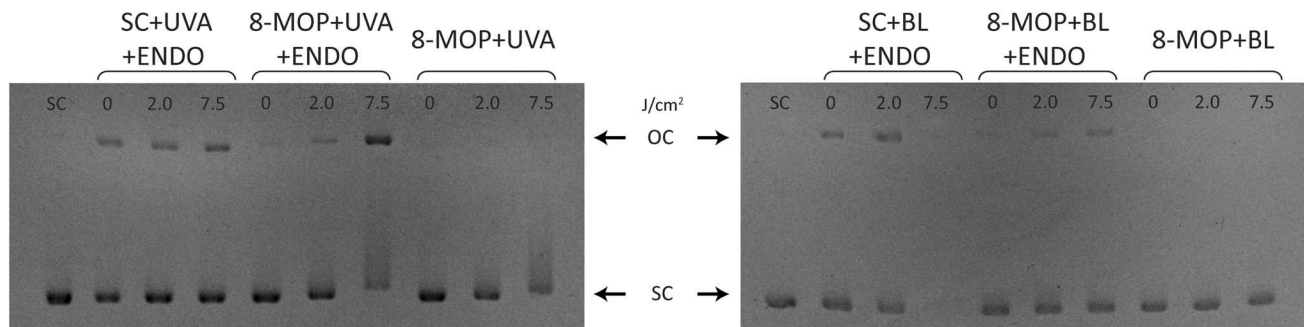


Fig. 3 Photooxidative DNA damage. DNA base modifications photoinduced by 8-MOP under increasing exposures (2.0 and 7.5 J cm^{-2}) to UVA light (left) and blue light (right). SC: non-treated SC plasmid pBR322 DNA; SC + ENDO: pBR322 DNA digested with Endo III in the dark (0) and upon irradiation (2.0, 7.5 J cm^{-2}); 8-MOP + ENDO: pBR322 DNA in the presence of 300 μM 8-MOP in the dark (0) and upon irradiation (2.0 and 7.5 J cm^{-2}) after treatment with the enzyme Endo III.

ductive damage also in sample 0, thus present already in the DNA used although the sample was kept in the dark during the treatment (0 sample). The same behaviour was observed when DNA was irradiated under BL (see sample 0), but, in this case, 8-MOP did not produce a photooxidative damage higher than that of the light alone; rather it seemed to have a photo-protective effect likely through the absorption of the incoming radiation (Fig. 3). Therefore, no significant oxidative damage was induced by 8-MOP on the plasmid DNA and only a greater damage was present under a higher dose of UVA.

3.5 Effects on DU145 prostate cancer cells

The antiproliferative activity of 8-MOP activated by both UVA and BL was evaluated on DU145 cells, derived from human prostate carcinoma. These small and flat cells formed good-sized colonies when sub-confluent and a squamous layer when they reached confluence (Fig. 4A). The cultures comprised a high percentage (about 98%) of cells expressing CD44 that appeared mainly localized in the cytoplasmic membrane (Fig. 4C). When cultured in low attachment plates with serum free medium, DU145 cells were able to form spheres still expressing CD44 and their diameters ranged from 80 to 100 μm (Fig. 4B and D).

Monolayer cultures were treated with various concentrations of 8-MOP and then irradiated with 2 J cm^{-2} UVA or BL. As shown in Fig. 5, 8-MOP was more effective after UVA irradiation than under BL one. Indeed, sphere formation was completely abrogated at 0.5 μM when activation was carried out with UVA light. In contrast, 30 μM 8-MOP was needed to achieve a 70% decrease in sphere number after BL activation. No significant variations were detected in cultures treated with light only or with 8-MOP kept in the dark.

To elucidate the mechanism underlying the observed effects on sphere formation, further experiments were carried out by using 0.5 μM and 30 μM 8-MOP activated by UVA and BL, respectively. As expected, immediately after both irradiation, significant increases in ROS production were detected, being more pronounced under UVA activation (Fig. 6).

At 48 h, two-dimensional cultures treated with photo-activated 8-MOP were less immunoreactive towards CD44 than control ones (Fig. 7). These findings are in agreement with cytofluorimetric analysis that showed significant decrease in the percentage of CD44-positive cells treated with the compound under both light conditions. However, a stronger variation was detected after UVA irradiation than under BL. Decrease in CD44 expression was also noted in cultures treated with BL only and 30 μM 8-MOP kept in the dark.

Furthermore, the significant decrease in cell viability was coupled to the induction of cell apoptosis (Fig. 8). Indeed, as demonstrated by cytofluorimetric analysis, 8-MOP with both UVA and BL significantly enhanced the percentage of annexin V-positive cells. However, the apoptosis rate was higher in cultures treated with 0.5 μM 8-MOP plus UVA that also induced a significant increase in necrotic cells (propidium iodide-positive/annexin V-negative). No significant variations were detected in control cultures, in those treated with UVA light only or with the compound kept in the dark.

To investigate the mechanism underlying the antiproliferative and proapoptotic effects of 8-MOP under irradiation, the activation status of some mitogen-activated protein kinases (MAPKs) was evaluated by western blotting, using antibodies able to detect the phosphorylated forms of these proteins. The expression levels of phosphorylated p38 significantly increased in cultures treated with 8-MOP plus UVA compared to that revealed in non-treated cultures, whereas no variations of phosphorylated p44/42 were detected (Fig. 9). In contrast, after BL irradiation, 8-MOP enhanced p44/42 activation, without affecting the p38 one.

4. Discussion and conclusion

Prostate cancer is a significant health problem due to its high incidence, mortality and cost associated with its diagnosis and treatment, and the lack of effective treatment for advanced disease. Thus, there is an urgent need for developing more effective anticancer modalities with minimal side effects. In this context, the use of naturally occurring dietary agents, such

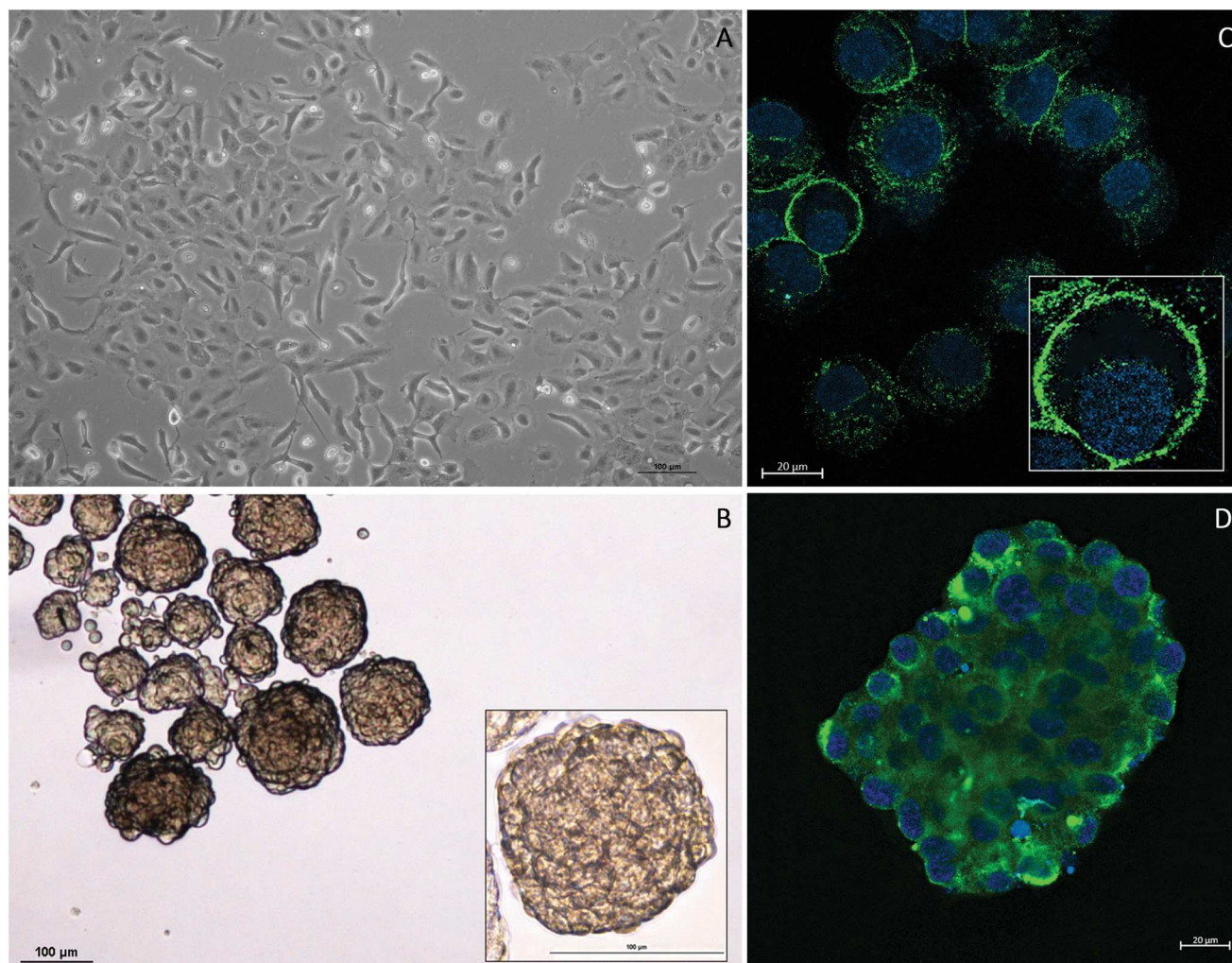


Fig. 4 Phase contrast microscopy (A, B) and immunofluorescence (C, D) of DU145 cell cultures as a monolayer (A, C) and under serum free conditions (B, D). Immunoreactivity towards CD44 stained green, whereas nuclei were labelled with DAPI (blue). Bars: 100 μm (A, B), 20 μm (C, D).

