

**RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE**  
Programma Short Term Mobility 2015

**Fruitore:** Carmelinda Savino

**Istituto di afferenza:** Istituto di Biologia e Patologia Molecolari (IBPM)

**Istituzione ospitante:** Columbia University Medical Center, Department Of Physiology and Cellular Biophysics, New York (U.S.A.).

**Titolo del programma:** Struttura e funzione della famiglia di enzimi SRD5A che potenziano l'azione del testosterone.

STATO DELL'ARTE

Il cancro della prostata è il tumore maligno più comune negli uomini e la seconda causa di morte per cancro negli Stati Uniti e in Europa. Nella maggior parte dei casi, i meccanismi molecolari responsabili per il suo sviluppo e per l'insorgenza della forma più aggressiva (hormone-refractory prostate cancer, HRPC) sono legate a disturbi ormonali che interessano i recettori androgeni. In particolare gli androgeni legandosi ai loro recettori ormonali giocano un ruolo critico nello sviluppo, nella crescita e nella patogenesi dell'iperplasia prostatica benigna (BPH) e del cancro della prostata (PC). Negli esseri umani e nei mammiferi, gli androgeni più importanti sono il testosterone (T) e il diidrotestosterone (DHT), quest'ultimo in particolare è l'ormone preferito e più potente per la transattivazione del recettore degli androgeni [1]. Le cinque proteine di membrana appartenenti alla famiglia d'isoenzimi 5 $\alpha$ -reduttasi (SRD5A), costituite da 250-360 aminoacidi, sono coinvolte nella reazione che converte T in DHT [2]. Tre isoenzimi di SRD5A (SRD5A1-3) sono espressi nella prostata così come nel cervello e in organi periferici a diversi livelli, dipendendo dall'età e dal sesso. Alterazioni nella conversione di T in DHT causano un equilibrio anormale delle tre isoforme di 5 $\alpha$ -reduttasi e portano allo sviluppo di diverse patologie, fra cui nel peggiore dei casi il cancro alla prostata ormone-refrattario.

I membri della famiglia SRD5A sono coinvolti anche in altri meccanismi critici, fra cui la trasformazione di progesterone, desossicorticosterone, aldosterone e cortisolo in una serie di steroidi neuroattivi che regolano diverse funzioni nella fisiologia umana. Mutanti dei membri di questa famiglia sono stati trovati in malattie ereditarie mentali rare ed anche nello pseudo-ermafroditismo maschile [3-4].

Diverse molecole sono state sviluppate per inibire gli enzimi SRD5A e la maggior parte di queste sono farmaci utilizzati nella prevenzione e nel trattamento di molte malattie comuni [5], tra questi il finasteride e dutasteride, inibitori sintetici comunemente usati per trattare PC e prevenire BPH [6-7]. Tuttavia, la scarsa selettività degli inibitori attualmente disponibili per le singole isoforme e l'inattivazione a lungo termine della loro attività enzimatica causano gravi effetti collaterali di lunga durata, limitando l'uso e l'efficacia di questi farmaci in oncologia e in altre aree come la

terapia della calvizie maschile, la terapia sostitutiva ormonale e l'acne. Inoltre, mancano farmaci specifici che inibiscono l'attività SRD5A3 nella sindrome HRPC.

### OBIETTIVI

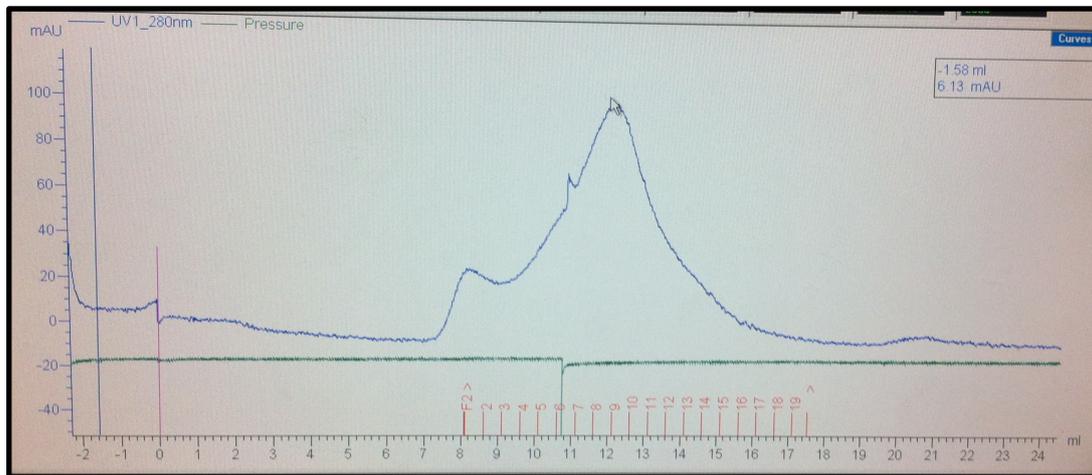
Lo scopo di questo progetto è lo studio, con tecniche biochimiche, biofisiche e cristallografiche, della relazione struttura-funzione dei membri della famiglia SRD5A, concentrando l'interesse sulla caratterizzazione delle interazioni con farmaci noti, come la finasteride e dutasteride. Questo prezioso risultato può essere raggiunto solo suddividendolo in piccoli passaggi e ottenendo risultati intermedi, come la selezione di buoni candidati, il clonaggio dei geni, l'espressione proteica, la purificazione e la cristallizzazione delle proteine. La determinazione della struttura della 5 $\alpha$ -reduttasi sarebbe preziosa per comprendere meglio il funzionamento questi enzimi e, dato il loro ruolo centrale in molti processi cellulari, potrebbe contribuire in modo sostanziale alla fisiologia umana. Inoltre, la sua struttura potrebbe fornire un modello molecolare per il migliorare il disegno razionale di farmaci. Lo sviluppo di agenti chemioterapici più specifici e con un numero minore di effetti collaterali avrebbe un enorme impatto con risultati sociali ed economici positivi, dando inoltre un enorme contributo alla medicina molecolare.

