

Ruolo del lattato nelle vie di segnalazione connesse a farmaco-resistenza e progressione neoplastica

La resistenza intrinseca o acquisita ai chemioterapici è uno dei maggiori ostacoli al successo dei trattamenti antineoplastici. Sebbene la farmaco resistenza possa generarsi con meccanismi diversi, studi recenti hanno dimostrato che le particolari caratteristiche metaboliche delle cellule tumorali possono essere uno dei fattori responsabili della riduzione della efficacia dei farmaci. Come noto, il metabolismo energetico delle cellule tumorali si basa su un elevato consumo di glucosio, che si traduce in una aumentata produzione di acido lattico (il cosiddetto effetto Warburg).

Sebbene la scoperta di questa caratteristica metabolica risalga a quasi un secolo fa, è solo da pochi anni che sono state ottenute evidenze di una correlazione diretta tra aumentato metabolismo glicolitico e alterazioni nella espressione genica delle cellule.

L'enzima lattato deidrogenasi (LDH) è cruciale per il mantenimento del flusso glicolitico delle cellule tumorali (1). Infatti la riduzione del piruvato a lattato operata dalla LDH rigenera rapidamente il NAD⁺, necessario per i primi passaggi del metabolismo del glucosio. Questo enzima è considerato un "target" interessante per lo sviluppo di nuovi trattamenti antineoplastici e sempre maggiori evidenze indicano che la sua inibizione o ridotta espressione aumentano l'efficacia dei chemioterapici (2-4). Questi risultati potrebbero essere spiegati da una inibizione del metabolismo energetico causata dalla riduzione dell'attività di LDH, con conseguente impedimento delle reazioni di riparazione del DNA, che richiedono elevati livelli di ATP. Un ulteriore meccanismo potrebbe essere legato alle funzioni non metaboliche di LDH, in particolare della sua isoforma A (LDH-A). È stato infatti osservato che LDH-A è in grado di traslocare nel nucleo e prendere parte a complessi di proteine che regolano la trascrizione genica (5). Per finire il lattato (prodotto della reazione di LDH) è uno dei metaboliti coinvolti nella regolazione della espressione genica (6).

Il possibile ruolo del lattato nella trascrizione genica è stato ipotizzato a seguito della identificazione di sequenze responsive a questo metabolita nelle regioni promoter che regolano l'espressione di geni coinvolti nel rimodellamento dei tessuti (7). Più recentemente, è stata dimostrata la capacità del lattato di inibire gli enzimi istone-deacetilasi e anche di interagire direttamente con i residui di lisina degli istoni, causandone la "lattilazione" (8). Questa modifica riduce la carica positiva degli istoni e la loro interazione con il DNA, favorendone, quindi, direttamente la trascrizione. Nel complesso, questi dati suggeriscono che il lattato possa avere un ruolo importante nella regolazione della espressione genica.

1) Obiettivi – L’obiettivo del progetto di ricerca sarà di mettere in evidenza il contributo di questi effetti epigenetici del lattato nel promuovere i meccanismi di farmaco-resistenza delle cellule neoplastiche e l’attivazione di “pathways” suggestivi di progressione neoplastica. In particolare, primo argomento di studio sarà la valutazione ruolo del lattato nella attivazione del “pathway” di EGFR, notoriamente associato al fenomeno di farmaco-resistenza (9).

2) Materiali e metodi – Saranno utilizzate linee cellulari rappresentative di neoplasie umane, caratterizzate da diversi assetti metabolici. In studi precedenti sono già state individuate linee di tumore alla mammella caratterizzate da basso livello di glicolisi (MCF7) e alto livello di glicolisi e produzione di lattato (MDA-MB-231). Altro modello di studio sarà l’adenocarcinoma del colon, di cui sono disponibili linee caratterizzate da metabolismo prevalentemente ossidativo (SW620) o più dipendente dalla glicolisi (CaCo2, HT-29).

Più specificamente, per lo studio della attivazione del pathway di EGFR verranno utilizzate le linee MDA-MB-231 e HT-29, nelle quali è stato messo in evidenza un buon livello di espressione di questo recettore. Evidenze ottenute nel corso di studi precedenti (10) hanno tuttavia dimostrato che una prolungata esposizione al lattato può essere in grado di indurre evidenze di attivazione del pathway di EGFR anche in linee cellulari che normalmente non dipendono da questa via di segnale (per es. MCF7).