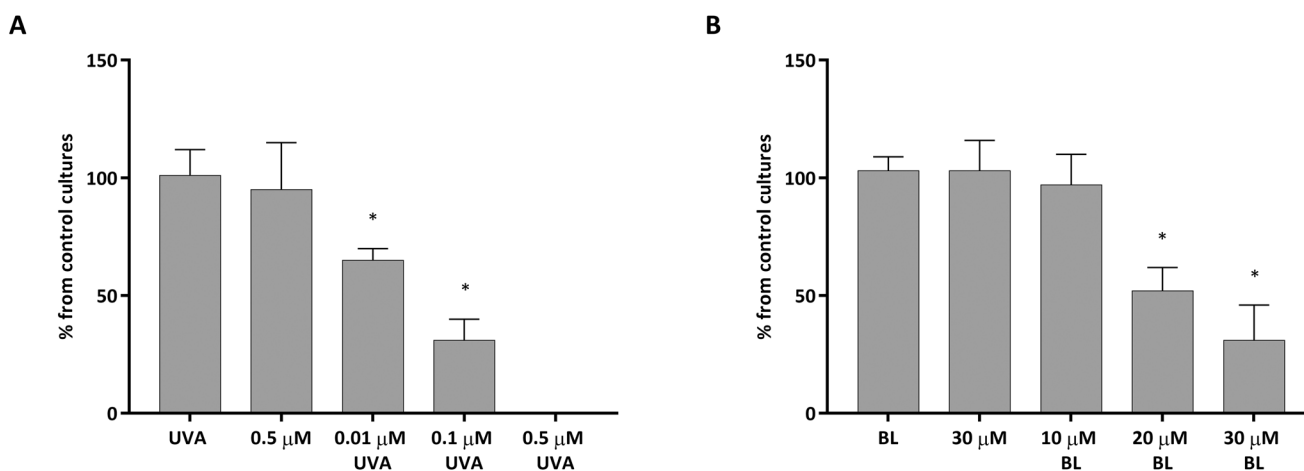


Fig. 5 Sphere forming assay. Cultures were irradiated with 2 J cm^{-2} of UVA (A) or blue light (B). Statistical significance was calculated using Student's *t*-test, * $p < 0.05$ vs. non-treated cultures taken as control. BL: blue light.

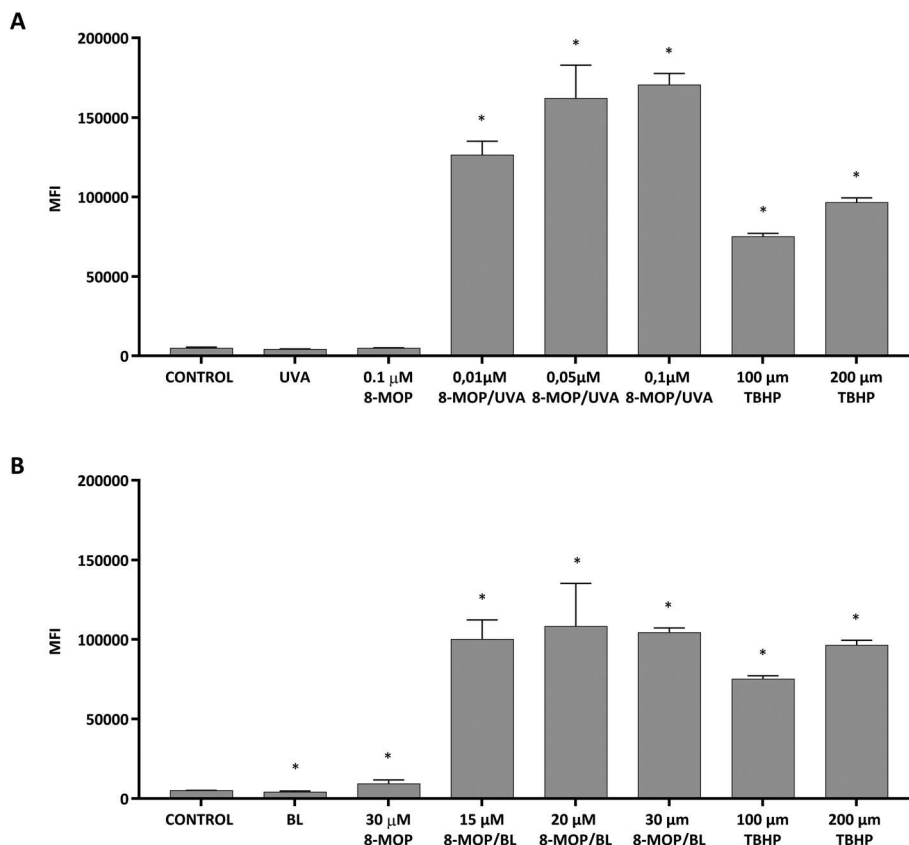


Fig. 6 ROS generation. Cultures were irradiated with 2 J cm^{-2} of UVA (A) or blue light (B). Statistical significance was calculated using Student's *t*-test, * $p < 0.05$ vs. non-treated cultures taken as control. BL: blue light.

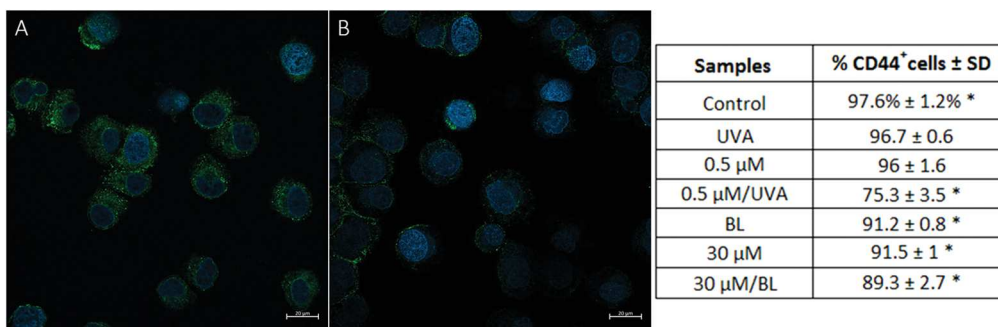


Fig. 7 CD44 expression. Cultures were irradiated with 2 J cm^{-2} of UVA or blue light. Representative micrographs of untreated cell cultures (A) and cultures exposed to 8-MOP plus blue light. Immunoreactivity towards CD44 stained green, whereas nuclei were labelled with DAPI (blue). Bars: 20 μ m. Cytofluorimetric data are reported as the percentage of CD44-positive cells. Statistical significance was calculated using Student's *t*-test, * $p < 0.05$ vs. non-treated cultures taken as control. BL: blue light.

as some bioactive compounds from *Psoralea corylifolia*, including flavonoids and coumarins (psoralidin, psoralen, isopsoralen and angelicin), has already been proposed as an effective strategy for prostate cancer chemoprevention.^{16–18}

In this work, our data have shown that 8-MOP activated by either UVA and blue light BL exerts antiproliferative effects on DU145 prostate cancer cells. Although inhibition of sphere for-

mation under blue light was achieved at micromolar concentrations of the compound, 8-MOP was less cytotoxic on DU145 cells than when irradiated with UVA. Indeed, sphere formation inhibition of 70% was obtained with 2 J cm^{-2} of BL plus 8-MOP at a concentration about 60 times higher than that used with the same dose of UVA under which 100% of sphere inhibition was reached. From the experiments on isolated