Il lavoro sperimentale è stato realizzato nell'ambito di una collaborazione tra l'unità della Biocrystal Facility dell'IBPM CNR, il Laboratorio di Biocristallografia del Dipartimento di Scienze Biochimiche dell'Università "Sapienza" di Roma (gruppo della Professoressa B. Vallone) ed il Dipartimento di Fisiologia e Biofisica Cellulare al Medical Center della Columbia University, Stati Uniti d'America (CUMC, gruppo del dottor F. Mancia), che ha un'eccellente competenza sulla caratterizzazione strutturale e funzionale delle proteine di membrana.

### RISULTATI SPERIMENTALI

Lo scopo della mia visita presso il laboratorio del dottor F. Mancia al Columbia University Medical Center (CUMC) ha il fine di effettuare studi strutturali sui membri della famiglia SRD5A e allo stesso tempo di acquisire le competenze necessarie per studiare la biochimica e la cristallizzazione delle proteine di membrana. Per questi studi è stato applicato un approccio di genomica strutturale. Tale approccio accelera l'acquisizione d'informazioni strutturali selezionando prima i possibili bersagli attraverso un'analisi bioinformatica di tutte le sequenze note di organismi diversi. Dopo una prima fase di clonaggio di 50 diverse sequenze di isoenzimi SRD5A provenienti da diversi organismi, è stata eseguita l'espressione su scala media di proteine in cellule di mammifero HEK 293. I test di espressione sono stati eseguiti esprimendo i nostri target come proteine di fusione con GFP, facilmente individuabili con un anticorpo anti-GFP in un'analisi Western Blot. Abbiamo anche compiuto una caratterizzazione biofisica preliminare, per valutare i livelli di espressione e la monodispersione delle proteine risultanti (prerequisiti importanti per ottenere successo nella fase di cristallizzazione) utilizzando una cromatografia di esclusione molecolare (SEC) accoppiata alla fluorescenza. Questa tecnica ci ha permesso anche di valutare la stabilità delle proteine espresse nei detergenti comunemente utilizzati per ottenere cristalli di proteine di membrana. La produzione delle proteine così selezionate è stata fatta su larga scala in cellule sia di mammifero sia d'insetti e le proteine sono state purificate utilizzando cromatografia per affinità seguita da SEC.

Più in dettaglio, durante la mia visita al laboratorio del Dr. Mancia ho lavorato sull'espressione e la purificazione di uno dei geni di interesse, SRD5 $\alpha$ 3 da *Homo sapiens*, fuso ad un 10X-His Tag. La proteina è stata espressa in 1 L di Sf9 e purificato mediante colonna di affinità per il Nickel e cromatografia Gel Filtration. Sebbene la maggior parte della proteina sia precipitata nel corso della purificazione, ho potuto ottenuto ca 0,1 mg di proteina monodispersa (Figura 1).



Cromatografia di esclusione molecolare (SEC) di SRD5 $\alpha$ 3 da *H. sapiens* eseguita in modo isocratico usando una colonna Superdex 200 10/300 seguendo il segnale in assorbanza a  $\lambda=280$  nm a 4°C.

Sono necessari altri studi per migliorare le rese di purificazione, in modo da ottenere una quantità sufficiente di proteina per gli esperimenti di cristallizzazione, utilizzando i metodi di cristallizzazione in diffusione del vapore in fase acquosa con detergenti ed in fase cubica di lipidi ricostituiti (Lipid Cubic Phase). La diffrazione dei cristalli ottenuti sarà misurata utilizzando la radiazione di sincrotrone e la determinazione della struttura sarà fatta utilizzando proteine mutate con seleniometionina. Gli enzimi saranno caratterizzati dal punto di vista biochimico e funzionale, sia seguendo la formazione dei prodotti di reazione mediante GC-MS sia seguendo il consumo NADPH.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] Wilson JD, 1972, N Engl J Med
- [2] Azzouni et al, 2012, Adv Urol
- [3] Kahrizi et al, 2011, Eur J Hum Genet
- [4] Imperato et al, 1974, Science
- [5] Cilotti et al, 2001, J Endocrinol Invest
- [6] Thompson et al, 2003, N Engl J Med
- [7] Andriole et al, 2010, N Engl J Med

Roma, 10.07.2015