Le colture saranno sempre mantenute in un terreno contenente valori fisiologici di glucosio (1g/l) e la loro esposizione al lattato verrà modificata aggiungendo direttamente questo metabolita al mezzo di coltura. In esperimenti precedenti è stato già osservato che l’aggiunta di 10-20 mM di lattato al terreno di coltura è in grado di aumentare significativamente il livello di acetilazione dell’istone H3. Al contrario, per valutare gli effetti causati dalla deprivazione del metabolita verrà usato un inibitore dell’enzima LDH (ossamato).

Questa procedura consentirà di mettere in relazione il livello di lattato a cui sono esposte le cellule con variazioni dell’espressione genica. In particolare, verrà valutata l’espressione di geni associati alla attivazione del pathway di EGFR, coinvolti nella risposta al trattamento con chemioterapici di comune uso clinico, nella regolazione del ciclo cellulare e della crescita infiltrativa. L’espressione genica sarà valutata mediante Real-Time PCR (RT-PCR). I dati ottenuti con la RT-PCR verranno confermati con analisi di immunoblotting, saggi enzimatici, fenotipici, di vitalità cellulare e di valutazione del danno al DNA.

3) Risultati attesi – Con gli esperimenti programmati saranno messi in evidenza pathways cellulari coinvolti nei fenomeni di farmaco-resistenza e dipendenti dagli effetti epigenetici del lattato; questi risultati consentiranno anche di identificare condizioni neoplastiche in cui la risposta ad un

determinato agente chemioterapico potrebbe essere significativamente migliorata dalla associazione con inibitori metabolici.

La modalità più diretta per ottenere una inibizione metabolica delle cellule tumorali con ridotta produzione di lattato dovrebbe essere l'inibizione dell'enzima LDH-A, notoriamente iper-espresso nei tessuti neoplastici. Lo studio di potenziali inibitori di questo enzima coinvolge diversi enti di ricerca da un certo numero di anni; tuttavia l'individuazione di un inibitore selettivo per l'isoforma A della LDH e potenzialmente adatto all'uso in vivo si sta rivelando più difficile del previsto. Studi precedenti condotti dal gruppo di ricerca (10) hanno mostrato che un aumentato livello di lattato nelle cellule neoplastiche è anche in grado di indurre l'attivazione di segnali che, a loro volta, promuovono ulteriormente il metabolismo glicolitico e la produzione di lattato. Verrà quindi valutata anche la possibilità di ottenere una inibizione metabolica delle cellule tumorali in maniera indiretta, attraverso lo "spegnimento" delle vie di segnalazione attivate da questo metabolita.

Bibliografia

1. Fiume L, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. *Future Med Chem.* 2014; 6: 429-445.
2. Manerba M, et al. Lactate dehydrogenase inhibitors sensitize lymphoma cells to cisplatin without enhancing the drug effects on immortalized normal lymphocytes. *Eur J Pharm Sci.* 2015; 74: 95-102.
3. Fiume L, et al. Inhibition of lactic dehydrogenase as a way to increase the anti-proliferative effect of multi-targeted kinase inhibitors. *Pharm Res.* 2011; 63: 328-334.
4. Zhao Y, et al. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e532.
5. Boukouris AE, et al. Metabolic enzymes moonlighting in the nucleus: metabolic regulation of gene transcription. *Trends Biochem Sci.* 2016; 41: 712-730.
6. Latham T, et al. Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 4794-4803.
7. Formby B, et al. Lactate-sensitive response elements in genes involved in hyaluronan catabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305: 203-208.
8. Zhang D, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* 2019; 574: 575-580.
9. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2017; 1652: 3-35.
10. Rossi V, et al. Lactate is a potential promoter of tamoxifen resistance in MCF7 cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2022 1866; 130185.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Modulo richiesta assegno

TUTOR	Nome e cognome	Giuseppina	Di Stefano
PRODUZIONE SCIENTIFICA TUTOR			
Punteggio VRA	0,96		

Commissione proposta 3 commissari + 1 supplente	Prof.ssa Giuseppina Di Stefano
	Prof. Andrea Bolognesi
	Prof.ssa Letizia Polito
	Prof. Maurizio Brigotti