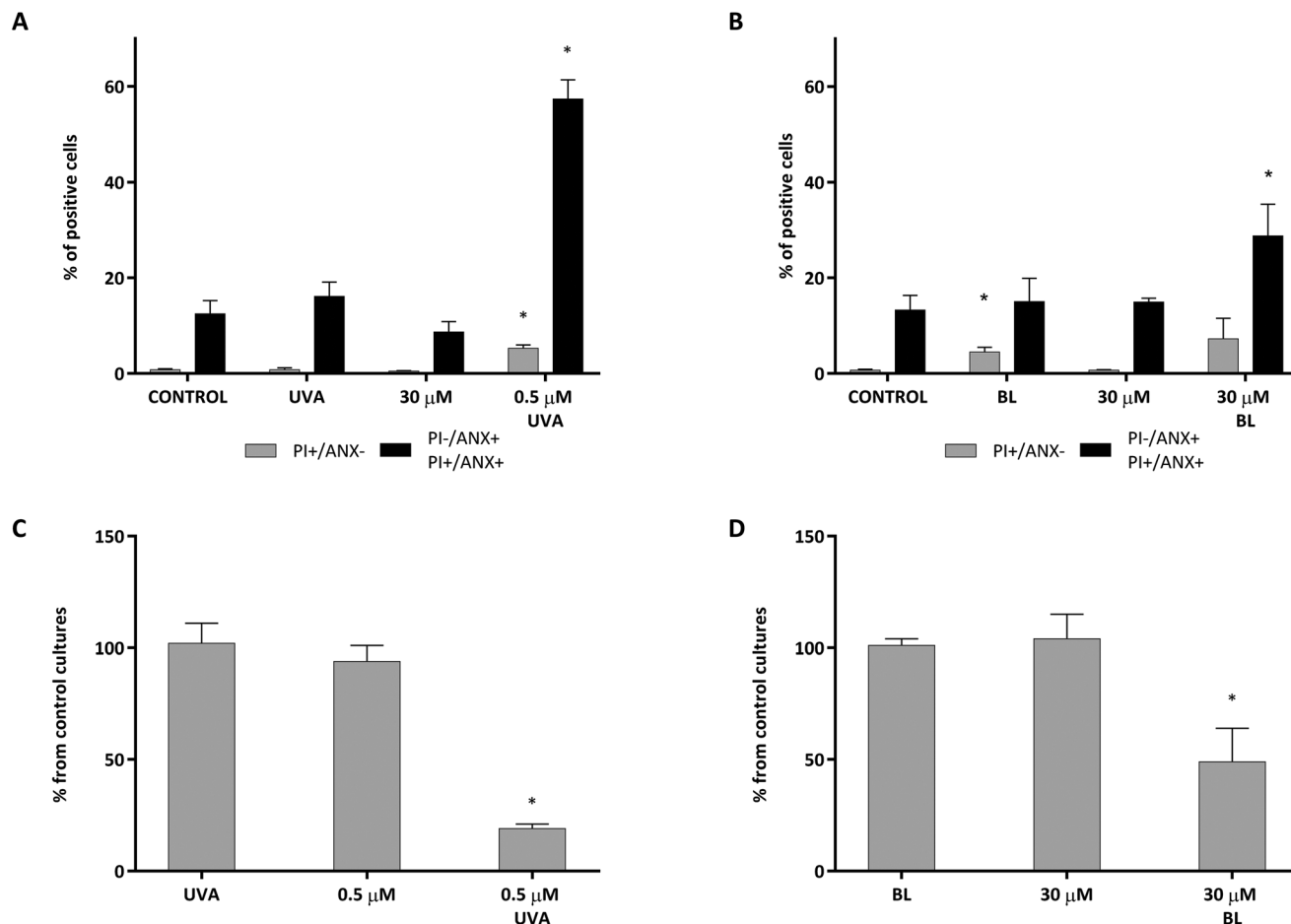


Fig. 8 Effects on apoptosis (A, B) and cell viability (C, D). Cultures were irradiated with 2 J cm^{-2} of UVA (A, C) or blue light (B, D). Statistical significance was calculated using Student's *t*-test, * $p < 0.05$ vs. non-treated cultures taken as control. BL: blue light; PI: propidium iodide; ANX: annexin V.

DNA, the furan side monoadduct and cross-link formation were detected, although to a lower extent under blue light than under UVA, thus showing that the photocytotoxic effect is strictly related to the number of DNA lesions. Similarly, the production of ROS measured both in the treated cancer cells and through the detection of photooxidized bases in plasmid DNA was less efficient under blue radiation than under UVA. These findings suggest that the photocytotoxic effects of 8-MOP on prostate cancer cells can be strictly related to the number of DNA lesions and the oxidation of cell targets. In accordance with the data of Gasparro *et al.*,¹⁹ the XLs in plasmid DNA were hardly detectable at a blue light dose of 2.0 J cm^{-2} , corresponding to the dose we used in the cell-based assays. Therefore, we can assume that the formation of XLs could be very low even in the DU145 cells and that this lesion likely plays a minor role in the antiproliferative effects of 8-MOP on cancer cells.

Compelling evidence suggest that PCa stem cells (PCaSCs), a subset of cells possessing tumor-propagating ability and long-term self-renewal potential,²⁰ are resistant to conventional chemotherapy and radiation because they overexpress drug efflux pumps and possess an increased capacity to acti-

vate anti-apoptotic and pro-survival pathways as well as DNA repair.²¹ They are responsible for recurrent hormone refractory PCa and the signatures of PCaSCs are associated with PCa bone metastasis and poor prognosis.²² Our results indicate that photoactivated 8-MOP was also able to target PCaSCs, as demonstrated by the inhibitory activity in sphere forming assay and decreases in the percentage of CD44-positive cells. CD44, a receptor for hyaluronic acid and involved in cell adhesion and migration, is overexpressed by PCaSCs and plays an important role in the development and progression of cancer.²³ Since it is positively correlated with the PCa stage, its expression levels can be used to predict the therapeutic response to the treatment.²⁴ Furthermore, it has been demonstrated that monoclonal antibodies against CD44 and anti-sense oligonucleotides significantly reduce tumour progression.²⁵

Our data show that 8-MOP activated by both UVA and blue light induced cell death by apoptosis as a result of DNA damage and the generation of a large amount of ROS. Nowadays, the release of high levels of ROS is the basis of PDT for cancer treatment. However, this may be not sufficient for successfully inhibiting tumor growth. Indeed, cancer cells

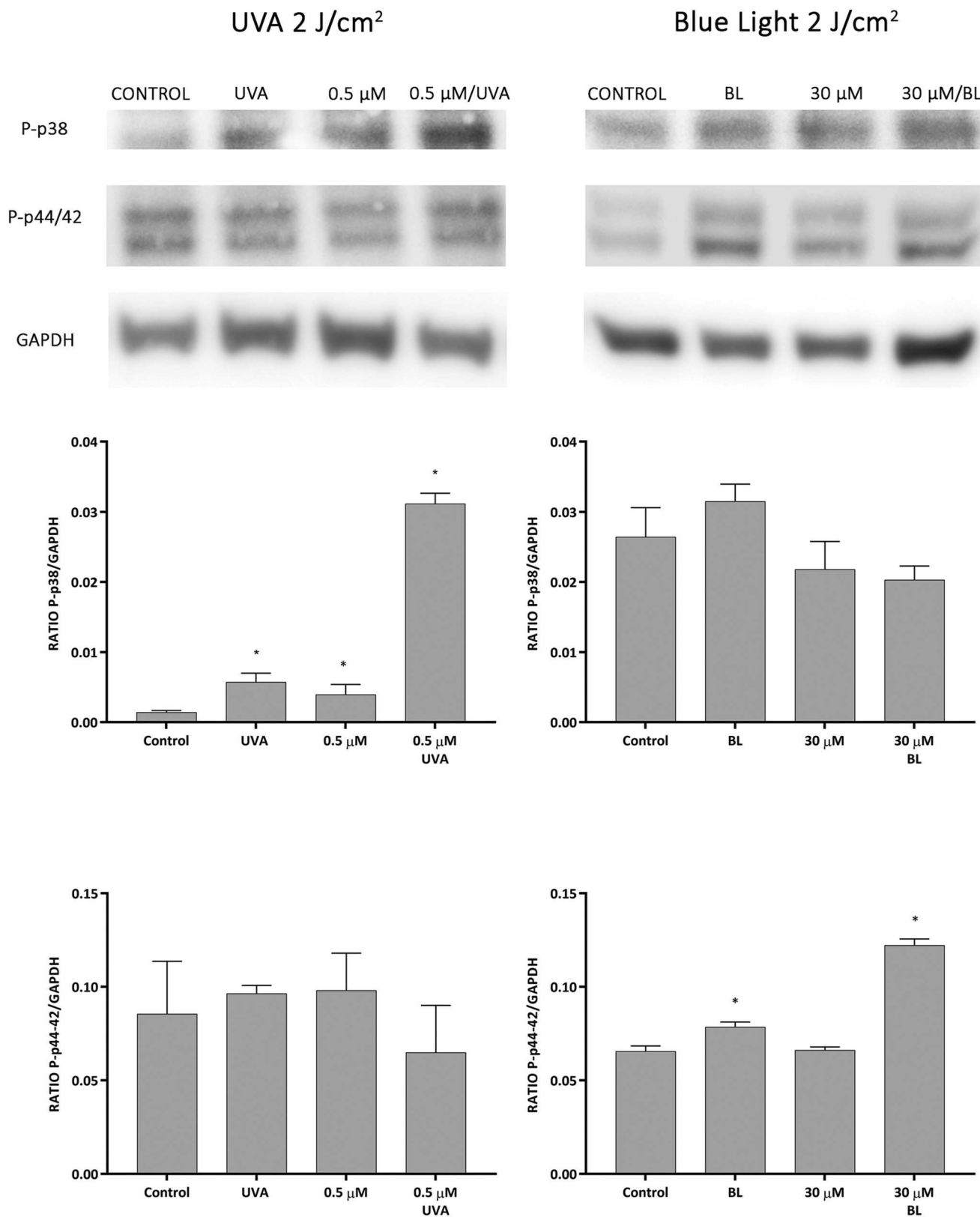


Fig. 9 WB analysis of the phosphorylation status of p38 and p44/42. Cultures were treated with 0.5 μM 8-MOP plus 2 J cm⁻² of UVA or 30 μM 8-MOP plus 2 J cm⁻² of blue light. The quantification of protein expression levels was performed by densitometric analysis of the bands using ImageJ processing software. Data are reported as the ratio between target protein and relative GAPDH expression. **p* < 0.05 vs. non-treated cultures taken as control. BL: blue light.

overexpress antioxidant proteins to prevent ROS-induced damage. Moreover, ROS levels inside tumor tissue must be finely tuned because low amounts of ROS can facilitate cancer cell survival and angiogenesis through the modulation of VEGF expression.^{26,27} Thus, treatments possessing the mechanisms of action besides ROS generation might be more effective than PDT.

