

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI**

Ciclo 34

Settore Concorsuale: 06/A1 - GENETICA MEDICA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/03 - GENETICA MEDICA

**COMPRENDERE COME LO STATO GENETICO DI TP53
INFLUENZA LA RISPOSTA AL DEFICIT INDOTTO SUL
COMPLESSO I MITOCONDRIALE COME TERAPIA
ANTICANCRO**

Presentata da: Dott.ssa Licia Bressi

Coordinatore Dottorato

Prof. Fabio Piscaglia

Supervisore

Prof. Giuseppe Gasparre

Esame finale anno 2022

ABSTRACT

Il Complesso I (CI) mitocondriale è uno dei target metabolici più promettenti nelle terapie anti-cancro, dovuto al suo cruciale ruolo nel controllo della proliferazione e nell'adattamento all'ipossia (Calabrese et al. 2013). In particolare, la metformina è un inibitore noto del CI, capace di inibire la crescita delle cellule tumorali, ma non di eradicare la patologia. Recentemente, l'associazione metformina ed ipoglicemia si è rivelata letale per i tumori (Elgandy et al.; 2019), sebbene l'efficacia terapeutica del trattamento sinergico possa essere influenzata dall'accumulo di alterazioni genetiche nei più noti drivers della tumorigenesi. Abbiamo così investigato l'effetto dello stress metabolico indotto dalla restrizione di glucosio in un pannello di linee cellulari tumorali con un severo deficit sul CI e con un diverso stato genetico di *TP53*. Il deficit del CI associato alla carenza di glucosio inducono un abbattimento dei livelli di espressione della proteina p53 mutata, ma non della controparte wild-type. Il fenomeno biologico osservato non dipende né da un blocco trascrizionale, né dall'innescò di vie di degradazione intracellulare, come proteasoma ed autofagia. La scomparsa di p53 mutata, invece, sembra dipendere da un blocco generale della sintesi proteica, verosimilmente indotto dallo stress energetico e nutrizionale. Nella controparte p53 wild-type, invece, si osserva solo una parziale riduzione della sintesi proteica, suggerendo l'innescò di possibili vie di adattamento per compensare il danno sul CI. La carenza di amminoacidi è una caratteristica dei tumori solidi che potrebbe essere esacerbata in condizioni di deficit generali della catena respiratoria mitocondriale. In particolare, l'inibizione del CI causa auxotrofia da aspartato, metabolita limitante per la proliferazione, condizione che potrebbe generare il blocco della sintesi proteica osservato. L'incremento di espressione dei livelli del trasportatore aspartato/glutammato mediata da p53 mutata compensa l'auxotrofia da aspartato, identificando un meccanismo di adattamento al deficit del CI. Dunque, i risultati ottenuti sottolineano l'importanza di implementare la terapia anti-complesso I nel cancro, poiché il diverso stato di p53 può alterare l'efficacia del trattamento.

Parole chiavi: p53, mutanti p53, Complesso I mitocondriale, glucosio, aspartato, metabolismo, cancro

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE..... | 4 |
| 1.1 Metabolismo della cellula tumorale | 4 |
| 1.2 Ruolo del Complesso I (CI) mitocondriale nel cancro | 12 |
| Funzione, struttura ed assemblaggio del CI | 12 |
| Effetti delle disfunzioni del CI sul potenziale tumorigenico | 15 |
| Emergenti strategie terapeutiche anti-metaboliche, specialmente anti- Complesso I | 19 |
| 1.3 P53 nella regolazione del metabolismo | 22 |
| Controllo delle vie metaboliche mediate da p53 | 22 |
| Ruolo di p53 nell'adattamento metabolico in condizioni di deficit dell'ETC | 28 |
| 2. SCOPO..... | 30 |
| 3. MATERIALI E METODI | 31 |
| MATERIALI..... | 31 |
| 3.1 Colture cellulari..... | 31 |
| 3.2 Condizioni di coltura..... | 33 |
| 3.3 Saggio di proliferazione con IncuCyte S3 | 33 |
| 3.4 Clonaggio | 36 |
| 3.4.1 Amplificazione del gene TP53 mediante la reazione a catena della Polimerasi (PCR)..... | 36 |
| 3.4.2 Digestione del DNA con endonucleasi di restrizione..... | 38 |
| 3.4.3 Reazione di ligazione e trasformazione batterica | 39 |
| 3.5 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico ricombinante..... | 41 |
| 3.6 Mutagenesi sito specifica mediante la reazione a catena della Polimerasi (PCR)..... | 42 |
| 3.7 Trasfezione..... | 45 |
| 3.8 Trasduzione | 45 |

| | |
|--|------------|
| 3.9 Estrazione RNA | 49 |
| 3.10 Retrotrascrizione | 49 |
| 3.11 qRT-PCR..... | 50 |
| 3.12 Estrazione DNA | 53 |
| 3.13 Sequenziamento SANGER | 54 |
| 3.14 Estrazione delle proteine e WES..... | 55 |
| 3.15 SDS page e Western Blot..... | 56 |
| 3.16 Analisi densitometrica Western Blot | 57 |
| 3.17 Saggio radioattivo con aspartato radio marcato | 58 |
| 3.18 Misurazione dei livelli di aspartato intracellulari | 58 |
| 3.19 Analisi statistiche | 58 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 60 |
| 4.1 La carenza di glucosio inibisce la proliferazione in condizioni di deficit del CI mitocondriale | 60 |
| 4.2 La carenza di glucosio induce un abbattimento dell'espressione dei mutanti p53, ma non wild-type, in assenza del CI mitocondriale | 70 |
| 4.3 Identificazione del meccanismo molecolare responsabile dell'abbattimento della proteina p53 mutata..... | 77 |
| 4.4 L'auxotrofia di aspartato nelle cellule prive del CI è responsabile della perdita di p53 in condizioni di basso glucosio..... | 91 |
| 4.5 Investigare come <i>TP53</i> può influenzare la risposta all'ER stress | 103 |
| CONCLUSIONI..... | 123 |
| BIBLIOGRAFIA | 125 |

1. INTRODUZIONE

1.1 Metabolismo della cellula tumorale

Il cancro è una patologia multifattoriale caratterizzata da aggregati di cellule in continua proliferazione. La tumorigenesi è un processo multifasico sotteso da dinamiche alterazioni genetiche che conferiscono un vantaggio nella crescita e guidano la trasformazione di una cellula normale in una altamente maligna (Foulds 1954; Nowell 1976). Negli anni 80' la comprensione che la trasformazione cancerosa delle cellule venisse ereditata in maniera clonale, fosse indotta da agenti mutageni/virus e fosse suscettibile a manifestarsi in determinate famiglie, indicava la base genetica del cancro. Furono scoperte tre classi di geni che, se mutati, contribuivano allo sviluppo del tumore: i proto-oncogeni, classi eterogenee di geni che controllano la proliferazione ed il differenziamento cellulare; gli oncosoppressori, un gruppo di geni codificanti per proteine che inibiscono la crescita cellulare e, infine, i geni del riparo al DNA che controllano l'integrità genomica ed il processo di replicazione durante la divisione cellulare (Bishop, J.M Weinberg 1996). L'insieme di mutazioni ad acquisto di funzione sui proto-oncogeni e mutazioni a perdita di funzione sugli oncosoppressori/geni del riparo al DNA contribuiscono all'insorgenza del tumore, come postulato da Knudson nel 1971 per spiegare l'eziologia del retinoblastoma, proponendo l'ipotesi dei "due colpi". Un primo evento mutazionale, o colpo, predispone l'individuo a sviluppare una patologia, ma è il susseguirsi di una seconda o più mutazioni a determinarne l'insorgenza. Hanahan e Weinberg analizzando più di un centinaio di sottotipi tumorali proposero sei essenziali alterazioni, definite "hallmark", che caratterizzano una cellula tumorale: potere replicativo illimitato, insensibilità a segnali di crescita inibitori, angiogenesi, evasione dall'innescamento di meccanismi di morte cellulare ed acquisizione di carattere invasivo e metastatico (Fig.1.1).

L'acquisizione dei sei hallmark del cancro è guidata dallo sviluppo di un'instabilità genomica che genera mutazioni random, tra cui riarrangiamenti cromosomici ed amplificazioni in oncogeni, e dallo stato infiammatorio promosso dalla lesione maligna.

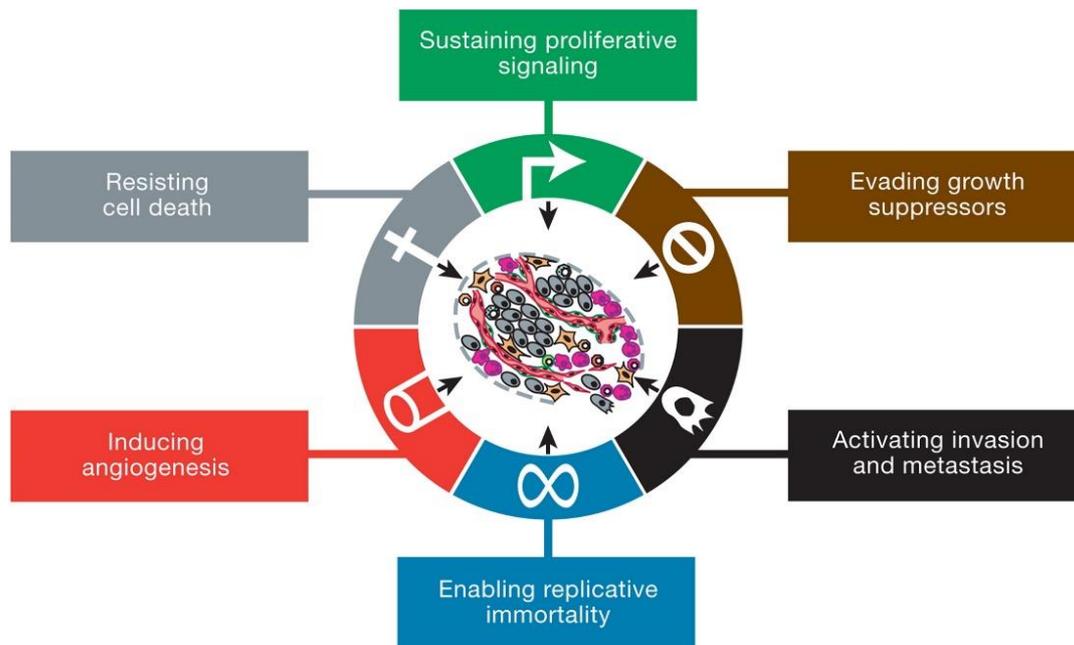


Fig. 1.1. Rappresentazione schematica dei sei hallmark genetici del cancro definiti da Hanahan e Weinberg nel 2000.