TITOLO DEL PROGETTO		
Ruolo del lattato nelle vie di segnalazione connesse a farmaco-resistenza e progressione neoplastica		
ASSEGNO FINANZIATO DA PROGETTO COMPETITIVO <i>(barrare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
SE IL FINANZIAMENTO È COMPETITIVO L'ENTE FINANZIATORE		
PROGETTO/ATTIVITÀ A SCOPO COMMERCIALE <i>(es. sperimentazione profit)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
CARATTERISTICHE DEL PROGETTO <i>(biomedico/osservazionale/clinico-interventistico/multidisciplinare)</i>	Biomedico	
STATO DI APPROVAZIONE DEL PROGETTO DA PARTE DEL COMITATO ETICO <i>(se necessario per il tipo di studio barrare o evidenziare la casella corrispondente)</i> NON PREVISTO	<input type="checkbox"/> Ottenuto	<input type="checkbox"/> Da ottenere
DESCRIZIONE DEL PROGETTO <i>(max 800 parole)</i>		



(1)obiettivi, (2)materiali e metodi, (3) risultati/impatto attesi, (4) attività formativa e (5) di ricerca dell'assegnista

Premessa – Le cellule neoplastiche sono caratterizzate da un elevato consumo di glucosio che, metabolizzato attraverso la glicolisi, produce elevate quantità di lattato. Questo metabolita, un tempo considerato prodotto di scarto, è coinvolto nella modulazione della espressione genica. Il suo possibile ruolo nella trascrizione è stato ipotizzato a seguito della identificazione di sequenze responsive al lattato nelle regioni promoter che regolano l'espressione di geni coinvolti nel rimodellamento dei tessuti. Più recentemente, è stata dimostrata la capacità del lattato di inibire gli enzimi istone-deacetilasi e di interagire direttamente con i residui di lisina degli istoni, causandone la “lattilazione”. Questa modifica riduce la carica positiva degli istoni e la loro interazione con il DNA, favorendone quindi direttamente la trascrizione. Nel complesso, questi dati suggeriscono che il lattato possa avere un ruolo importante nella regolazione della espressione genica.

1) Obiettivi – L'obiettivo del progetto di ricerca sarà di mettere in evidenza il contributo di questi effetti epigenetici del lattato nel promuovere i meccanismi di farmaco-resistenza delle cellule neoplastiche e l'attivazione di pathways suggestivi di progressione neoplastica. In particolare, primo argomento di studio sarà la valutazione ruolo del lattato nella attivazione del pathway di EGFR, notoriamente associato al fenomeno di farmaco-resistenza.

2) Materiali e metodi – Saranno utilizzate linee cellulari rappresentative di neoplasie umane, caratterizzate da diversi assetti metabolici. In studi precedenti sono già state individuate linee di tumore alla mammella caratterizzate da basso livello di glicolisi (MCF7) e alto livello di glicolisi e produzione di lattato (MDA-MB-231). Altro modello di studio sarà l'adenocarcinoma del colon, di cui sono disponibili linee caratterizzate da metabolismo prevalentemente ossidativo (SW620) o più dipendente dalla glicolisi (CaCo2, HT-29).

Più specificamente, per lo studio della attivazione del pathway di EGFR verranno principalmente utilizzate le linee MDA-MB-231 e HT-29, nelle quali è stato messo in evidenza un buon livello di espressione di questo recettore. Dati ottenuti nel corso di studi precedenti (PMID: 35661802) hanno tuttavia dimostrato che una prolungata esposizione al lattato può essere in grado di indurre evidenze di attivazione del pathway di EGFR anche in linee cellulari che normalmente non dipendono da questa via di segnale (per es. MCF7).

Le colture saranno sempre mantenute in un terreno contenente valori fisiologici di glucosio (1g/l) e la loro esposizione al lattato verrà modificata aggiungendo direttamente questo metabolita al mezzo di coltura. In esperimenti precedenti è stato già osservato che l'aggiunta di 10-20 mM di lattato al terreno di coltura è in grado di aumentare significativamente il livello di acetilazione dell'istone H3. Al contrario, per valutare gli effetti causati dalla deprivazione del metabolita verrà usato un inibitore specifico dell'enzima LDH.

Questa procedura consentirà di mettere in relazione il livello di lattato a cui sono esposte le cellule con variazioni dell'espressione genica. In particolare, verrà valutata l'espressione di geni associati alla attivazione del pathway di EGFR, coinvolti nella risposta al trattamento con chemioterapici di comune uso clinico e nella regolazione del ciclo cellulare e della crescita infiltrativa. L'espressione genica sarà valutata mediante Real-Time PCR (RT-PCR). I dati ottenuti con la RT-PCR verranno confermati con analisi di immunoblotting, saggi enzimatici, fenotipici, di vitalità/morte cellulare e di valutazione del danno al DNA.