To further elucidate the proapoptotic activity of 8-MOP, we investigated its effects on the activation of the MAPKs that modulate a wide range of processes, such as cell growth and differentiation, apoptosis, and gene expression, through the phosphorylation of target proteins. In particular, among MAPKs, extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), also named p44/42, and p38 MAPK were here taken into account. Our data have shown that a different modulation of these signalling pathways occurred depending on the light used for the activation of 8-MOP. Indeed, the phosphorylation status of p38 was enhanced by 8-MOP plus UVA, whereas, under BL, it remained unchanged compared to control cultures. Our findings agree to that already reported by Cappellini *et al.*,²⁸ who demonstrated that PUVA treatment induced phosphorylation of p38, but not p42/44, in both Jurkat cells and normal human T lymphocytes. Modulation of cell cycle checkpoints, cell apoptosis and autophagy is closely related to the p38 MAPK signalling pathway similar to Jun amino-terminal kinases (JNKs), strongly activated by various extracellular stimuli, such as oxidative stress and UV radiation.²⁹ On the other hand, increased phosphorylation of p44/42 MAPK was detected only after activation of 8-MOP with BL. The ERK1/2 signalling pathway is usually activated by growth factors and mitogens, leading to anti-apoptotic effects by down-regulation of pro-apoptotic factors and/or upregulation of anti-apoptotic ones.³⁰ However, an ERK1/2 module can also act in a pro-apoptotic manner depending on cell types and under specific stimuli, such as DNA damage and some anticancer molecules. For example, Li *et al.*³¹ have reported that angelicin, an angular furocoumarin, inhibits cell growth through the activation of the ERK pathway without any effect on the phosphorylation levels of p38 MAPK. Furthermore, it has been demonstrated that the activation of ERK1/2 may lead to toxicity in neuronal cells and its inhibition reduces apoptosis induced by adriamycin and platinum compounds.³² Thus, we can suppose that in this study the observed different activations of MAPKs could be related to the different kinds of DNA damage and their extent. Nevertheless, further study is needed to confirm this hypothesis.

Collectively, this work demonstrates, for the first time, that 8-MOP photoactivated by blue light exerts reliable anti-proliferative effects on DU145 prostate cancer cells. The flexibility of 8-MOP photochemistry has allowed modulating the extent and the types of DNA damage through the delivery of blue light, thus controlling the ratio of monoaddition to the crosslinkage, mainly responsible for the mutagenicity of the DNA lesions. Moreover, in view of clinical applications, blue light may guarantee deeper penetration into the target tissue and it is also easier to be delivered by an optical fiber than UVA.

Acknowledgements




This work was funded by the University of Padova, PRAT project no. CPDA150854.

References

- 1 M. Valerio, H. U. Ahmed, M. Emberton, N. Lawrentschuk, M. Lazzeri, R. Montironi, P. L. Nguyen, J. Trachtenberg and T. J. Polascik, The role of focal therapy in the management of localised prostate cancer: a systematic review, *Eur. Urol.*, 2014, **66**, 732–751.
- 2 G. Shafirstein, D. Bellnier, E. Oakley, S. Hamilton, M. Potasek, K. Beeson and E. Parilov, Interstitial Photodynamic Therapy-A Focused Review, *Cancers*, 2017, **9**, 12.
- 3 L. A. Schneider, R. Hinrichs and K. Scharffetter-Kochanek, Phototherapy and photochemotherapy, *Clin. Dermatol.*, 2008, **26**, 464–476.
- 4 F. Trautinger, U. Just and R. Knobler, Photopheresis (extracorporeal photochemotherapy), *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013, **12**, 22–28.
- 5 L. Lin, D. N. Cook, G. P. Wieseahn, R. Alfonso, B. Behrman, G. D. Cimino, L. Corten, P. B. Damonte, R. Dikeman, K. Dupuis, Y. M. Fang, C. V. Hanson, J. E. Hearst, C. Y. Lin, H. F. Londe, K. Metchette, A. T. Nerio, J. T. Pu, A. A. Reames, M. Rheinschmidt, J. Tessman, S. T. Isaacs, S. Wollowitz and L. Corash, Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light, *Transfusion*, 1997, **37**, 423–435.
- 6 D. Averbeck, Recent Advances in Psoralen Phototoxicity Mechanism, *Photochem. Photobiol.*, 1989, **50**, 859–882.
- 7 M. Canton, S. Caffieri, F. Dall'Acqua and F. Di Lisa, PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore, *FEBS Lett.*, 2002, **522**, 168–172.
- 8 S. Caffieri, F. Di Lisa, F. Bolesani, M. Facco, G. Semenzato, F. Dall'Acqua and M. Canton, The mitochondrial effects of novel apoptogenic molecules generated by psoralen photolysis as a crucial mechanism in PUVA therapy, *Blood*, 2007, **109**, 4988–4994.
- 9 R. S. Stern, Photocarcinogenicity of drugs, *Toxicol. Lett.*, 1998, **102**, 389–392.
- 10 A. Hannuksela-Svahn, B. Sigurgeirsson, E. Pukkala, B. Lindelof, B. Berne, M. Hannuksela, K. Poikolainen and J. Karvonen, Trioxsalen bath PUVA did not increase the risk of squamous cell skin carcinoma and cutaneous malignant melanoma in a joint analysis of 944 Swedish and Finnish patients with psoriasis, *Br. J. Dermatol.*, 1999, **141**, 497–501.
- 11 E. Sage and A. Bredberg, Damage distribution and mutation spectrum: the case of 8-methoxypsoralen plus UVA in mammalian cells, *Mutat. Res.*, 1991, **263**(4), 217–222.

- 12 B. Epe, M. Pflaum and S. Boiteux, DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems, *Mutat. Res.*, 1993, **299**, 135–145.
- 13 F. Dall'Acqua, D. Vedaldi, S. Caffieri, A. Guiotto, F. Bordin and G. Rodighiero, Chemical basis of the photosensitizing activity of angelicins, *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1984, **66**, 55–60.
- 14 D. Kanne, H. Rapoport and J. E. Hearst, 8-Methoxypsoralen-nucleic acid photoreaction. Effect of methyl substitution on pyrone vs. furan photoaddition, *J. Med. Chem.*, 1984, **27**, 531–534.
- 15 X. Chen, J. Kagan, G. Miolo, F. Dall'Acqua, D. Averbeck and E. Bisagni, Photosensitized cross-linking and cleavage of pBR322 and M13 DNA: comparison of 4,4',6-trimethyl-angelicin and 3-carbethoxypsoralen, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1994, **22**, 51–57.
- 16 E. Szliszka, Z. P. Czuba, Ł. Sędek, A. Paradysz and W. Król, Enhanced TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells by the bioactive compounds neobavaisoflavone and psoralidin isolated from *Psoralea corylifolia*, *Pharmacol. Rep.*, 2011, **63**, 139–148.
- 17 Y. Wang, C. Hong, C. Zhou, D. Xu and H. Qu, Screening Antitumor Compounds Psoralen and Isopsoralen from *Psoralea corylifolia* L. Seeds, *Evid. Based Complement Alternat Med.*, 2011, **2011**, 363052.
- 18 V. Carneiro Leite, R. Ferreira Santos, L. Chen Chen and L. Andreu Guillo, Psoralen derivatives and longwave ultraviolet irradiation are active in vitro against human melanoma cell line, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2004, **76**, 49–53.
- 19 F. P. Gasparro, P. Gattolin, G. A. Olack, L. I. Deckelbaum and B. E. Sumpio, The excitation of 8-methoxypsoralen with visible light: reversed phase HPLC quantitation of monoadducts and cross-links, *Photochem. Photobiol.*, 1993, **57**, 1007–1010.
- 20 C. Yang, K. Jin, Y. Tong and W. C. Cho, Therapeutic potential of cancer stem cells, *Med. Oncol.*, 2015, **32**, 619.
- 21 J. Zhao, Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid, *Pharmacol. Ther.*, 2016, **160**, 145–158.
- 22 A. P. Rybak, R. G. Bristow and A. Kapoor, Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression, *Oncotarget*, 2015, **6**, 1900–1919.
- 23 A. M. De Marzo, C. Bradshaw, J. Sauvageot, J. I. Epstein and G. J. Miller, CD44 and CD44v6 downregulation in clinical prostatic carcinoma: relation to Gleason grade and cytoarchitecture, *Prostate*, 1998, **34**, 162–168.
- 24 K. Korski, A. Malicka-Durczak and J. Bręborowicz, Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy Specimens, *Pol. J. Pathol.*, 2014, **65**, 291–295.
- 25 D. Maisel, F. Birzele, E. Voss, A. Nopora, S. Bader, T. Friess, B. Goller, D. Laifenfeld, S. Weigand and V. Runza, Targeting Tumor Cells with Anti-CD44 Antibody Triggers Macrophage-Mediated Immune Modulatory Effects in a Cancer Xenograft Model, *PLoS One*, 2016, **11**, e0159716.
- 26 P. Storz, Reactive oxygen species in tumor progression, *Front. Biosci.*, 2005, **10**, 1881–1896.
- 27 D. Zhu, Z. Shen, J. Liu, J. Chen, Y. Liu, C. Hu, Z. Li and Y. Li, The ROS-mediated activation of STAT-3/VEGF signaling is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced angiogenesis in human breast cancer cells, *Toxicol. Lett.*, 2016, **264**, 79–86.
- 28 A. Cappellini, P. L. Tazzari, I. Mantovani, A. M. Billi, C. Tassi, F. Ricci, R. Conte and A. M. Martelli, Antiapoptotic role of p38 mitogen activated protein kinase in Jurkat T cells and normal human T lymphocytes treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet-A radiation, *Apoptosis*, 2005, **10**, 141–152.
- 29 A. Cuadrado and A. R. Nebreda, Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling, *Biochem. J.*, 2010, **429**, 403–417.
- 30 Z. Lu and S. Xu, ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis, *IUBMB Life*, 2006, **58**, 621–631.
- 31 G. Li, Y. He, J. Yao, C. Huang, X. Song, Y. Deng, S. Xie, J. Ren, M. Jin and H. Liu, Angelicin inhibits human lung carcinoma A549 cell growth and migration through regulating JNK and ERK pathways, *Oncol. Rep.*, 2016, **36**, 3504–3512.
- 32 A. Scuteri, A. Galimberti, M. Ravasi, S. Pasini, E. Donzelli, G. Cavaletti and G. Tredici, NGF protects dorsal root ganglion neurons from oxaliplatin by modulating JNK/Sapk and ERK1/2, *Neurosci. Lett.*, 2010, **486**, 141–145.