Nell'ultima decade, la comprensione più ampia dei meccanismi molecolari che controllano la progressione tumorale, ha permesso di identificare un nuovo hallmark genetico del cancro: la riprogrammazione metabolica (Hanahan and Weinberg 2011). La proliferazione incontrollata delle cellule tumorali dipende sia da eventi mutazionali, che causano una deregolazione del ciclo cellulare, che da una riprogrammazione metabolica finalizzata a rispondere ai bisogni bioenergetici ed a fornire intermedi essenziali per sostenere i processi di biosintesi (Bauer et al. 2004). In condizioni aerobiche, le cellule normali, tramite la glicolisi, metabolizzano il glucosio in piruvato, il quale è rapidamente indirizzato ai mitocondri per i processi ossidativi, essenziali alla sintesi di ATP; in condizioni anaerobiche, invece, buona parte del prodotto glicolitico, il piruvato, è convertito a lattato grazie all'enzima lattato deidrogenasi (*LDHA*), rifornendo il pool di NAD^+ necessario per sostenere il metabolismo glicolitico. Otto Warburg, per primo, aveva osservato un anomalo comportamento delle cellule tumorali nel regolare il metabolismo energetico. Infatti, anche in presenza di ossigeno, il metabolismo glicolitico è tra le vie metaboliche adottate dalle cellule tumorali per la produzione di energia, condizione nota come "glicolisi aerobia", causata, secondo Warburg, dalla presenza di difetti

mitocondriali. Il metabolismo glicolitico, apparentemente, non soddisfa la domanda bioenergetica di una cellula tumorale. In realtà, invece, un intenso flusso glicolitico permette di catabolizzare rapidamente la risorsa più abbondante nell'ambiente extracellulare, il glucosio, fornendo un immediato pool di molecole di ATP, sebbene stechiometricamente inferiore rispetto a quelle prodotte dal metabolismo ossidativo. Inoltre, la degradazione del glucosio fornisce intermedi essenziali per l'innesco di processi biosintetici, includendo il ribosio per la sintesi dei nucleotidi, il glicerolo ed il citrato per la sintesi lipidica, gli amminoacidi non essenziali ed il pool di NADPH, quest'ultimo ottenuto tramite lo shunt dei pentoso fosfati (DeBerardinis et al. 2008; Heiden, Cantley, and Thompson 2009). Inoltre, l'ossidazione del piruvato richiede il suo ingresso nel mitocondrio e l'azione di enzimi, altamente regolati, come il complesso della piruvato deidrogenasi (*PDH*) fino ad arrivare alla produzione di ATP tramite la fosforilazione ossidativa. Pertanto, la glicolisi aerobia è la via metabolica più efficiente per una cellula altamente proliferante. Infatti, in un ambiente extracellulare con una limitata disponibilità di nutrienti, le sottopopolazioni geneticamente eterogenee che costituiscono il tumore competono tra di loro ed affrontano una pressione selettiva, il cui risultato è la sopravvivenza dei solo cloni adattati a crescere in condizioni molto specifiche, superando le barriere della selezione darwiniana (Merlo et al. 2006).

Tuttavia, studi successivi, dimostrarono che molti tumori altamente proliferanti non presentavano mitocondri danneggiati e supportavano il metabolismo ossidativo (Moreno-Sánchez et al. 2007). Infatti, un importante contributo ai processi anabolici è svolto dagli intermedi del ciclo di Krebs (TCA), tra cui ossalacetato, citrato ed α -chetoglutarato, essenziali sia per sostenere i processi biosintetici (DeBerardinis et al. 2008) che il metabolismo della glutammina (DeBerardinis et al. 2007). Pertanto, nel cancro il contributo bioenergetico può derivare sia dal metabolismo glicolitico che ossidativo, rivalutando l'ipotesi Warburg (Nadège, Patrick, and Rodrigue 2009). In generale, tali cambiamenti metabolici sono guidati sia dall'attivazione di noti driver oncogenici che dall'influenza del microambiente tumorale.

In realtà, i meccanismi che integrano la trasduzione del segnale ed il metabolismo cellulare sono evolutivamente conservati tra una cellula normale ed una cellula altamente proliferante. La differenza più grande è che l'adattamento metabolico nelle cellule non

proliferanti è indotto solo da segnali/stimoli provenienti dall'ambiente extracellulare; nelle cellule tumorali, invece, è l'accumulo di mutazioni in oncogeni ed onco-soppressori che influenzano il cambiamento metabolico, sviluppando un'autentica "autonomia metabolica" (DeBerardinis et al. 2008). In particolare, un contributo essenziale alla riprogrammazione metabolica delle cellule tumorali è dovuto alla cascata di segnalazione PI3K/Akt/mTOR (DeBerardinis et al. 2008). La fosfoinositide 3-chinasi (*PI3K*), un regolatore cruciale del metabolismo sia in cellule normali che trasformate, è tra gli oncogeni più frequentemente mutati nel cancro. *PI3K* controlla i livelli di PIP_3 (fosfatidilinositolo-3-fosfato) a livello della membrana plasmatica. Fattori di crescita attivano *PI3K*, conducendo all'attivazione di numerosi pathway a valle, tra cui mTOR, essenziale per promuovere i processi biosintetici. Nelle cellule normali, l'attività di *PI3K* è mitigata dall'azione costante di *PTEN*, noto oncosoppressore; nelle cellule tumorali, invece, si assiste ad una deregolazione del pathway a causa di mutazioni ad acquisto di funzione su *PI3K* (Samuels et al. 2004) o mutazioni a perdita di funzione su *PTEN* (Cairns et al. 1997), contribuendo alla trasformazione neoplastica. La stimolazione di *PI3K* promuove la trasformazione metabolica nelle cellule tumorali attraverso l'attivazione di multipli pathway che cooperano nell'incrementare l'espressione di trasportatori necessari per l'uptake di nutrienti ed amminoacidi e di enzimi coinvolti nel flusso glicolitico (Jones and Thompson 2009).

Anche il protooncogene *c-Myc* è un noto regolatore del metabolismo, mutato in molti tumori umani. Amplificazioni di *c-Myc* promuovono un'incrementata glicolisi aerobia, regolando a livello trascrizionale la lattato deidrogenasi A (*LDHA*) (Osthus et al. 2000) e molti geni coinvolti nel metabolismo degli amminoacidi, tra cui l'asparagina sintetasi (*ASNS*) (O'Connell et al. 2003). Queste e tante altre alterazioni oncogeniche (*HRAS*, *SRC*, *AKT*) stimolano i processi anabolici nelle cellule tumorali, sottolineando come oncogeni ed oncosoppressori influenzino e partecipino alla riprogrammazione metabolica. In questo contesto, un importante contributo alla stimolazione del flusso glicolitico è dovuto dall'ipossia intra-tumorale, a cui segue la stabilizzazione del fattore di ipossia indotto (*HIF1*), il quale promuove l'espressione di numerosi geni coinvolti nel metabolismo del glucosio, nell'angiogenesi, favorendo la proliferazione cellulare e l'invasività. La regolazione di *HIF1*, mediata dalle proli-idrossilasi (*PHD*) (Bruick, R.

K. & McKnight, S. L., 2001) dipende dalla disponibilità di O₂ e dal rapporto α -chetoglutarato e succinato, rispettivamente attivatore ed inibitore allosterico delle PHD (Selak et al. 2005), dimostrando come la regolazione del TCA possa influenzare la regolazione di HIF1. Le PHD sono capaci di idrossilare specifici residui di prolina sulla proteina HIF1, indirizzandola verso la degradazione proteasoma dipendente. Pertanto, la stabilizzazione di HIF1, indotta dall'ipossia intra-tumorale, svolge un ruolo cruciale nell'induzione del caratteristico "effetto Warburg" nelle cellule tumorali (Maxwell, Pugh, and Ratcliffe 2001; Semenza 2003).

Sebbene le lesioni genetiche abbiano un ruolo decisivo nel determinare il fenotipo tumorale, un contributo determinante è anche svolto dal microambiente tumorale (Hanahan and Weinberg 2011). Ciò spiegherebbe la marcata eterogeneità tumorale che, spesso, si osserva anche all'interno dello stesso tessuto/organo. Tra le popolazioni cellulari si distinguono: cellule endoteliali, periciti, cellule del sistema immunitario, CAF fibroblasti associati al tumore (CAF) ed infine le cellule staminali tumorali (CSC). Una fitta rete reciproca di segnali eterotipici si instaura tra il parenchima tumorale e lo stroma di sostegno, modificando l'ambiente circostante e promuovendo lo sviluppo tumorale. In particolare, le cellule tumorali e le cellule T competono per i nutrienti nell'ambiente extracellulare. Le cellule dello stroma, invece, forniscono amminoacidi (alanina e cisteina) e metaboliti per supportare la crescita tumorale. I CAF rispondono allo stress ossidativo, causato dal rilascio dei ROS, attivando HIF-1 α ed NF κ B, stimolando di conseguenza la glicolisi ed il rilascio di lattato, importante molecola segnale per la cellula tumorale. Dunque, nel microambiente tumorale si instaura un'intensa comunicazione metabolica che, nel tempo, favorisce l'acquisizione di potere invasivo e metastatico alle cellule tumorali (Kim and DeBerardinis 2019) (Fig.1.2). Comprendere i meccanismi molecolari che governano l'eterogeneità metabolica di un tumore è cruciale perché influenza la vulnerabilità terapeutica e può predire gli esiti clinici. Recenti lavori dimostrano che le proprietà metaboliche di un tumore possono evolversi e cambiare durante la progressione tumorale, accentuando la vulnerabilità terapeutica del tumore tra lo stadio primario e metastatico. Tali cambiamenti nella riprogrammazione metabolica durante le fasi della carcinogenesi sono sempre accompagnati dall'accumulo e selezione di mutazioni somatiche.