3) Risultati attesi – Con gli esperimenti programmati saranno messi in evidenza pathways cellulari coinvolti nei fenomeni di farmaco-resistenza e dipendenti dagli effetti epigenetici del lattato; questi risultati consentiranno anche di identificare condizioni neoplastiche in cui la risposta ad un determinato agente chemioterapico potrebbe essere significativamente migliorata dalla associazione con inibitori metabolici.

La modalità più diretta per ottenere una inibizione metabolica delle cellule tumorali con ridotta produzione di lattato dovrebbe essere l'inibizione dell'enzima LDH-A, notoriamente iper-espresso nei tessuti neoplastici. Lo studio di potenziali inibitori di questo enzima coinvolge diversi enti di ricerca da un certo numero di anni; tuttavia l'individuazione di un inibitore selettivo per l'isoforma A della LDH e potenzialmente adatto all'uso in vivo si sta rivelando più difficile del previsto. Studi precedenti condotti dal mio gruppo di ricerca (PMID: 35661802) hanno mostrato che un aumentato livello di lattato nelle cellule neoplastiche è anche in grado di indurre l'attivazione di segnali che, a loro volta, promuovono ulteriormente il metabolismo glicolitico e la produzione di



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

lattato. Verrà quindi valutata anche la possibilità di ottenere una inibizione metabolica delle cellule tumorali in maniera indiretta, attraverso lo “spegnimento” delle vie di segnalazione attivate da questo metabolita.

4) Attività formativa – L’assegnista avrà la possibilità di approfondire le sue conoscenze nell’ambito della biologia della cellula tumorale, con particolare riferimento alle caratteristiche metaboliche dei tessuti neoplastici ed ai fenomeni di farmaco resistenza.

5) Attività di ricerca – L’assegnista avrà la possibilità di approfondire la sua esperienza sulle principali metodologie sperimentali correntemente usate negli studi di biologia cellulare e molecolare.

DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DELL’ASSEGNISTA

(per i **nuovi** assegni: max 400 parole; competenze richieste, scansione temporale della formazione, scansione temporale dell’attività, obiettivi primari e secondari)

(per i **rinnovi**: max 600 parole – da integrare con la relazione dell’assegnista; formazione raggiunta, attività effettuata, obiettivi raggiunti/competenze acquisite, formazione ancora da acquisire (se pertinente), scansione temporale dell’attività durante il rinnovo)

Punti

Competenze richieste:

Titoli di studio: Laurea Magistrale in Biologia della Salute; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche e Neuromotorie (certificato di ammissione all’esame per il conseguimento del titolo).

Conoscenza delle principali metodiche usate negli studi di biologia cellulare: mantenimento delle colture cellulari, RT-PCR, immunoblotting, saggi colorimetrici e/o fluorimetrici, saggi di attività enzimatica, saggi metabolici, immunofluorescenza, valutazione del danno al DNA, test ELISA.

Esperienza nel campo dello studio delle caratteristiche metaboliche dei tessuti neoplastici, documentata da pubblicazioni con Impact Factor.

Scansione temporale della formazione e dell’attività: La formazione e l’attività sperimentale dell’assegnista proseguiranno durante tutto l’anno di durata dell’assegno di ricerca. L’articolazione degli esperimenti avverrà secondo lo schema descritto nel paragrafo precedente (Descrizione del Progetto) e sarà dettata dai risultati progressivamente ottenuti.

Obiettivi primari e secondari: Primari – Identificazione di pathways cellulari coinvolti nei fenomeni di farmaco resistenza e progressione neoplastica, dipendenti dagli effetti epigenetici del lattato. Secondari – Valutazione della possibilità di ottenere una inibizione metabolica delle cellule neoplastiche in maniera indiretta, agendo su pathways correlati alla proliferazione cellulare.

SE RINNOVO, SI RICORDA DI ALLEGARE ANCHE LA RELAZIONE DELL’ASSEGNISTA CON LA SUA PRODUZIONE SCIENTIFICA.

Scheda attività assistenziale (se prevista)

ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DELL’ASSEGNISTA/ N. ORE SETTIMANA (max 18 ore settimanali) NON PREVISTA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ

Si ricorda che, come previsto dagli Accordi sull'impiego nell'attività assistenziale dei Titolari di assegni di ricerca, sottoscritti tra l'Università di Bologna e le Aziende Ospedaliere di riferimento, una volta stipulato il contratto con il vincitore della selezione, il tutor deve consegnare alla Direzione Medica Ospedaliera la relativa modulistica, nella quale andranno riportate le attività qui segnalate.