4,6,4'-trimethylangelicin shows high anti-proliferative activity on DU145 cells under both UVA and blue light

G. Miolo  | G. Sturaro  | G. Cigolini | L. Menilli  | A. Tasso | I. Zago | M. T. Conconi

Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Padova, Italy

Correspondence

Giorgia Miolo, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Padova, Italy.

Email: giorgia.miololo@unipd.it

Funding information

University of Padova, PRAT project n. CPDA150854

Abstract

Objectives: Furocoumarins (psoralens and angelicins) have been already used under ultraviolet A light (UVA) for the treatment of skin diseases and cutaneous T-cell lymphoma. Besides their high anti-proliferative activity, some severe long-term side effects have been observed, for example genotoxicity and mutagenicity, likely strictly related to the formation of crosslinks. It has been demonstrated that blue light (BL) activation of 8-methoxypsoralen, an FDA-approved drug, leads to less mutagenic monoadducts in the DNA. So far, in this work the less toxic and more penetrating BL is proposed to activate 4,6,4'-trimethylangelicin (TMA), an already known UVA photoactivatable compound.

Materials and methods: Photocleavage, crosslink formation and oxidative damage were detected in pBR322 plasmid DNA treated with 300.0 $\mu\text{mol/L}$ TMA activated with various exposures of BL. Anti-proliferative activity, reactive oxygen species (ROS) formation and activation status of some signalling pathways involved in cell growth and apoptosis were verified on DU145 cells treated with 5.0 $\mu\text{mol/L}$ TMA plus 2.0 J/cm^2 of BL.

Results: Under BL-TMA, no mutagenic crosslinks, no photocleavage and neither photooxidative lesions were detected on isolated plasmid DNA. TMA showed high anti-proliferative activity on DU145 cells through induction of apoptosis. Besides ROS generation, the proapoptotic effect seemed to be related to activation of p38 and inhibition of p44/42 phosphorylation. Interestingly, the decrease in nuclear β -catenin was coupled with a significant dropping of CD44-positive cells.

Conclusion: Overall, our results indicate that TMA can be activated by BL and may be considered for targeted phototherapy of prostate cancer lesions.

1 | INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the most frequent disease among male subjects. Conventional therapies may lead to recurrence and progression of disease,¹ being necessary the development of new approaches. Among these, photodynamic therapy (PDT) is a promising strategy in delivering focal treatment in PCa.² PDT involves the use of a photosensitizer, quite harmless in the dark, that generates cytotoxic reactive oxygen species (ROS) upon visible light irradiation. Besides porphyrin derivatives in PDT, furocoumarins (ie, 8-methoxypsoralen, 8-MOP) are

employed with ultraviolet A light (UVA) in PUVA (psoralen plus UVA) therapy to treat several skin diseases for patients with moderate-to-severe psoriasis, eczema, vitiligo, mycosis fungoides³ and some autoimmune disorders such as cutaneous T-cell lymphomas, graft-vs-host disease, systemic sclerosis and Crohn's disease through an extracorporeal therapy called photopheresis.⁴

Furocoumarins comprise natural and synthetic compounds: linear molecules, so called psoralens, and the angular ones, the angelicins. The photobiological effects of furocoumarins plus UVA are mainly related to their capacity to bind DNA and form monoadducts (MAs) and

interstrand crosslinks (XLS), mainly with pyrimidine bases. Furthermore, furocoumarins produce ROS that impair cellular functions through lipid peroxidation, oxidation of guanine and strand breaks in nucleic acids, oxidation of proteins and inactivation of enzymes.⁵ It is known that the combination of 8-MOP and UVA radiation causes apoptosis of treated leucocytes and may cause preferential apoptosis of activated or abnormal T cells. Moreover, these apoptotic cells may promote immune tolerance, production of antigen-specific regulatory lymphocytes (CD4/8 T, B) and rebalance of immune system.⁶

Even though furocoumarins possess high chemotherapeutic potency under UVA and lack toxicity in the dark, genotoxicity, mutagenicity and skin phototoxicity have been observed.^{7,8}

In the attempt to improve the activity of psoralens and avoid severe side effects thought to be mainly related to the formation of XLS, a variety of derivatives, hopefully monofunctionals, have been synthesized. Although angelicins, due to their angular geometry, do not generally form XLS, some of them, that is 4,6,4'-trimethylangelicin (TMA), are reported to crosslink certain types of folded DNA upon UVA irradiation.⁹ 8-MOP was found to photoreact under blue light (BL) leading to less mutagenic lesions in the DNA, that is preferentially MAs over XLS.¹⁰ Recently, we have demonstrated that 8-MOP, upon BL, exerts anti-proliferative effects in DU145 PCa cells.¹¹ Furthermore, cells treated with 419 nm light resumed normal growth rates faster than cells which received the same UVA dose.¹²

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Irradiation apparatus

UVA irradiation was carried out using 1 Philips HPW 125 lamp, mainly emitting at 365 nm. BL was delivered to the samples by the Waldmann UV436HF apparatus, mainly emitting at around 417 nm. The total energy hitting the sample was monitored by means of a radiometer (Variocontrol; Waldmann, Villingen-Schwenningen, Germany), equipped with a Variocontrol UV Sensor (Waldmann). The radiant power emitted by the UVA and BL lamp was about 8 and 20 mW/cm², respectively. All samples (isolated DNA and cell cultures) were maintained at room temperature during irradiation.

2.2 | Detection of interaction between TMA and isolated DNA

Strand breaks, photooxidative damage and XL formation were verified on pBR322 plasmid DNA as described previously.⁹ DNA was irradiated with various BL and UVA radiant exposures (up to 15.0 J/cm²) with 300.0 μmol/L TMA (Figure S1), kindly provided by Professor Adriana Chilin (University of Padova). Samples kept in the dark or only irradiated were used as controls.

2.3 | Cell cultures

Human PCa cell line DU145 (Cell Lines Service, GmbH, Eppelheim, Germany) was cultured as described previously.⁹ Cells (2.6×10^4 /cm²)

were seeded into 24-well plates. After 24 hours, medium was removed and replaced with MEM w/o phenol red (Sigma-Aldrich) containing TMA concentrations up to 10.0 μmol/L. After 1 hour of incubation in the dark, cultures were irradiated with UVA light or BL (2.0 J/cm²). Then, media were removed and replaced with fresh medium. Sphere formation, ROS generation, CD44 expression and apoptosis rate were determined as in.⁹ Briefly, to evaluate sphere formation, immediately after irradiation, cells were detached, seeded (3.3×10^3 /cm²) into each well of low-attachment 24-well plates and cultured for 13 days with sphere formation medium composed of DMEM/F-12 (3:1, v/v) (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 0.4% BSA (Sigma-Aldrich), 0.4% B27 (Gibco), 1% L-glutamine and 1% antibiotics. Then, cultures were observed using phase-contrast microscope Nikon T-s (Shinagawa, Tokyo, Japan) and photographed at 40x magnification. Spheres diameters and number were determined using ImageJ tools.

2.4 | Western blot

At 24 hours, total proteins were isolated by lysis buffer, whereas nuclear proteins by Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Protein separation, electroblotting and detection of target proteins were carried out as in⁹ with primary polyclonal rabbit anti-human GAPDH, phospho(Thr180/Tyr182)-p38, phospho(Thr202/Tyr204)-p44/42 (Cell Signaling Technologies, Danvers MA, USA), β-catenin and laminB1 (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) (1:500, v/v) antibodies. Data were reported as ratio within target protein and relative housekeeping protein expression.

2.5 | Statistical analysis

Data, obtained from at least 3 experiments, were expressed as mean ± the standard error of the mean. The difference between groups was evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Student's *t* test.