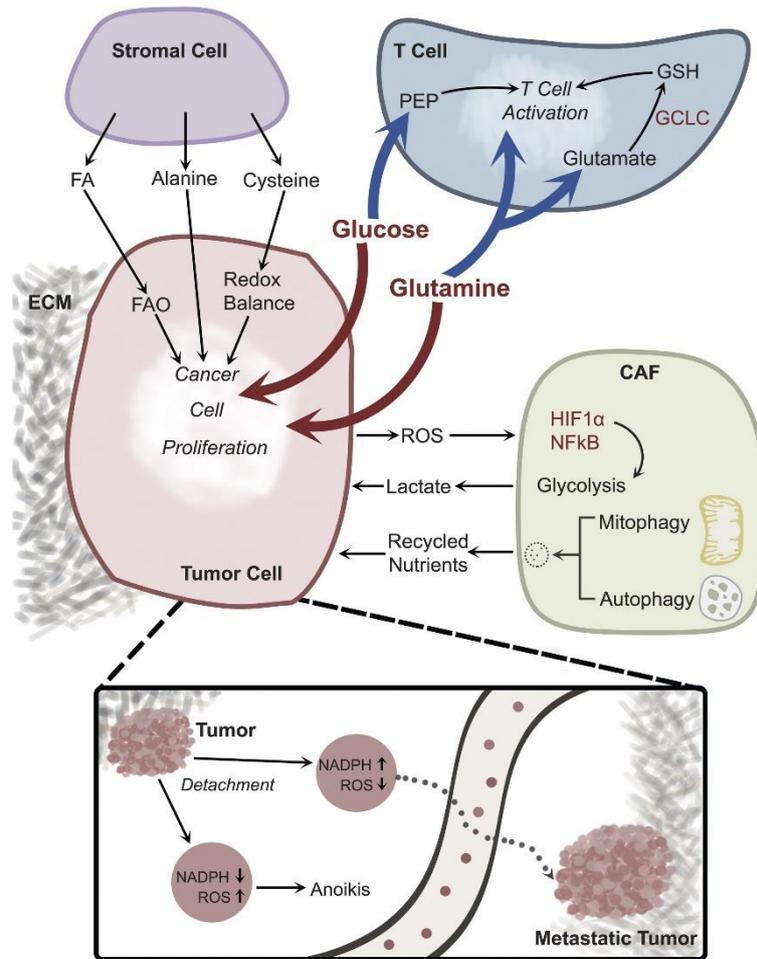


Fig.1.2: Comunicazione metabolica tra la cellula tumorale ed il microambiente tumorale (Kim e DeBerardinis et al.; 2019).

Per esempio, *KRAS* è il più comune driver oncogenico nell'adenocarcinoma polmonare umano ed è responsabile di un fenotipo metabolico che, in presenza di mutazioni in altri geni, può variare (Skoulidis, F. et al.; 2015). La mutazione di *KRAS* accoppiata ad una mutazione nella serina/treonina chinasi 11 (*STK11*), anche nota come *LKB1*, rende il tumore resistente alle terapie e con maggiore potere metastatico, ma aumenta la sua sensibilità al trattamento con classi di inibitori metabolici (Calles et al. 2015; Chen et al. 2012; Ji et al. 2007). Se un terzo evento mutazionale si accumula, come la mutazione nella proteina 1 associata a ECH simile a Kelch (*KEAP1*), il tumore acquisisce resistenza allo stress ossidativo sintetizzando glutazione, diventando al contempo dipendente dalla glutammina e sensibile al trattamento con inibitori della glutaminasi (Faubert, Solmonson, and DeBerardinis 2020; Galan-Cobo et al. 2019) (Fig.1.3).

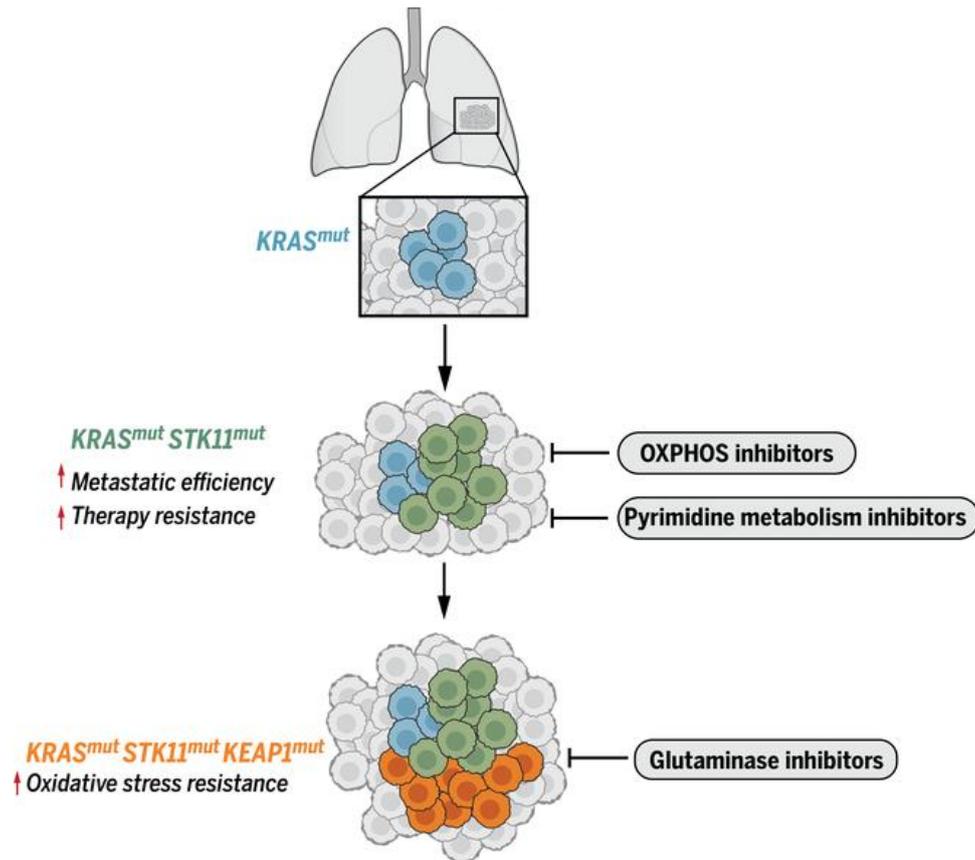


Fig.1.3: *Acquisizione di mutazioni somatiche accumulate che modificano il metabolismo durante la progressione tumorale (Faubert et al.; 2020).*

In realtà, già nel 2011, Smolkova e colleghi dimostrarono che la riprogrammazione metabolica è caratterizzata da un'ondata di espressione genica variabile nel corso della progressione tumorale e culmina con una stimolazione del metabolismo ossidativo (Smolková et al. 2011). In particolare, in una prima ondata si induce un tipico profilo Warburg, a cui segue una seconda ondata indotta dall'ipossia intra-tumorale che rafforza il flusso glicolitico. La terza ondata, invece, induce la glutaminolisi e riattiva la funzionalità dell'OXPPOS, accompagnata da una parziale biogenesi mitocondriale (Fig.1.4).

L'insieme di queste osservazioni, negli anni, ha avvicinato sempre di più la visione del cancro come una malattia metabolica, dove il ruolo del mitocondrio assume un ruolo determinante. Inoltre, esplorare la vulnerabilità dei tumori, metabolicamente eterogenei, è cruciale per programmare strategie terapeutiche mirate. Ciò assumerebbe

un'importanza rilevante in clinica, proponendo terapie personalizzate in base al metabolismo tumorale paziente-specifico.

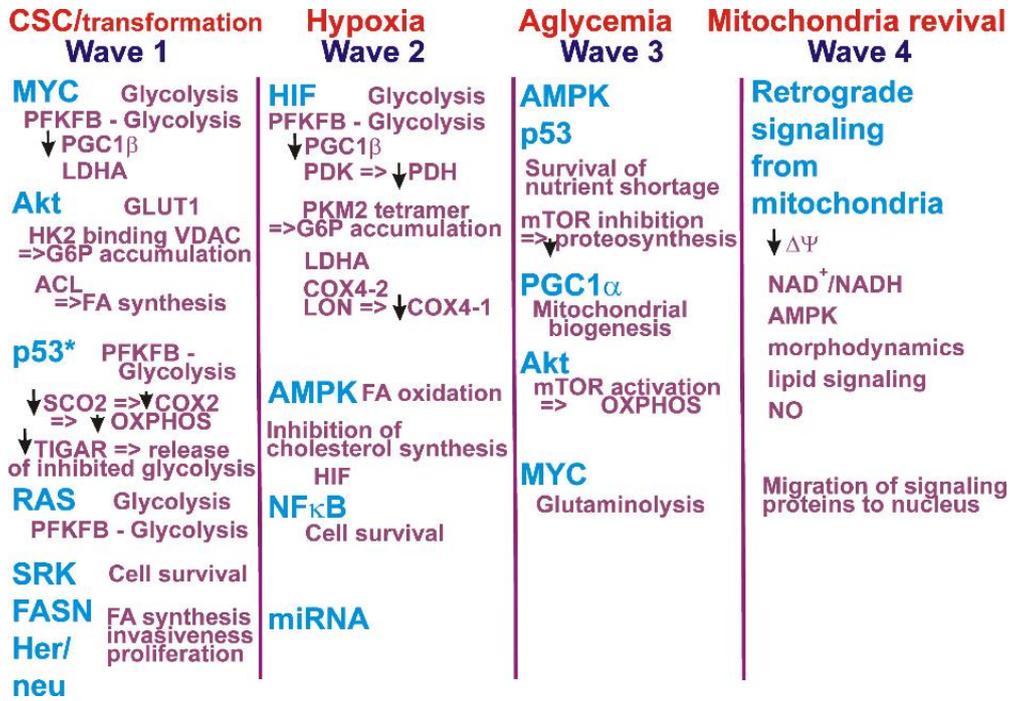


Fig.1.4: Ondata di espressione genica ipotizzata durante la carcinogenesi (Smolkova et al.; 2011).

1.2 Ruolo del Complesso I (CI) mitocondriale nel cancro

Funzione, struttura ed assemblaggio del CI

Il Complesso I della catena respiratoria o NADH-ubichinone-ossidoreduttasi è il più grande componente del sistema OXPHOS e svolge una funzione cruciale nel metabolismo energetico aerobio (Vinothkumar, Zhu, and Hirst 2014). Il CI accoppia il trasferimento elettronico dal NADH all'ubichinone con la traslocazione di quattro protoni (H^+) a cavallo della membrana mitocondriale interna (IMM). Oggi, grazie all'avvento della criomicroscopia elettronica (cryo-EM) è possibile conoscere nel dettaglio la struttura, la dinamica dei pathway di traslocazione protonica, le interazioni con i lipidi dell'IMM e l'organizzazione sovra-molecolare del CI nei mammiferi (P. Zhu and Li 2016) (Fig.1.5).

