

Titolo: Creazione di modelli di carcinoma ovarico difettivi per il complesso I della catena respiratoria

Stato dell'arte

La possibilità di colpire il metabolismo delle cellule tumorali è ad oggi un approccio promettente per il trattamento delle neoplasie umane, con una serie di farmaci attualmente testati per la loro efficacia e tossicità, in particolare gli inibitori del complesso I (CI) della catena respiratoria. Infatti, sebbene le cellule tumorali utilizzino preferibilmente la glicolisi aerobica per la produzione di energia, richiedono una catena respiratoria funzionale per sostenere la crescita maligna e metastatica [1], come dimostrato dalla selezione negativa delle mutazioni del DNA mitocondriale fortemente patogeniche nei tumori aggressivi [2]. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che l'ablazione del CI rallenta il ciclo di Krebs, porta all'accumulo di NADH e α -chetoglutarato (α KG), causando la destabilizzazione del fattore 1 inducibile dall'ipossia (HIF1 α). Quest'ultimo evento non consente alle cellule tumorali di adattarsi all'ipossia, confinandole in uno stato proliferativo basso [3–5], suggerendo che l'inibizione del CI può essere una strategia anticancro adiuvante efficiente. In particolare, alcuni studi hanno evidenziato che l'uso del farmaco ipoglicemizzante metformina, noto come inibitore del CI, è in grado di ridurre il potenziale tumorigenico e la progressione della malattia in diverse tipologie di cancro, incluso il carcinoma ovarico (OC) [6–10]. OC è il tumore ginecologico più letale con diagnosi in stadio avanzato (III-IV) in circa l'80% dei casi e una sopravvivenza relativa a cinque anni di solo 20-30% [11]. Quindi, nonostante gli attuali approcci chirurgici e chemioterapici attuali c'è una necessità impellente di nuovi approcci terapeutici per questo tumore letale.

Obiettivi del progetto di ricerca

Lo scopo di questo progetto di ricerca è di dimostrare che l'ablazione del CI della catena respiratoria mitocondriale sia in grado di ridurre il potenziale tumorigenico in cellule di OC. A tale scopo, diverse linee cellulari di OC umano saranno sottoposte a metodiche di gene editing (CRISPR/Cas9) per la subunità NDUFS3 del CI. Questa subunità è stata scelta in quanto è essenziale per l'assemblaggio del CI e abbiamo precedentemente dimostrato in altri contesti cellulari che la sua ablazione induce il disassemblaggio del CI. Nello specifico, l'obiettivo di questo progetto è di generare e caratterizzare dal punto di vista biochimico e molecolare cellule di OC difettive per il CI e di determinare il loro potenziale tumorigenico *in vitro*.

Modalità di realizzazione

Sulla base dei nostri dati preliminari ottenuti in cellule di osteosarcoma e carcinoma del colon umane [5], il primo obiettivo di questo progetto sarà quello di caratterizzare una linea cellulare di OC difettive per il CI già presenti nel nostro laboratorio (SKOV-3 CI^{null}) ottenute tramite gene editing della subunità NDUFS3 mediante Zn-finger endonucleasi. Inoltre, saranno generati ulteriori modelli cellulari di OC, in cui la medesima subunità verrà ablata mediante l'uso dell'approccio CRISPR/Cas9. Le linee cellulari candidate sono quelle che rispecchiano maggiormente le caratteristiche genetiche degli OC sierosi (CAOV3, OVSAHO e OVCAR4). L'obiettivo dell'uso di linee cellulari multiple è quello di escludere specifici meccanismi cellulari, anche in termini di riprogrammazione metabolica, poiché CAOV3 e OVCAR4 hanno prevalentemente un metabolismo ossidativo, mentre SKOV-3 e OVSAHO sono state descritte come cellule prevalentemente glicolitiche [12]. I modelli cellulari così ottenuti saranno quindi caratterizzati per la loro competenza energetica e le loro proprietà

tumorigeniche. La presenza della subunità NDUFS3 sarà determinata tramite western blot, mentre l'effetto dell'ablazione di tale subunità sull'assemblaggio del CI verrà analizzato utilizzando delle metodiche di elettroforesi nativa mono- e bi-dimensionale (Blue-Native PAGE, 2D-PAGE) seguite da determinazione dell'attività In Gel (IGA) o western blot. L'attività dei complessi respiratori in queste cellule e la sintesi di ATP mitocondriale a partire da substrati del CI e del CII verranno misurate. Il consumo di ossigeno (OCR) e l'acidificazione del terreno (ECAR) verranno misurati tramite tecnologia SeaHorse (Agilent), al fine di caratterizzare il metabolismo di queste linee cellulari. I metaboliti del ciclo di Krebs quali α KG, succinato e citrato verranno misurati. Inoltre, verranno valutati lo stato di stabilizzazione di HIF-1 α e l'espressione dei suoi geni target (VEGF, GLUT3, LDHA) sia in termini di mRNA che di livelli proteici. Tali linee verranno testate per il loro potenziale tumorigenico *in vitro* mediante saggi di crescita in modo ancoraggio dipendente, abilità di formazione delle colonie e capacità migratoria. Nelle linee cellulari CI^{null} verrà anche effettuata la reintroduzione di NDUFS3 in un vettore inducibile Tet-Off (9) al fine di dimostrare che i fenotipi difettivi individuati nelle cellule CI^{null} di OC possono essere revertiti dal ripristino del CI e per studiare in maniera dinamica gli effetti, anche a breve termine, dell'ablazione del CI.