3 | RESULTS

3.1 | Lesions induced by TMA on DNA under BL and UVA irradiation

Thin-layer chromatography followed by [H]NMR demonstrated that, although at a lower yield than under UVA, TMA plus BL was able to form MAs in salmon testes DNA (data not shown). To verify the ability of TMA to form XLS, alkali denatured linearized pBR322 DNA was loaded on denaturing agarose gel (Figure 1A). When XLS were formed, double-strand (ds) DNA was unable to denature and ran slower than the 2 single strands (ss). XLS formed even at the lowest UVA exposure (2.0 J/cm²) along with the ss-DNA; their formation seemed complete upon 12.0 and 15.0 J/cm². The slower migration of crosslinked DNA was a function of the light dose reflecting the increasing number of XLS and MAs per molecule. On the contrary, at the highest doses of BL, TMA behaved monofunctionally without any trace of undenatured crosslinked DNA. Moreover, the 2 ss-DNA bands appeared to run faster compared to the controls as the

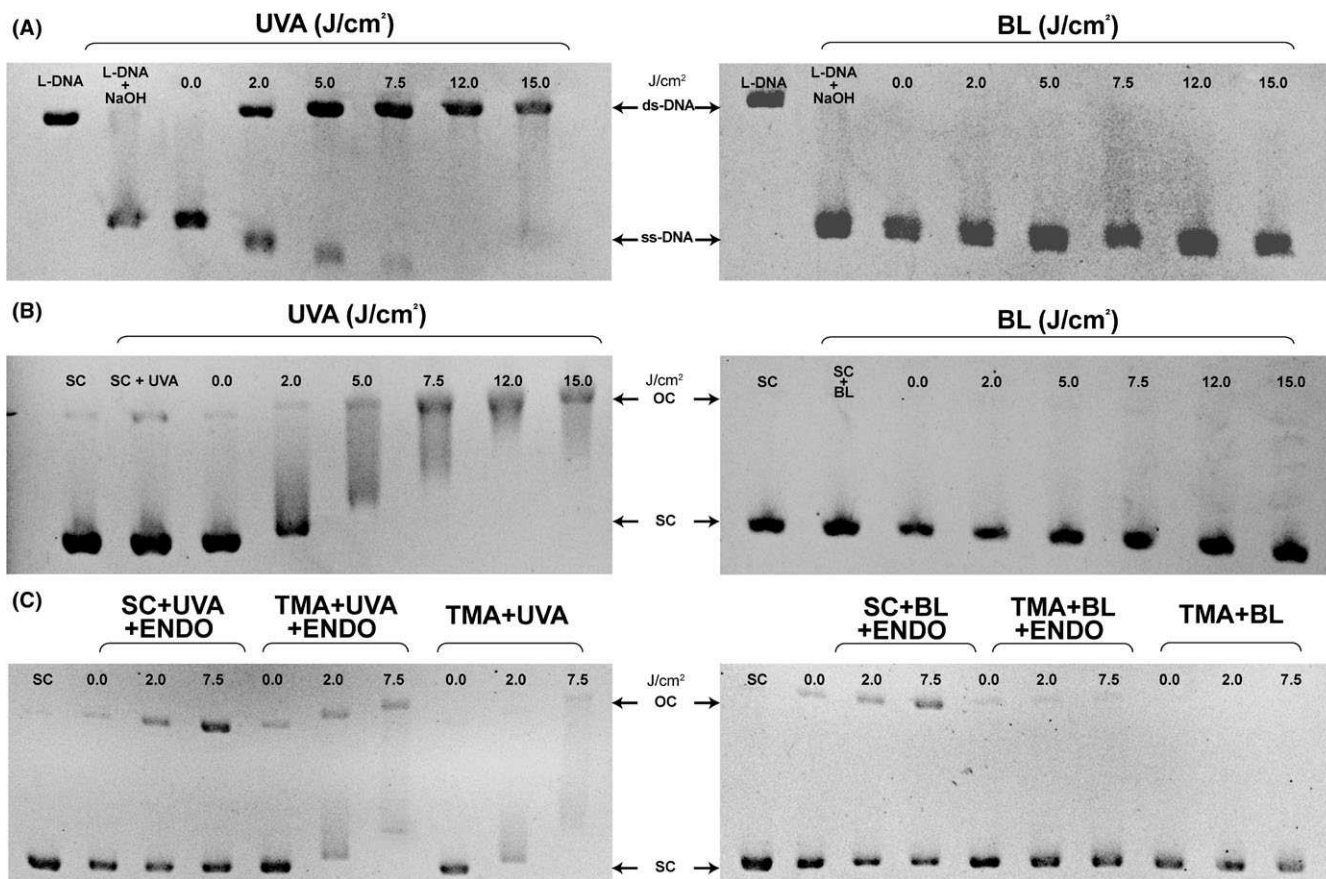
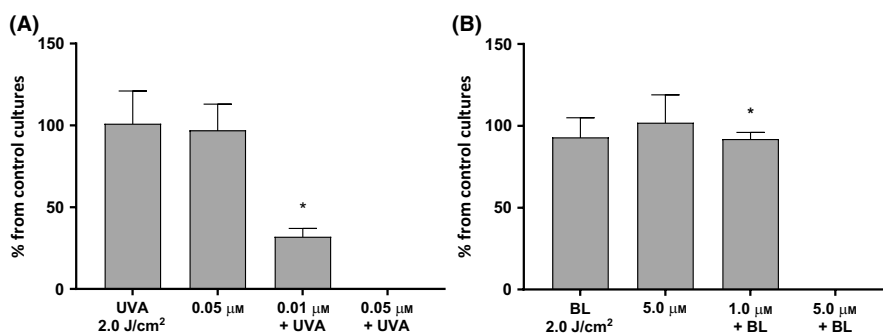


FIGURE 1 (A) Photosensitization of linearized pBR322 DNA (L) with 300.0 μmol/L TMA under UVA light and BL. The samples were treated with 0.2 mol/L NaOH, boiled for 10 min, placed quickly in ice and loaded in alkaline 1% agarose. L-DNA: undenatured DNA. L-DNA+UVA+NaOH and L-DNA+BL+NaOH: denatured and irradiated (15.0 J/cm²) samples. ds: double strand. ss: single strand. (B) Relaxation assay in supercoiled pBR322 DNA. pBR322 DNA treated with 300.0 μmol/L TMA was irradiated with UVA and BL. In the first 2 wells, dark (supercoiled, SC) and irradiated pBR322 DNA samples (UVA and BL, 15.0 J/cm²) were loaded. OC: open circular. (C) Photooxidative DNA damage. DNA base modifications photoinduced by TMA under UVA light and BL. SC: untreated SC plasmid pBR322 DNA; SC+ ENDO: pBR322 DNA digested with Endo III in the dark (0) and upon irradiation (2.0, 7.5 J/cm²); TMA + ENDO: pBR322 DNA with 300.0 μmol/L TMA in the dark (0) and upon irradiation after treatment with the enzyme Endo III

light increased, likely due to the presence of TMA-MAs containing furohydroxycinnamic derivatives resulting from the breakage of the pyrone ring by the alkali (Figure S2). Therefore, 2 more negative charges per TMA molecule bound to the DNA increased the migration of the separate strands towards the anode. These negative charges were surely present in the TMA crosslinked ds-DNA that contains also MAs, but probably did not increase its migration being masked inside the folded DNA.

When irradiated with BL, TMA did not induce any detectable cleavage on DNA and only the supercoiled (SC) form was present in all the samples (Figure 1B). On the contrary, under UVA, TMA relaxed the DNA with an increasing efficacy as the exposures augmented. Fragmentation of the strands was also visible as a smearing attesting the presence of multiforms of DNA differently modified by a varied number of photoadducts. It is noteworthy that as long as the SC DNA migrated slower as the UVA irradiation increased, under BL it happened the opposite. This

FIGURE 2 Sphere-forming assay. Cultures were irradiated with 2.0 J/cm² of UVA light (A) or BL (B). Student's *t* test, **P* < .05 vs untreated cultures taken as control



behaviour is likely due to the different types of photoadducts formed under the 2 lights and the resulting structure acquired by the plasmid.

The detection of DNA oxidative damage was achieved by the base excision enzyme Endo III, which recognizes 5,6-dihydropyrimidines induced by hydroxyl radicals and removes the oxidized base, leaving abasic sites. Notably, TMA in combination with BL induced less oxidation than BL alone (Figure 1C). However, both BL and UVA light

alone were able to induce a remarkable oxidative damage, higher than in the presence of TMA. Indeed, TMA molecules by absorbing the incoming radiation likely protected the macromolecule from photooxidation.

The quantification by densitometric analysis of each band of the gels shown in Figure 1 is reported in Figure S3 of the Supporting Information.