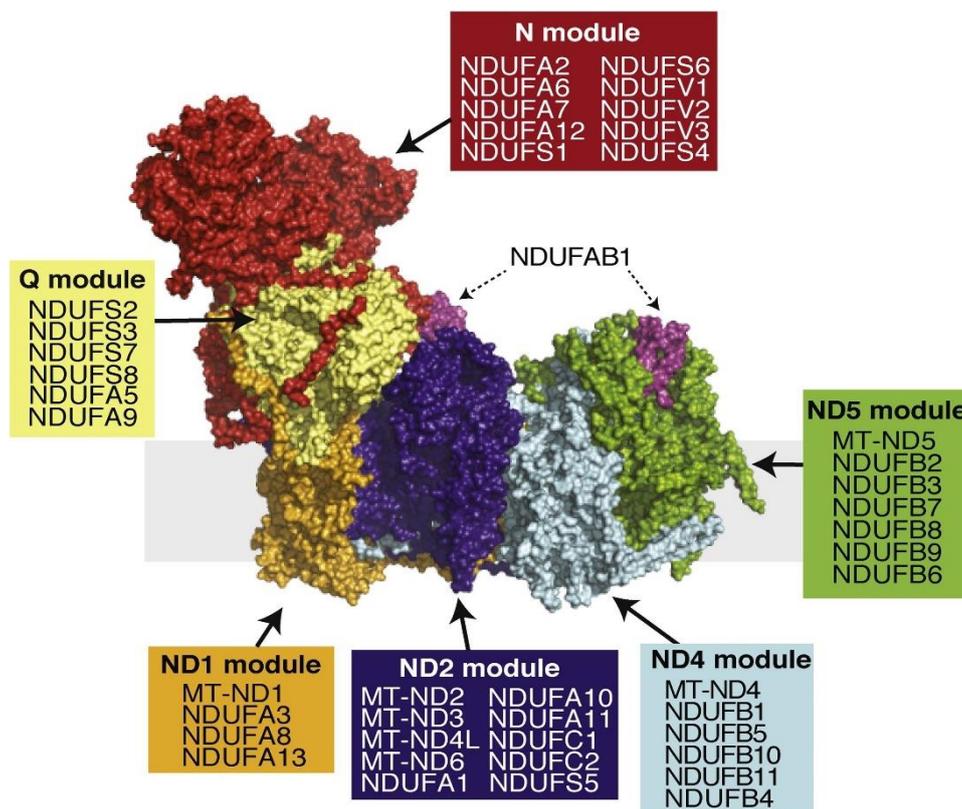


Fig.1.5: Composizione modulare del CI mitocondriale (Formosa et al.; 2018).

Il CI possiede una caratteristica struttura ad L, con un braccio idrofilico che protrude nella matrice mitocondriale, caratterizzato dal modulo-N, responsabile dell'ossidazione del NADH, e dal modulo-Q, responsabile del trasferimento elettronico dai centri Fe-S all'ubichinone, e da un braccio idrofobico immerso nell'IMM, costituito dal modulo-P, responsabile del trasferimento protonico nello spazio inter-membrana (Vinothkumar, Zhu, and Hirst 2014)(Roessler et al. 2010). Il gradiente protonico genera una differenza di potenziale a cavallo dell'IMM che rappresenta la forza motrice utilizzata dalla F_1F_0 -ATPasi mitocondriale per la produzione di ATP. È un complesso multi-enzimatico composto, nei mammiferi, da 45 subunità, di cui 38 di codifica nucleare e 7 di codifica mitocondriale (Formosa et al. 2018). 14 delle subunità del CI sono altamente conservate dal CI batterico. Il controllo genomico duale sul Complesso I è indicativo della dinamicità e complessità della biogenesi e dei meccanismi di assemblaggio.

Negli anni, diversi modelli di assemblaggio del CI sono stati proposti. Schematicamente l'assemblaggio ha inizio con l'integrazione del modulo Q con il modulo ND1 ed insieme si associano al modulo ND2, formando una piattaforma di assemblaggio a livello dell'IMM. Successivamente, i moduli ND4-ND5, già assemblati, interagiscono con il complesso Q/ND1/ND2. A tale struttura intermedia si associa il modulo N, formando il CI pienamente assemblato. Come è possibile osservare in Fig.1.6, in ogni step intermedio di assemblaggio, un elevato numero di fattori partecipano alla biogenesi del CI. Un numero addizionale di proteine, recentemente identificate, è implicato nei dinamici meccanismi di biogenesi e di assemblaggio del CI e mutazioni nei loro geni codificanti possono causare disfunzioni sul CI. Un esempio, il knockdown di NDUFAF8 induce una riduzione dell'attività del CI e del consumo di ossigeno, con conseguente riduzione dei livelli di NDUFAF5, con il quale è noto interagire, indicando che la presenza di NDUFAF8 è essenziale per la sua stabilità (Floyd et al. 2016). Anche la proteina transmembrana 126 A (TMEM126A) è stata identificata come un fattore necessario per il corretto assemblaggio e funzione del CI (D'Angelo et al. 2021). Inoltre, alcuni fattori di assemblaggio, come ATP5SL o DMAC1, non si associano ad un modulo specifico, ma piuttosto interagiscono nell'interfaccia tra due moduli per facilitare l'assemblaggio del CI, elevandoli come promettenti target terapeutici (Stroud et al. 2016).

Questi fattori, insieme a molti altri ancora, dimostrano la complessità dell'assemblaggio del CI che richiede sforzi coordinati di multipli processi mitocondriali.

Sono stati sempre proposti due modelli di organizzazione dei complessi della catena respiratoria mitocondriale: modello a “stato solido” e a “stato fluido” (Keilin and Hartree 1947). Nel primo, i complessi lavorano come entità individuali, promuovendo le reazioni di competenza; nel secondo, invece, i complessi diffondono liberamente nella IMM ed il modulo-Q ed il citocromo c (cyt c) interagiscono (Hackenbrock, Chazotte, and Gupte 1986). Il modello fluido è stato per decenni accettato fino all'avvento della tecnica BN-PAGE (elettroforesi sul gel di poliacrilammide blu nativo), che permette la migrazione delle proteine nella loro conformazione nativa, ovvero tridimensionale. Grazie alla BN-PAGE è stato possibile osservare l'organizzazione sovra-molecolare dei complessi, organizzati nei noti super-complessi (Schägger 2001). Nel mitocondrio di un mammifero, sono stati identificati vari super-complessi con un diverso rapporto stechiometrico, tra cui CI/CIII₂/CIV₁₋₄, CI/CIII₂, and CIII₂/CIV₁₋₂. Si stima, inoltre, che circa l'85-100% del CI è organizzato nei super complessi. Tra i super complessi più caratterizzati vi è CI/CIII₂/CIV, chiamato anche respirasoma per la capacità di ossidare il NADH. Se l'organizzazione in super-complessi conferisce un vantaggio funzionale o strutturale o contribuisce alla patofisiologia dei disordini umani rimane ancora una questione aperte e dibattuta (Milenkovic et al. 2017).

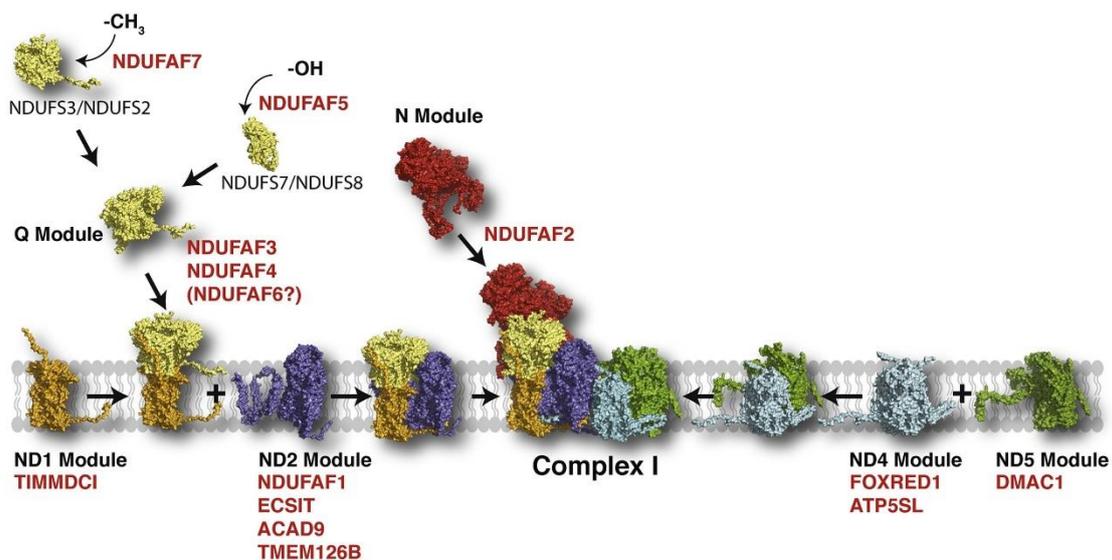


Fig.1.6: Pathway di assemblaggio del CI mitocondriale (Formosa et al.; 2018).

Effetti delle disfunzioni del CI sul potenziale tumorigenico

Alterazioni funzionali e strutturali sul CI sono associate all'insorgenza di disordini neuromuscolari e del cancro, causate dalla presenza di mutazioni nel DNA mitocondriale. Il mtDNA è una molecola a doppio filamento, circolare covalentemente chiusa, codificante 13 geni per alcune subunità dei complessi dell'OXPPOS, 22tRNA e 2rRNA (12S e 16S) necessari per la traduzione intra-organello (Anderson et al. 1981). Rispetto al DNA nucleare, il mtDNA presenta un'organizzazione policistronica dei trascritti ed è privo di introni e regioni inter-geniche (Montoya, Ojala, and Attardi 1981). Mostra un'elevata fragilità all'accumulo di mutazioni (Douglas C. Wallace 1993), probabilmente causato dall'assenza di meccanismi di riparo del DNA efficienti. Infine, l'ereditarietà del mtDNA non segue completamente le leggi Mendeliane poiché è ereditato dal patrimonio genetico materno e la selezione di mutazioni è determinata da una segregazione random delle molecole di mtDNA durante la divisione mitotica, causando una distribuzione a mosaico delle mutazioni (D. C. Wallace et al. 1986). Infatti, all'interno del mitocondrio, risiedono centinaia di molecole di mtDNA con differenti genotipi, condizione definita eteroplasmia. La condizione, invece, in cui tutte le molecole di DNA sono identiche è rinominata omoplasmia. Ciò implica che si debba raggiungere una soglia mutazionale, variabile per ogni tipo di mutazione, affinché una mutazione sul mtDNA correli con un fenotipo patogenico (Rossignol et al. 2003).