Piano formativo

Nell'ambito del progetto di ricerca, il piano di formazione prevede che il titolare della borsa di studio estenda le conoscenze delle tecniche molecolari di gene editing e delle metodiche di biochimica e biologia cellulare, al fine di determinare l'impatto del disassemblaggio del CI sul potenziale tumorigenico e la proliferazione cellulare. Questo piano di formazione consentirà all'assegnista di ampliare ulteriormente le competenze tecniche e scientifiche in un ambito multidisciplinare.

Specificamente il piano di formazione prevede che il candidato acquisisca esperienze riguardanti

1. L'applicazione di un protocollo per la generazione (CRISPR/Cas9), la selezione (single cell cloning) e l'identificazione (sequenziamento di tipo Sanger) di cellule in cui la subunità NDUFS3 del CI verrà sottoposta ad ablazione genetica. Le competenze tecniche sono disponibili nel nostro ateneo (Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche, U.O. Genetica Medica).
2. L'utilizzo e il mantenimento di colture cellulari. Le competenze tecniche sono disponibili nel laboratorio del Tutor.
3. L'applicazione di metodiche biochimiche come elettroforesi Blue-Native, sintesi di ATP, dosaggi spettrofotometrici per la determinazione dell'attività dei complessi respiratori, estrazione di metaboliti, western blotting, determinazione di OCR e ECAR tramite SeaHorse. Le competenze tecniche sono disponibili nel laboratorio del Tutor.
4. L'applicazione di protocolli per la quantificazione dell'espressione di geni regolati trascrizionalmente da HIF1 α tramite real time PCR (qRT-PCR). Le competenze tecniche sono disponibili nel laboratorio del Tutor e in ateneo (Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche, U.O. Genetica Medica)
5. L'applicazione di saggi per la determinazione del potenziale tumorigenico e dell'invasività *in vitro* (formazione di colonie su soft agar, saggi di clonogenicità e di migrazione). Le competenze tecniche sono disponibili nel laboratorio del Tutor.

La formazione dell'assegnista prevede inoltre la gestione di collaborazioni strette con gruppi di ricerca dell'ateneo (Dr. G. Gasparre, Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche). È prevista inoltre la partecipazione ai seminari del laboratorio e dipartimentali, congressi e workshop utili per lo svolgimento della ricerca.

Gruppo di Ricerca del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FABIT)

Dr.ssa Anna Maria Porcelli (Professore associato, Tutor della borsa di studio)

Dr.ssa Anna Ghelli (Ricercatore universitario)

Dr.ssa Luisa Iommarini (Ricercatore universitario a tempo determinato tipo B)

Dr.ssa Claudia Zanna (Borsista PostDoc)

Dr.ssa Manuela Sollazzo (Assegnista PostDoc)

Houda Abla (Dottoranda)

Serena Jasmine Aleo (Dottoranda)

Stefano Miglietta (Dottorando)

Relazione con progetti di ricerca finanziati nel laboratorio

AIRC IG 2020 - Assessing the Efficacy of Mitochondrial Complex I Targeting in Combined Therapies for Ovarian Cancer (AMICO). PI: Prof. Giuseppe Gasparre

Bibliografia

- [1] P. Sansone, et al., Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114 (2017) E9066–E9075.
- [2] L. Iommarini, et al., Complex I impairment in mitochondrial diseases and cancer: parallel roads leading to different outcomes, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 45 (2013) 47–63.
- [3] L. Iommarini, et al., Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment, *Hum. Mol. Genet.*, 23 (2014) 1453–1466.
- [4] C. Calabrese, et al., Respiratory complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells, *Cancer Metab*, 1 (2013) 11.
- [5] I. Kurelac, et al., Inducing cancer indolence by targeting mitochondrial Complex I is potentiated by blocking macrophage-mediated adaptive responses, *Nat Commun*, 10 (2019) 903.
- [6] A. Akatsuka, et al., A novel thiophene-3-carboxamide analog of annonaceous acetogenin exhibits antitumor activity via inhibition of mitochondrial complex I, *Pharmacol Res Perspect*, 4 (2016) e00246.
- [7] L. Schöckel, et al., Targeting mitochondrial complex I using BAY 87-2243 reduces melanoma tumor growth, *Cancer Metab*, 3 (2015) 11.
- [8] G. Tang, et al., Metformin inhibits ovarian cancer via decreasing H3K27 trimethylation, *Int. J. Oncol.*, 52 (2018) 1899–1911.
- [9] S. Xu, et al., Metformin Suppresses Tumor Progression by Inactivating Stromal Fibroblasts in Ovarian Cancer, *Mol. Cancer Ther.*, 17 (2018) 1291–1302.
- [10] J. Huo, et al., Inhibitory effect and mechanism of metformin on human ovarian cancer cells SKOV-3 and A2780, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21 (2017) 484–489.
- [11] J.D. Wright, L. Chen, A.I. Tergas, S. Patankar, W.M. Burke, J.Y. Hou, A.I. Neugut, C.V. Ananth, D.L. Hershman, Trends in relative survival for ovarian cancer from 1975 to 2011, *Obstet Gynecol*, 125 (2015) 1345–1352.
- [12] G. Gentric, et al., PML-Regulated Mitochondrial Metabolism Enhances Chemosensitivity in Human Ovarian Cancers, *Cell Metab.*, 29 (2019) 156-173.e10.