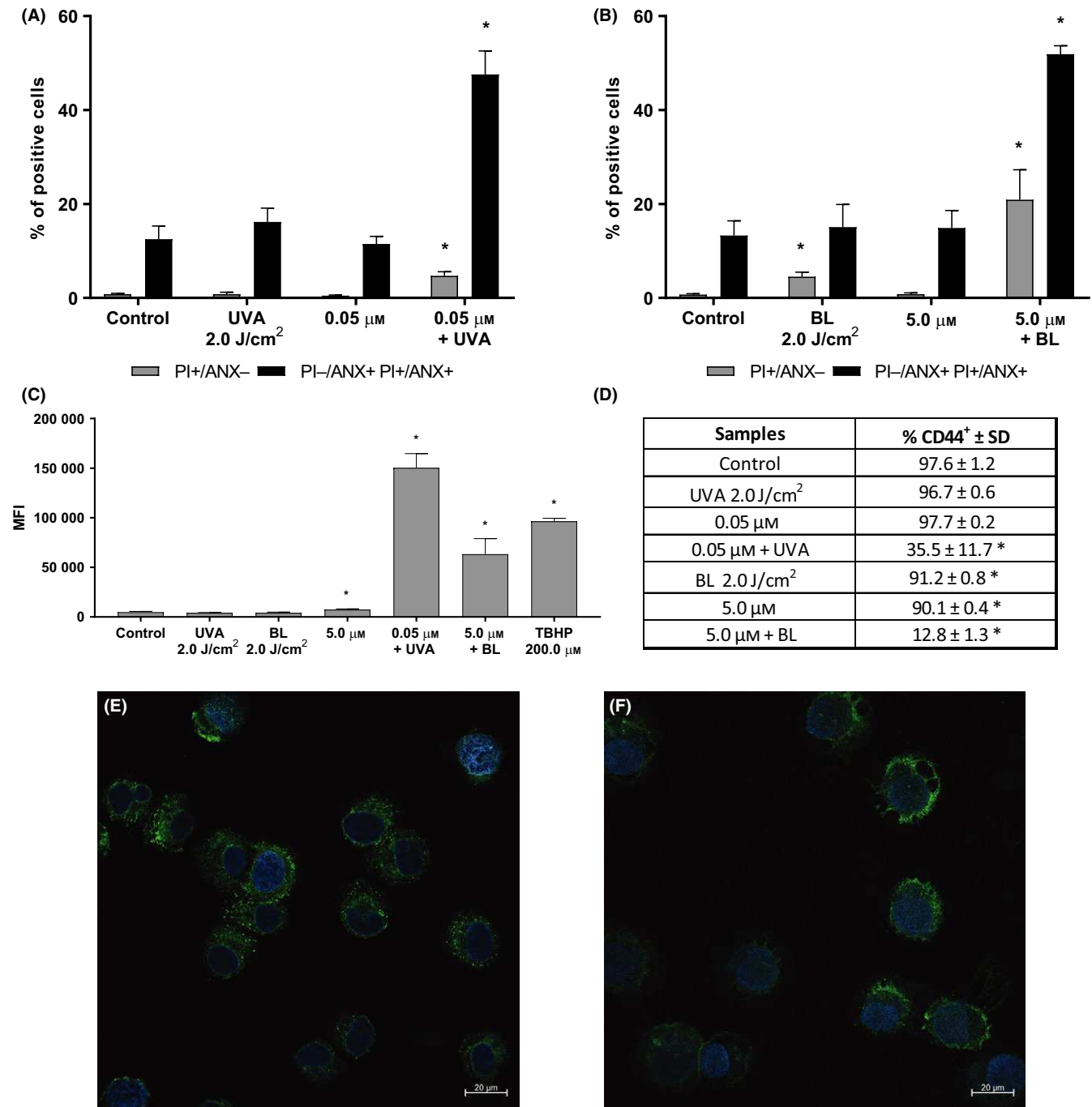


FIGURE 3 Effects on cell apoptosis, ROS formation and CD44 expression. Cultures were irradiated with 2.0 J/cm² of UVA light or BL. (A, B) Cell apoptosis. PI: propidium iodide; ANX: annexin V. (C) ROS generation. TBHP: tert-butyl hydrogen peroxide. (D) Cytofluorimetric data are reported as percentage of CD44-positive cells. Student's *t* test, **P* < .05 vs untreated cultures taken as control. Representative micrographs of untreated cell cultures (E) and cultures exposed to 5 μmol/L TMA plus BL (F). Immunoreactivity towards CD44-stained green, whereas nuclei were labelled with DAPI (blue). Bars: 20 μm

3.2 | Effects on DU145 PCa cells

To evaluate the anti-proliferative activity of TMA, DU145 cells were incubated with TMA (0.01–10.0 $\mu\text{mol/L}$) and irradiated with 2.0 J/cm^2 of UVA or BL. Then, detached cells were seeded to carry out the sphere-forming assay. TMA was more effective after UVA irradiation than under BL one (Figure 2). Lack of sphere formation was observed with 0.05 $\mu\text{mol/L}$ TMA upon UVA ($\text{IC}_{50} = 0.017 \mu\text{mol/L}$), whereas 100-fold higher concentration (5.0 $\mu\text{mol/L}$) was needed to achieve the same effect after BL ($\text{IC}_{50} = 2.47 \mu\text{mol/L}$). No significant variation was detected with samples treated with light alone or TMA in the dark. Further experiments were performed by treating monolayer cultures with 0.05 and 5.0 $\mu\text{mol/L}$ TMA activated by UVA light and BL, respectively.

Reactive oxygen species generation, determined immediately after cell treatments, was significantly enhanced by photoactivated TMA. TMA plus UVA induced higher levels of ROS than plus BL (Figure 3C).

Small but significant increases were noted in cultures treated with the compound without light. ROS generation was unaffected by UVA light or BL alone.

At 48 hours, TMA with either UVA light and BL significantly enhanced the percentages of apoptotic annexin V-positive cells and, at lower yield, those of necrotic propidium iodide-positive cells compared to non-treated cultures (Figure 3A,B). No significant variations were detected in cultures treated with light alone or TMA in the dark. Nevertheless, the

presence of large vacuoles inside the treated cells suggests that also autophagy may contribute to the anti-proliferative effects of TMA.¹³

DU145 cell cultures comprised a high percentage (about 98%) of cells expressing CD44 (Figure 3D). Significant decreases in CD44-positive cells were detected at 48 hours from treatment with the TMA under both lights, being BL more effective (about 12%) than UVA light (about 35%). Although to a lesser extent than upon TMA photoactivation, 5.0 $\mu\text{mol/L}$ TMA in the dark and BL alone lowered CD44 expression.

The expression levels of phosphorylated p38 were significantly enhanced in cultures treated with TMA plus UVA light or BL compared to non-treated cells (Figure 4, Figure S4). On the contrary, the amount of phosphorylated p44/42 was decreased by photoactivated TMA. Notably, also cultures treated with TMA alone presented lower expression of ERK $\frac{1}{2}$ than controls. Nuclear β -catenin expression was significantly lowered by TMA plus UVA light or BL.

DISCUSSION

Our data demonstrated that TMA activated by either UVA light or BL exerts strong anti-proliferative effects on DU145 cells through induction of apoptosis. Although inhibition of sphere formation under BL was achieved at concentration 100-fold higher than under UVA, different kinds of lesions were induced. Indeed, MAs were formed in *salmon testes* DNA under both lights, but XLs were detected in

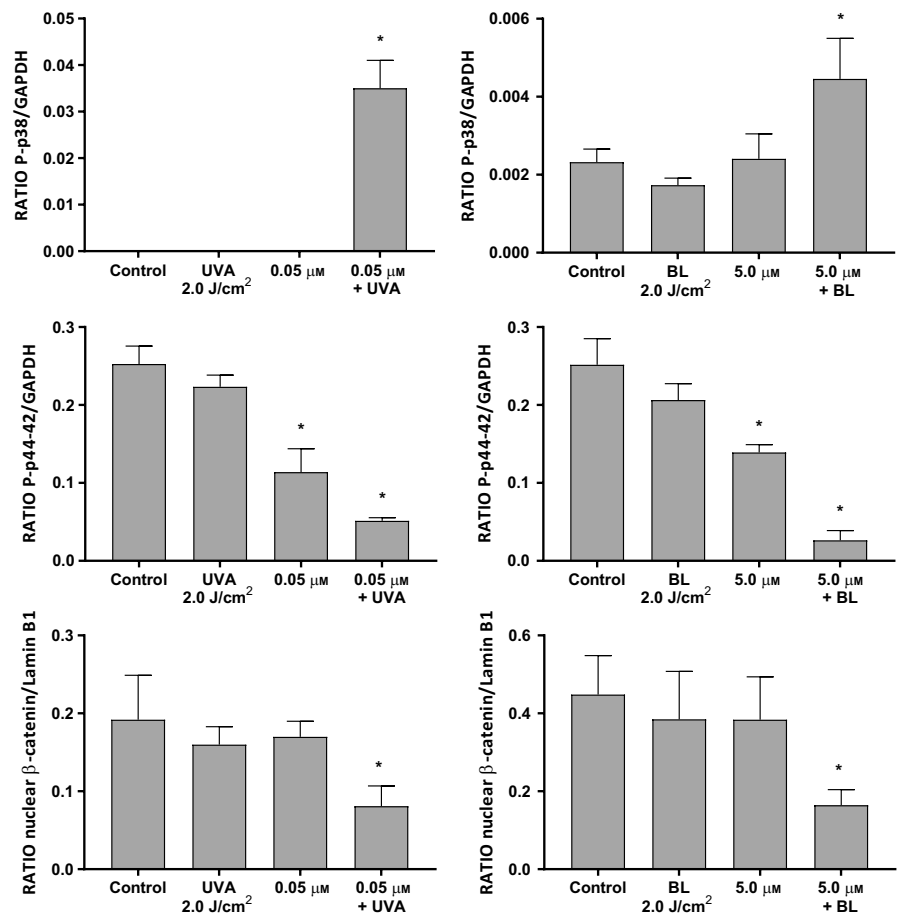


FIGURE 4 WB analysis. Cultures were treated with 0.05 $\mu\text{mol/L}$ TMA plus 2.0 J/cm^2 UVA light or 5.0 $\mu\text{mol/L}$ plus BL. The quantification of protein expression levels was performed by densitometric analysis of the bands using ImageJ processing software. Data are reported as ratio between target protein and relative GAPDH expression. * $P < .05$ vs untreated cultures taken as control

pBR322 DNA only under UVA light. Moreover, both TMA-induced DNA photocleavages and photooxidations under UVA were not detected under BL. Accordingly, the production of ROS measured in the TMA-treated cells was less efficient under BL compared to UVA light. It is known that the oxidative lesions are as important as strand breaks for cellular function and survival.¹⁴