Negli ultimi quindici anni è emerso il ruolo patogenico di mutazioni sui geni sia nucleari che mitocondriali, codificanti per subunità del CI e per le chaperone essenziali per l'assemblaggio (DiMauro and Schon 2008; Mckenzie and Ryan 2010; Zeviani and Carelli 2007). Nel 2008, analizzando 50 lesioni oncocitiche, si dimostrò che la maggior parte delle mutazioni distruttive identificate sul mtDNA codificavano per subunità del CI ed erano associate ad un fenotipo oncocitico, designandole come marker molecolari (Gasparre et al. 2007). Dunque, l'effetto di una mutazione sul mtDNA dipende dal tipo di mutazione, dalla carica mutazionale e dal ruolo svolto fisiologicamente dalla subunità compromessa.

In base agli effetti indotti sul CI, le mutazioni patologiche identificate possono essere classificate in tre gruppi (Achilli et al. 2012) (Iommarini et al. 2013):

-
- Mutazioni che compromettono lievemente l'attività del CI: tra cui le tre comuni mutazioni patogeniche LHON (m.11778G>A/MT-ND4, m.3460G>A/MT-ND1 e m.14484T>C/MT-ND6)
 - Mutazioni che causano un severo danno all'attività del CI, senza intaccarne la stabilità: includono molte mutazioni patogeniche in geni codificanti subunità del CI (per esempio m.14459G>A/MT-ND6)
 - Mutazioni che alterano la stabilità strutturale del CI: per esempio la mutazione m.3571insC/MT-NDI

Comprendere il grado di disfunzione indotto sul CI è cruciale nella patogenesi dei disordini mitocondriali, in particolare del cancro. Basandosi sull'ipotesi Warburg, è plausibile che mutazioni che compromettono la funzionalità del CI siano ritenute vantaggiose per la crescita e la trasformazione cancerosa, inducendo il classico flusso glicolitico. Tuttavia, evidenze sperimentali dimostrano che mutazioni che intaccano la stabilità e l'attività del CI contribuiscono negativamente alla progressione tumorale (Gasparre et al. 2011). In particolare, mutazioni omoplasmiche distruttive sul CI in tumori oncocitici sono associate *in vivo* ad un fenotipo benigno e poco invasivo grazie alla mancata stabilizzazione di HIF1- α , responsabile del caratteristico "effetto Warburg" (Porcelli et al. 2010). Infatti, disfunzioni severe sul CI causano un decremento del rapporto NAD⁺/NADH (Calabrese et al. 2013), che può contribuire ad un'inibizione allosterica dell' α -chetoglutarato deidrogenasi (Bunik, Buneeva, and Gomazkova 1990), enzima del ciclo di Krebs (TCA), causando un conseguente accumulo di α -chetoglutarato (α -KG), che spiegherebbe l'incremento del rapporto α -KG/succinato osservato nei modelli con mutazioni omoplasmiche distruttive sul CI (Gasparre et al. 2011; Porcelli et al. 2010). L'alterato bilancio dei due metaboliti del ciclo di Krebs impatta sulla funzionalità di una classe di enzimi, prolil-idrossilasi (PHD), che regolano la stabilità di HIF1- α . Infatti, α -KG e succinato sono un attivatore ed un inibitore allosterico della PHD, rispettivamente (MacKenzie et al. 2007; Selak et al. 2005). Pertanto, l'accumulo di α -KG, mantiene in uno stato attivo le PHD, anche in condizioni di ipossia, determinando la destabilizzazione di HIF1- α e spiegando il fenotipo indolente e poco aggressivo osservato nei tumori oncocitici (Gasparre et al. 2011). Inoltre, l'accumulo di NADH, conseguente al deficit del CI, potrebbe inibire la segnalazione dipendente da sirtuine, le quali possono

comportarsi da oncogeni o oncosoppressori in funzione del contesto cellulare e molecolare. In più, un danno severo sul CI causa uno sbilanciamento del rapporto AMP/ATP, attivando a valle AMPK (Iommarini et al. 2014), il quale coordina l'innescio dei processi catabolici intracellulari (Hardie, Ross, and Hawley 2012) (Fig.1.7). Al contempo, però, mutazioni che compromettono parzialmente la funzione del CI, come la mutazione LHON (m.3460G>A/MT-ND1), non è sufficiente ad inibire la crescita, ma segue il profilo metabolico di una linea con un CI competente (Iommarini et al. 2014) (Fig.1.7).

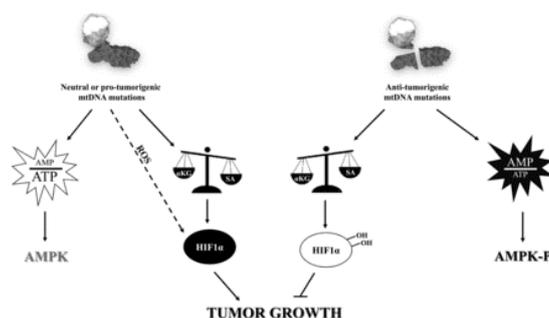


Fig.1.7: Descrizione schematica dell'effetto di mutazioni sul mtDNA nella progressione tumorale (Iommarini et al.; 2013).

Quindi la diversa natura, oltre che il grado di eteroplasmia, di mutazioni sul mtDNA può influenzare l'effetto neutrale, pro-tumorigenico o anti-tumorigenico sulla crescita tumorale. Negli stessi anni, l'identificazione di mutazioni patogene sui geni codificanti per la succinato deidrogenasi (*SDH*) e la fumarato idratasi (*FH*), enzimi cruciali del TCA, causano un accumulo di succinato e fumarato, inibendo le PHD e favorendo di conseguenza la stabilizzazione di HIF1- α e la trasformazione cancerosa (Boulahbel, Durán, and Gottlieb 2009; Pollard et al. 2005).

Infine, difetti sul CI, che si traducono in un rallentamento del flusso elettronico, possono anche causare un incremento dei livelli di ROS a causa della maggiore suscettibilità dell'O₂, solubile in matrice, di strappare l'elettrone, generando l'anione superossido (Ishikawa et al. 2008). L'aumento dei ROS può, da un lato, attivare cascate di segnalazione oncogenica (Ray, Huang, and Tsuji 2012) e, dall'altro, se eccessivamente prodotti, esercitare un effetto citotossico (Kohn and Moon 2005)(Vučetić et al. 2017). Tale incremento, però, non è stato osservato nei tumori con mutazioni omoplasmiche

distruttive per il CI (Gasparre et al. 2011; Iommarini et al. 2014), presumibilmente dovuto al mancato assemblaggio del CI. Nel complesso, tali evidenze sottolineano come alcuni tumori necessitino di una fosforilazione ossidativa funzionale per sostenere la progressione tumorale, impedendo la generalizzazione dell'ipotesi Warburg. Inoltre, sottolineano il ruolo essenziale del CI nel controllare il metabolismo, l'adattamento all'ipossia e la proliferazione cellulare, designandolo come un promettente target terapeutico (Fig.1.8)

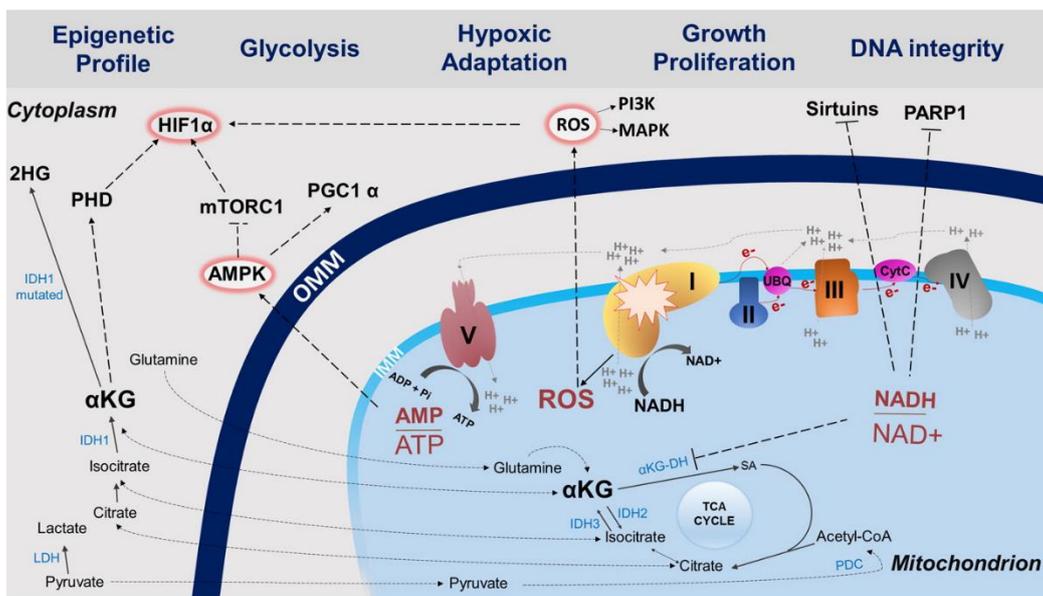


Fig.1.8: Rappresentazione schematica degli eventi molecolari e biochimici indotti dal deficit del CI (Vatrinet et al.; 2015).

Emergenti strategie terapeutiche anti-metaboliche, specialmente anti-Complesso I

È ormai ampiamente riconosciuto il ruolo determinante svolto dalle lesioni genetiche e del microambiente tumorale nell'influenzare la riprogrammazione metabolica nel cancro. Le cellule tumorali possono adottare strategie metaboliche diverse per sostenere la progressione e la crescita. Se, da un lato, un gruppo di tumori fa affidamento alla glicolisi per ricavare l'energia necessaria a supportare i processi biosintetici, in linea con l'ipotesi Warburg, dall'altro (Koppenol, Bounds, and Dang 2011), altri tipi di tumore, come la leucemia, il linfoma, l'adenocarcinoma duttale pancreatico ed il carcinoma endometriale richiedono una respirazione mitocondriale efficiente e funzionale per produrre l'energia necessaria a sostenere la biosintesi di macromolecole (Moreno-Sánchez et al. 2007). Dunque, mirare al metabolismo del cancro sta emergendo come un promettente approccio terapeutico poiché molti tumori solidi condividono alcune vie di riprogrammazione metabolica. A ciò, si aggiunge un ulteriore livello di complessità rappresentato dal TME, il quale, spesso, innesca delle risposte adattative in seguito alla terapia metabolica adottata, generando fenomeni di resistenza.

Una delle strategie terapeutiche anti-metaboliche è l'uso di inibitori dell'OXPPOS. Vari sottotipi tumorali si possono classificare in base ad un profilo ad "elevato OXPPOS" o "basso OXPPOS", sebbene uno studio di metanalisi condotto su 31 linee tumorali e 16 normali, ha evidenziato un contributo dell'OXPPOS dell'83% nella produzione di ATP (Zu and Guppy 2004). Un'analisi di espressione genica, eseguita su 2000 pazienti affetti da cancro al seno, mostrava una forte regolazione dell'OXPPOS, suggerendone una maggiore suscettibilità al trattamento con inibitori dell'OXPPOS (Whitaker-Menezes et al. 2011). Analisi di trascrittomica e metabolomica in cellule di adenocarcinoma duttale pancreatico (*KRAS* driver) mostravano un elevato profilo OXPPOS ed una ridotta glicolisi, rendendoli suscettibili al trattamento con inibitori dell'OXPPOS, come la metformina, nota la loro estrema resistenza al trattamento chemioterapico convenzionale (Lonardo et al. 2013). Gli inibitori dell'OXPPOS clinicamente validi devono essere efficaci, sia *in vitro* che *in vivo*, a concentrazioni tollerabili nei pazienti. Per l'approvazione di un nuovo farmaco in clinica vi sono quattro criteri essenziali da considerare, ovvero la potenza, gli effetti off-target, il regime di

dosaggio ed infine la farmacocinetica. Tali criteri sono parzialmente rispettati nella lista di inibitori dell'OXPPOS ad oggi fruibile. Sebbene esistano molecole capaci di inibire i cinque complessi dell'ETC, il target metabolico più promettente nelle terapie anticancro è il Complesso I, dovuto al suo cruciale ruolo nel controllo della proliferazione, nell'adattamento all'ipossia e nella biosintesi di aspartato (Calabrese et al. 2013, Birsoy et al. 2015). In particolare, la metformina è un inibitore del CI noto, ben tollerato ed approvato dalla FDA. In diversi studi sperimentali e clinici, la metformina ha mostrato un effetto inibitorio significativo sul potenziale tumorigenico (Chan 2016; Wheaton et al. 2014). Infine, altri farmaci addizionali che inibiscono il CI, tra cui BAY 87-2243 (Schöckel e al. 2015), IACS-0107759 (L. Zhang et al. 2019), sono attualmente in fase di trial clinico. Ciò evidenzia l'estrema esigenza di sintetizzare nuovi farmaci che inibiscano il CI, ma ad elevata specificità e potenza, con un delineato profilo farmacocinetico e privi di effetti off-target, in particolare nei confronti della popolazione cellulare normale che costituisce il TME.

Tuttavia, esistono emergenti terapie anti-metaboliche che mirano al metabolismo degli amminoacidi, bloccano il metabolismo dei lipidi o inibiscono enzimi del TCA. Un valido target del metabolismo amminoacidico è la glutaminasi (GLS), altamente espressa nei tumori. È un enzima chiave per sostenere le reazioni anaplerotiche, idrolizzando la glutammina extracellulare in glutammato, il quale sottoforma di α -KG entra nel TCA. Attualmente un noto inibitore della GLS, CB-839, è in fase di trial clinico, mostrando effetti terapeutici promettenti.

Un altro valido target è l'asparagina sintetasi (ASNS), enzima intracellulare deputato alla conversione dell'aspartato e glutammina in asparagina *de novo*. Recenti studi mostrano, infatti, come il knockdown di ASNS in cellule tumorali, induca a morte cellulare, dimostrando come l'asparagina sia un metabolita limitante per la proliferazione (J. Zhang et al. 2014). Pertanto, L-Asparaginasi è l'agente chemioterapico di prima linea utilizzato per il trattamento della leucemia linfocitica acuta (Egler, Ahuja, and Matloub 2016) (Fig.1.9).

In conclusione, l'idea del cancro come una malattia metabolica eleva le terapie anti-metaboliche come l'approccio certamente più promettente. Tuttavia, l'estrema eterogeneità e plasticità mostrata dai tumori umani sta avvicinando sempre di più la

comunità scientifica, in particolare il settore di oncologia clinica, all'idea di proporre terapie adiuvanti che sinergicamente inibiscano più vie metaboliche, spesso compensatorie, al fine di eradicare la patologia.

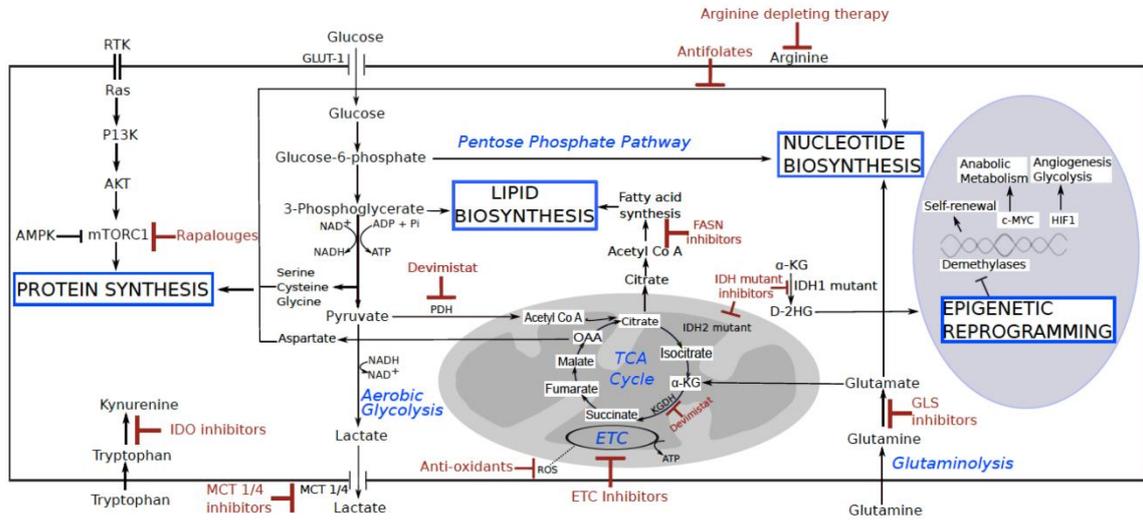


Fig.1.9: Rappresentazione schematica dei target di riprogrammazione metabolica nel cancro (Iorio et al.; 2021).

1.3 P53 nella regolazione del metabolismo

Controllo delle vie metaboliche mediate da p53

Le cellule tumorali mostrano un circuito alterato causato dall'accumulo di mutazioni su oncogeni ed oncosoppressori selezionate durante la progressione tumorale. Mutazioni in *TP53* sono state identificate in circa il 50% dei tumori umani che potrebbero condurre alla perdita della canonica funzione di oncosoppressore e all'acquisizione di una nuova funzione pro-oncogenica che promuove crescita e sopravvivenza.

La sua funzione di sensore dello stress fu per prima descritta in un contesto di stress genotossico attraverso la fosforilazione in Serina 15 mediata dalla proteina chinasi attivata dal DNA (PK) e dalla serina/treonina chinasi ATM, distruggendo l'interazione tra p53-MDM2 ed incrementando la sua attività e stabilità (Vogt Sionov and Haupt 1999). In queste circostanze, p53 arresta il ciclo cellulare, inducendo la trascrizione di *CDKN1A* (Brugarolas et al. 1995), che codifica per l'inibitore della chinasi ciclina dipendente, e *GADD45A* (Hollander et al. 1999), che codifica per una proteina capace di mediare a valle l'attivazione della segnalazione p38/JNK. Inoltre, in risposta al danno al DNA e a segnali iper-proliferativi, p53 può indurre l'apoptosi attraverso la trascrizione diretta di alcuni membri della famiglia Bcl-2, tra cui *BAX*, *Puma* e *Noxa* (Fridman and Lowe 2003). L'insieme delle risposte biologiche sopra menzionate rientrano nella categoria delle funzioni p53 classiche, studiate per oltre 40 anni (Fig.1.10A).

In realtà, un emergente tema nella biologia del cancro è che alcuni dei geni mutati coinvolti nell'innescò del processo tumorigenico sono strettamente correlati alla regolazione del metabolismo, tra cui l'oncosoppressore *TP53* di cui è un regolare essenziale. P53 regola la glicolisi (Bensaad et al. 2006), la fosforilazione ossidativa (Matoba et al. 2006), la glutaminolisi (Suzuki et al. 2010), la risposta antiossidante (Hu et al. 2010; Suzuki et al. 2010) ed infine coordina la segnalazione autofagica (Kroemer, Mariño, and Levine 2010), e di mTOR (Budanov and Karin 2008). La capacità di esercitare un controllo positivo e negativo su svariati pathway metabolici, combinata all'esistenza di meccanismi di regolazione a feedback mediati dai pathway su p53, dimostra la natura flessibile e reciproca della regolazione. Ciò garantisce l'innescò di un

ampio range di risposte allo stress metabolico, primariamente di tipo adattivo (Maddocks and Vousden 2011) (Fig.10B).