The results obtained under BL are very satisfactory assuming that the formation of less mutagenic lesions could be negligible and even absent in the DU145 cells when TMA activation is achieved through less noxious and more penetrating wavelengths. However, a significant amount of DNA lesions, that is MAs, can justify the effects on cell growth. In previous experiments with 8-MOP on the same cells, we assumed that XLs likely play a minor role in the anti-proliferative effects.⁹

Our findings indicate that the strong TMA photocytotoxicity can be related to the kind and number of DNA lesions; BL, compared to UVA light, can activate TMA as well, although at higher concentrations, but without the potential risk of mutagenic lesions.¹⁵

TMA activated by both UVA light and BL induced cell death by apoptosis enhancing the phosphorylation of p38 whose pathway modulates cell cycle checkpoints, cell apoptosis and autophagy.¹⁶ Furthermore, as in photopheresis, apoptotic bodies induced by TMA treatment with BL and UVA light, and the following antigen presentation by dendritic cells (DCs), could modulate the immune system, increasing the photoantiproliferative effect. It must be also noted that, despite UVA light, BL irradiation (2.5 J/cm²) does not impair the in vitro differentiation and maturation of human monocyte-derived DCs and reduces the production of pro-inflammatory cytokines.¹⁷

On the contrary, cultures treated with photoactivated TMA showed decreases in phosphorylation of p44/42 MAPK (ERK $\frac{1}{2}$), usually activated by growth factors and mitogens leading to anti-apoptotic effects.¹⁸ Taken together, our data agree to the observation that p38 signalling can indirectly regulate ERK $\frac{1}{2}$.¹⁹

Decreases in p44/42 phosphorylation were detected also in cultures treated with the compound in the dark, suggesting that TMA could interact with molecular targets without photoactivation. It has been demonstrated that in the dark some angelicins are able to inhibit NF-kB/DNA interactions demonstrating anti-inflammatory profile²⁰ and TMA has shown to be an effective enhancer of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.²¹

Photoactivation of TMA by either UVA light or BL affected the canonical Wnt signalling pathway as the nuclear accumulation of β -catenin decreased. The binding of Wnt ligands to Frizzled (Fz) receptors or low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) co-receptors inhibits degradation of cytoplasmic β -catenin that translocates into the nucleus leading to transcription of genes. Dysregulation of Wnt signalling has been associated with several types of cancers, including PCa.²²

Notably, the decrease in nuclear β -catenin was coupled to significant lowering of CD44-positive cells, being TMA plus BL more effective than TMA plus UVA light. The reduction in CD44-positive cells detected also in cultures treated with the compound alone may be related to the lowering of p44/42 MAPK phosphorylation, as pERK regulates CD44 expression.²³

Several evidences have shown that CD44 is overexpressed in several cancers as marker of cancer stem cells (CSCs). Thus, in the last years, the therapeutically targeting of CD44 has been attempted through various approaches.²⁴ In PCa, CD44 expression levels positively correlate to the cancer stage and can predict the therapeutic response to the treatment.²⁵ Our findings suggest a relation between CD44 and Wnt pathway. CD44 is not only a Wnt target gene but also a positive regulator of Wnt pathway through interaction with LRP6.²⁶ Indeed, nuclear translocation of β -catenin is inhibited by silencing CD44 in several cancer cells, including PCa cell lines.²⁷

Overall, our results indicate, for the first time, that TMA can be activated by BL, although at higher concentrations than UVA light, decreasing the risk of mutagenic lesions on treated cells. Thus, the toxicity of both light and compound itself on neighbouring healthy cells could be overcome with a BL-TMA-targeted treatment in the site of the cancer lesions. Besides ROS generation, the proapoptotic effects on DU145 cells seem to be related to activation of p38 and inhibition of p44/42 phosphorylation. Interestingly, photoactivated TMA was able to affect Wnt signalling and CD44 expression, both involved in CSC growth and renewal. To investigate the interaction between these 2 hallmarks of CSCs after treatment with BL-TMA, molecular docking studies will be carried out to verify whether TMA can bind CD44 and expression levels of Wnt target genes as well as glycogen synthase kinase-3b, involved in β -catenin degradation, will be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was granted by University of Padova, PRAT project n. CPDA150854.

ORCID

G. Miolo  <http://orcid.org/0000-0003-1095-7124>

G. Sturaro  <http://orcid.org/0000-0002-2278-6492>

L. Menilli  <http://orcid.org/0000-0003-2774-6411>

REFERENCES

1. Valerio M, Ahmed HU, Emberton M, et al. The role of focal therapy in the management of localised prostate cancer: a systematic review. *Eur Urol*. 2014;66:732-751.
2. Gheewala T, Skwor T, Munirathinam G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. *Oncotarget*. 2017;8:30524-30538.
3. Schneider LA, Hinrichs R, Scharffetter-Kochanek K. Phototherapy and photochemotherapy. *Clin Dermatol*. 2008;26:464-476.
4. Trautinger F, Just U, Knobler R. Photopheresis (extracorporeal photochemotherapy). *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12:22-28.
5. Averbek D. Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. *Photochem Photobiol*. 1989;50:859-882.
6. Xia CQ, Campbell KA, Clare-Salzler MJ. Extracorporeal photopheresis-induced immune tolerance: a focus on modulation of antigen-presenting cells and induction of regulatory T cells by apoptotic cells. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009;14:338-343.
7. Walker D, Jacobe H. Phototherapy in the age of biologics. *Semin Cutan Med Surg*. 2011;30:190-198.

8. Averbeck D. Relationship between lesions photoinduced by mono- and bi-functional furocoumarins in DNA and genotoxic effects in diploid yeast. *Mutat Res.* 1985;151:217-233.
9. Chen X, Kagan J, Miolo G, Dall'Acqua F, Averbeck D, Bisagni E. Photosensitized cross-linking and cleavage of pBR322 and M13 DNA: comparison of 4,4',6-trimethylangelicin and 3-carbethoxypsoralen. *J Photochem Photobiol B.* 1994;22:51-57.
10. Gasparro FP, Gattolin P, Olack GA, Deckelbaum LI, Sumpio BE. The excitation of 8-methoxypsoralen with visible light: reversed phase HPLC quantitation of monoadducts and cross-links. *Photochem Photobiol.* 1993;57:1007-1010.
11. Sturaro G, Cigolini G, Menilli L, et al. Antiproliferative activity of 8-methoxypsoralen on DU145 prostate cancer cells under UVA and blue light. *Photochem Photobiol Sci.* 2017;16:1182-1193.
12. Schmitt IM, Maxwell VM, Olack GA, Edelson RL, Chimenti S, Gasparro FP. The specific effects of 8-methoxypsoralen photoadducts on cell growth: HPLC analysis of monoadduct and crosslink formation in cells exposed to split-dose treatment. *J Photochem Photobiol, B.* 1994;22:17-21.
13. Lin SR, Fu YS, Tsai MJ, Cheng H, Weng CF. Natural compounds from herbs that can potentially execute as autophagy inducers for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18:E1412.
14. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1-14.
15. Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res.* 2003;531:37-80.
16. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010;429:403-417.
17. Monfrecola G, Lembo S, Cantelli M, et al. The effect of visible blue light on the differentiation of dendritic cells in vitro. *Biochimie.* 2014;101:252-255.
18. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life.* 2006;58:621-631.
19. Li SP, Junttila MR, Han J, Kahari VM, Westermark J. p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1,2. *Cancer Res.* 2003;63:3473-3477.
20. Marzaro G, Guiotto A, Borgatti M, et al. Psoralen derivatives as inhibitors of NF-kappaB/DNA interaction: synthesis, molecular modeling, 3D-QSAR, and biological evaluation. *J Med Chem.* 2013;56:1830-1842.
21. Favia M, Mancini MT, Bezzeri V, et al. Trimethylangelicin promotes the functional rescue of mutant F508del CFTR protein in cystic fibrosis airway cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;307:L48-L61.
22. Kypta RM, Waxman J. Wnt/beta-catenin signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2012;9:418-428.
23. Roeder SS, Barnes TJ, Lee JS, et al. Activated ERK1/2 increases CD44 in glomerular parietal epithelial cells leading to matrix expansion. *Kidney Int.* 2017;91:896-913.
24. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic target. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4:1033-1043.
25. Korski K, Malicka-Durczak A, Breborowicz J. Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens. *Pol J Pathol.* 2014;65:291-295.
26. Schmitt M, Metzger M, Gradl D, Davidson G, Orian-Rousseau V. CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation. *Cell Death Differ.* 2015;22:677-689.
27. Han J, Gao B, Jin X, et al. Small interfering RNA-mediated downregulation of beta-catenin inhibits invasion and migration of colon cancer cells in vitro. *Med Sci Monit.* 2012;18:BR273-BR280.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Miolo G, Sturaro G, Cigolini G, et al. 4,6,4'-trimethylangelicin shows high anti-proliferative activity on DU145 cells under both UVA and blue light. *Cell Prolif.* 2018;51:e12430. <https://doi.org/10.1111/cpr.12430>