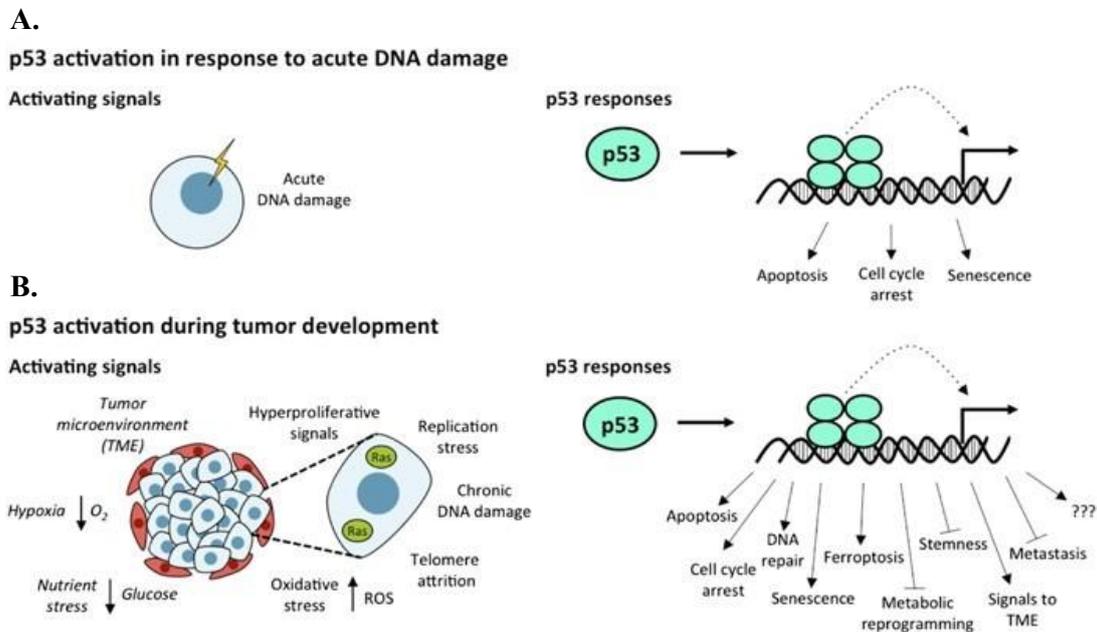
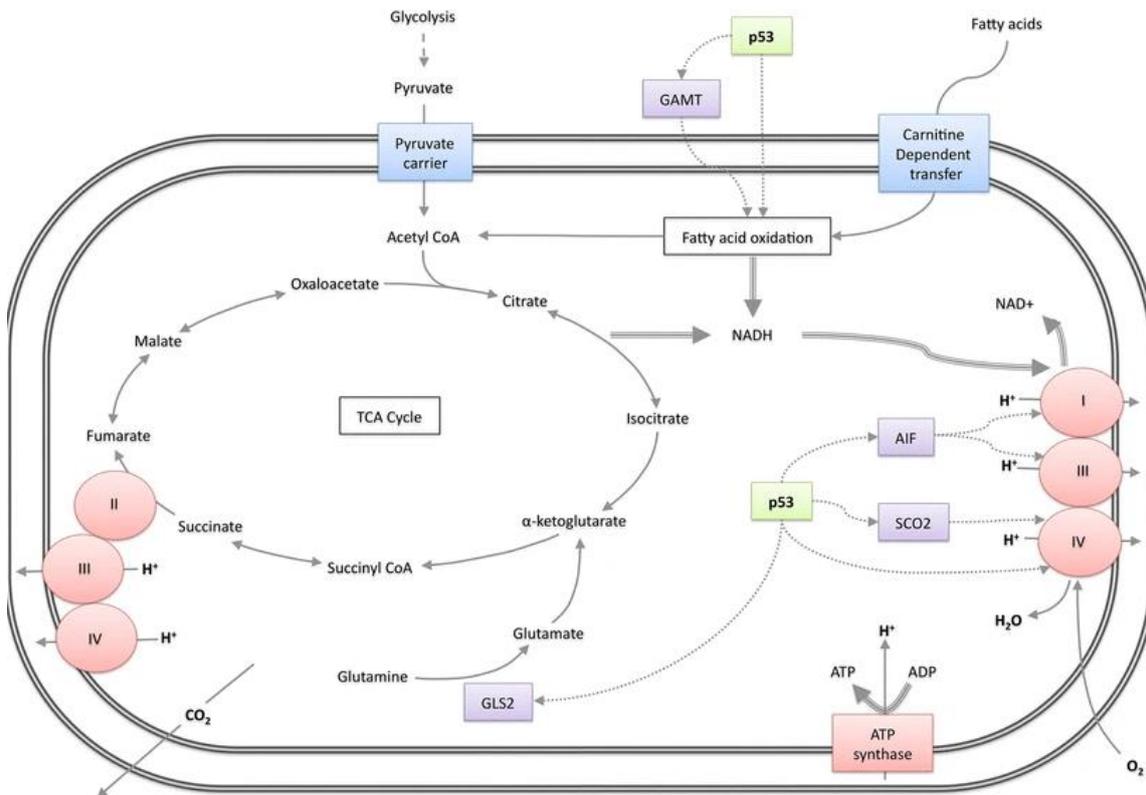


Fig.1.10: **A.** Risposta mediata da p53 in risposta al danno genotossico. **B.** Rivisitazione dei pathway di risposta mediati da p53 durante la progressione tumorale (Kaiser ed Attardi.; 2018).

Vari studi hanno evidenziato un ruolo cruciale di p53 nella regolazione del metabolismo del glucosio. P53, infatti, reprime l'espressione di numerosi trasportatori del glucosio, tra cui *GLUT1* e *GLUT4*, riducendo l'uptake di glucosio esogeno necessario per una rapida proliferazione (Schwartzberg-Bar-Yoseph, Armoni, and Karnieli 2004). Inibisce il flusso glicolitico intaccando la stabilità proteica dell'enzima fosfoglicerato mutasi (PGM), il quale promuove l'ottava reazione della glicolisi, ovvero la conversione del 3-fosfoglicerato in 2-fosfoglicerato (Kondoh et al. 2005) e promuovendo l'espressione di *TIGAR*, il quale degrada il fruttosio 2-6 bisfosfato, noto attivatore allosterico della fosfofruttochinasi 1 (PFK1), indirizzando gli intermedi glicolitici verso la shunt dei pentoso fosfati (PPP) (Fig.1.11B). Inoltre, p53 regola anche il metabolismo ossidativo promuovendo l'espressione di *SCO2* (Matoba et al. 2006), codificante per una subunità di assemblaggio essenziale del complesso della citocromo c ossidasi, e di *AIF*, codificante per il fattore di induzione dell'apoptosi mitocondriale, identificato come un componente essenziale per la funzionalità del Complesso I (Stambolsky et al. 2006; Vahsen et al. 2004). In aggiunta, p53 regola il metabolismo della glutammina grazie all'induzione di *GLS2*, la glutaminasi mitocondriale che idrolizza la glutammina in

glutammato, permettendone l'ingresso successivo nel TCA sottoforma di α -KG, sostenendo i processi anaplerotici (Suzuki et al. 2010) (Fig.1.11A). Il controllo di p53 anche sulla glutaminolisi conferirebbe un ulteriore vantaggio alle cellule tumorali, garantendo l'innesco di una risposta metabolica adattativa, in particolare in condizioni di carenza di glucosio. Altre possibili strategie promosse da p53 per favorire la sopravvivenza in condizioni di stress nutrizionale è mediante l'autofagia. Infatti, l'autofagia è un processo di degradazione di proteine non correttamente ripiegate e di organelli danneggiati che, in condizioni di carenza di nutrienti, può garantire un pool di amminoacidi per sostenere i processi anabolici (Kroemer, Mariño, and Levine 2010). Infatti, nella linea di carcinoma colon rettale HCT116, sottoposta ad un trattamento cronico in assenza di nutrienti, p53 wild-type diminuisce a livello trascrizionale l'espressione di *LC3*, importante regolare del macchinario autofagico, causando una riduzione del flusso autofagico, ma ancora sostenibile; nei modelli HCT116, nulli per p53, invece, la carenza di nutrienti induce un accumulo di LC3 che culmina con l'innesco dell'apoptosi.



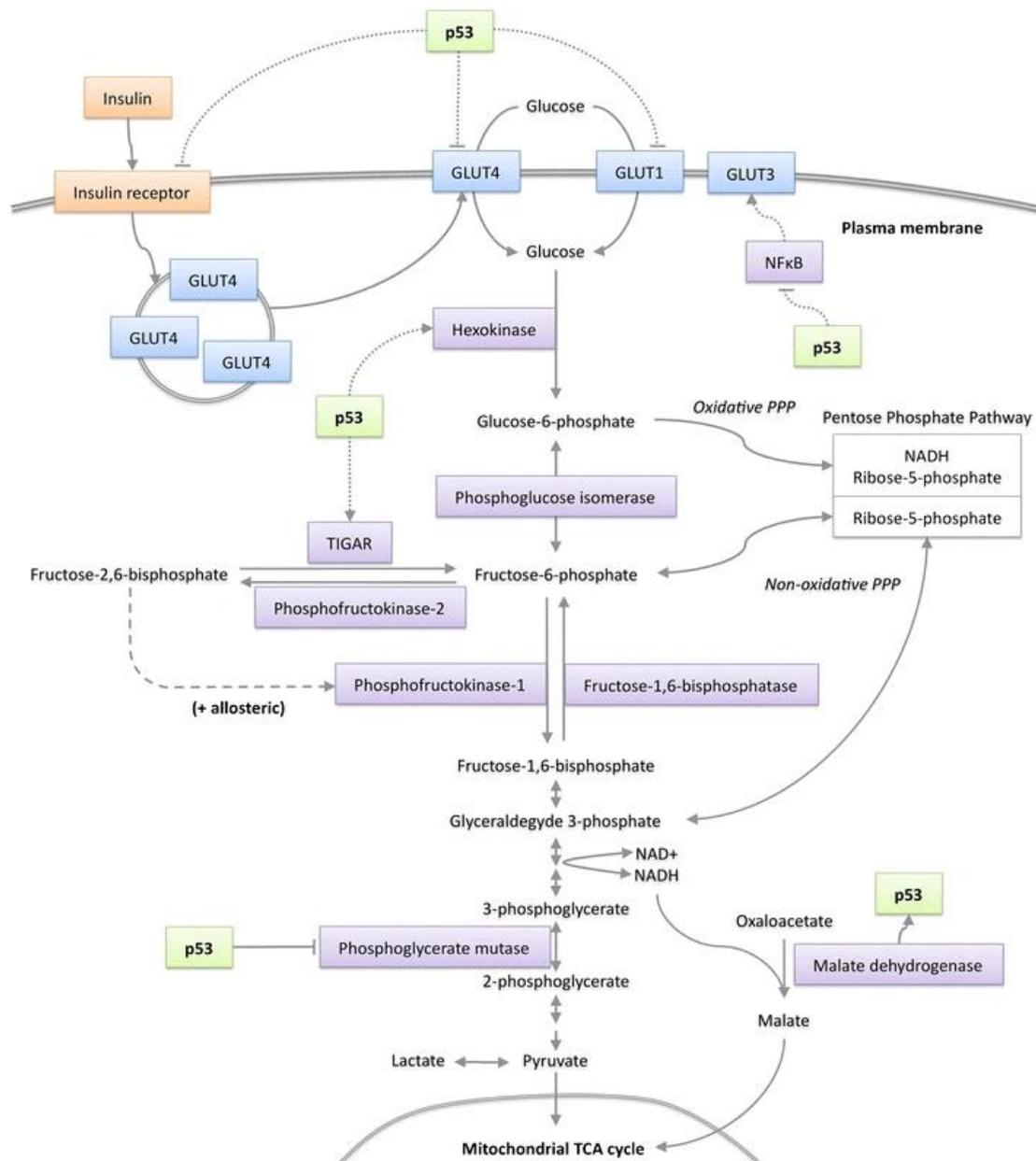


Fig.1.11: A. p53 e la respirazione mitocondriale (Maddock et al.; 2011). B. p53 ed il metabolismo del glucosio.

Ciò sottolinea come p53 possa regolare l'omeostasi del processo autofagico in base alle condizioni nutrizionali, promuovendo la sopravvivenza (Scherz-Shouval et al. 2010). Dunque, come è ormai ampiamente accettato, i tumori sono metabolicamente eterogenei e le scelte metaboliche adottate possono variare durante il progredire della patologia. Per cui, sebbene p53 è classicamente definito un oncosoppressore, il controllo

positivo esercitato sul metabolismo ossidativo e di omeostasi sull'autofagia potrebbero favorire i tumori con uno stato p53 wild-type, garantendo la sopravvivenza in determinate circostanze metaboliche. Controversa, invece, è la regolazione del metabolismo da parte dei mutanti p53. Il sequenziamento del genoma di centinaia di tumori umani ha confermato che circa il 50% presenta mutazioni sul gene *TP53*, sebbene la distribuzione e la frequenza delle mutazioni possa variare notevolmente tra i diversi tipi di tumore (Fig.1.12).

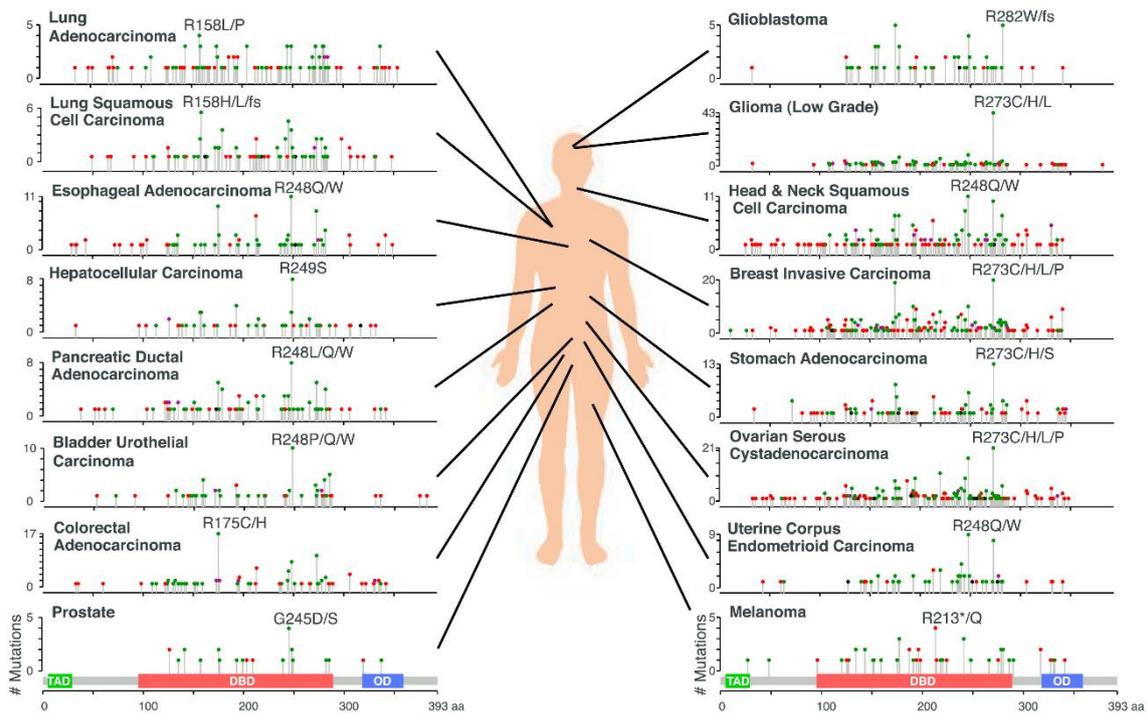


Fig.1.12: Distribuzione di mutazioni in *TP53* identificate in 16 diversi tipi di tumore. Ogni istogramma rappresenta il numero di mutazioni identificate lungo la sequenza di *TP53*. Il colore del simbolo indica il tipo di mutazione. Verde (missenso), Rosso (no senso), Nero (in frame) e Viola (multiple mutazioni) (Kastenhuber e Lowe.; 2017).

Molte delle varianti a singolo nucleotide (SNVs) sul gene *TP53* sono mutazioni missenso ed il 25% ricade nei cinque noti hotspot mutazioni di p53 (R175, G245, R248, R249, R273 and R282) (Shirole et al. 2016). Inaspettatamente, il 25% delle mutazioni sono no senso o frameshift predette codificare forme tronche della proteina p53, mentre le restanti mutazioni sono SNV con un significato biologico poco chiaro (Shirole et al. 2016). La perdita del secondo allele wild type può avvenire in diversi modi, ma più

frequentemente attraverso la “perdita di eterozigosi” (LOH) mediante eliminazione segmentale. Di tutte le possibili combinazioni alleliche, in realtà solo circa il 25% dei tumori ospita la combinazione canonica mutazione p53 missenso/delezione allele wild type (Liu et al. 2016). L’effetto biologico dei mutanti di p53 identificati è stato spesso correlato all’acquisto di una funzione neomorfa, esacerbando il potere metastatico ed invasivo del tumore. Molte mutazioni identificate, però, sono di significato funzionale ancora ignoto (Kasthuber and Lowe 2017).

Per tanto, sono poche le evidenze in letteratura che chiarificano il ruolo dei mutanti p53 nel metabolismo. Per esempio, in condizioni di stress ossidativo, i mutanti p53 (p.R175H, p.R248Q e p.R273H) inibiscono l’espressione di enzimi detossificanti di fase 2, promuovendo la sopravvivenza (Kalo et al. 2012). In un lavoro del 2013, dimostrano che tre mutazioni hotspot di p53 (p.R175H, p.R248Q e p.R273H) promuovono l’effetto Warburg, attivando l’asse Rho/ROCK ed inducendo a valle la traslocazione del trasportatore GLUT1 sulla membrana plasmatica. Ciò è correlato con un aumento dell’uptake di glucosio e della produzione di lattato. Inoltre, questo lavoro dimostra che il controllo dei mutanti di p53 su GLUT1 non è di tipo trascrizionale (C. Zhang et al. 2014), come dichiarato invece in altri lavori. Inoltre, alcuni mutanti p53, sebbene nel lavoro non specificano il tipo di mutazione, inducono l’espressione di alcuni geni coinvolti nella sintesi *de novo* dei nucleotidi, garantendo un vantaggio proliferativo (Kollareddy et al. 2015). Infine, in un recente lavoro del 2017 saggiano l’effetto sul metabolismo di diversi mutanti p53 (p.R175H, p.R181H, p.R249S, p.R273H) valutando parametri come l’acidificazione extracellulare (ECAR), il consumo di ossigeno (OCR) e l’espressione di geni coinvolti nel metabolismo ossidativo, notoriamente target di p53 wild-type. I mutanti analizzati mostrano un impatto sul metabolismo diverso e, spesso, lo stesso mutante può regolare il metabolismo in maniera diversa in funzione del contesto cellulare in esame. Dunque, sebbene in questo lavoro confermano la promozione della glicolisi da parte di alcuni mutanti di p53, lo stesso non si osserva per altri. Tali dati indicano che alcune risposte metaboliche esercitate dai mutanti p53 potrebbero essere cellula specifico e non appartenere ad una risposta generale (Eriksson et al. 2017). In conclusione, p53 wild-type ed i mutanti di p53 esercitano indubbiamente un controllo sul

metabolismo cellulare, ma se la presenza di p53 wild-type inibisce o favorisce la crescita tumorale rimane una questione ancora aperta e dibattuta (Khan et al. 2017).

Ruolo di p53 nell'adattamento metabolico in condizioni di deficit dell'ETC

L'attivazione di AMPK in seguito alla deprivazione di glucosio conduce all'attivazione di p53 attraverso la fosforilazione in Serina 15, inducendo un blocco persistente del ciclo cellulare in fase G1 (Jones et al. 2005). Ciò suggerisce che gli stessi target di p53 indotti durante lo stress genotossico possono essere attivati in condizioni di stress metabolico. Inoltre, l'attivazione di AMPK è osservata anche in seguito ad un deficit del CI (Iommarini et al. 2014), a causa dello sbilanciamento del rapporto AMP/ATP, il quale potrebbe attivare a valle p53. L'attivazione di p53 può indurre l'espressione di *setrina1* e *setrina2*, i quali, tramite interazione, possono attivare AMPK innescando un meccanismo a feedback positivo (Budanov and Karin 2008). L'attivazione di AMPK, oltre che attivare p53, può agire positivamente su TSC2, promuovendo l'inibizione di mTOR. Ciò dimostra che esiste una comunicazione reciproca tra i pathway di segnalazione, influenzando le risposte adattative innescate. Inoltre, il sensore energetico AMPK promuove l'attivazione indiretta di p53 mediando la fosforilazione inibitoria nella Serina 342 di MDMX (He et al. 2014) e della treonina 344 della deacetilasi SIRT1 (Lee et al. 2012), due noti regolatori negativi di p53. Un ulteriore livello di complessità alla regolazione di p53 è dato dalla molteplicità dei siti di modificazione post-traduzionale. È stato autorevolmente dimostrato che la fosforilazione in Serina 46 di p53 induce l'espressione di geni pro-apoptotici in risposta a stimoli diversi (Vousden and Lu 2002), a differenza della risposta innescata da p53 in seguito alla fosforilazione in Serina 15. Dunque, potremmo speculare che p53 è preferenzialmente fosforilata in Serina 15 in condizioni di stress acuto, inducendo un arresto del ciclo cellulare; se la perturbazione persiste, la fosforilazione in Serina 46 prevale, inducendo l'apoptosi.

Un ruolo emergente di p53 è la regolazione del metabolismo degli amminoacidi. Alcuni tumori sono noti essere auxotrofi per specifici amminoacidi (Ensor et al. 2002), una condizione che potrebbe essere esacerbata in condizioni di deficit generale dell'ETC o riduzione del TCA. Infatti, l'attività dell'ETC, in particolare del CI, è cruciale per

fornire il pool di equivalenti riducenti per la sintesi di aspartato (Sullivan et al. 2015). Dunque, il deficit del CI causa l'auxotrofia da aspartato, il quale potrebbe influenzare negativamente la proliferazione cellulare essendo un amminoacido necessario per la sintesi di nucleotidi e proteine. Inoltre, livelli limitati di aspartato e glutammina a livello intracellulare contribuiscono al decremento di altri importanti amminoacidi, tra cui asparagina, arginina, istidina e serina (Krall and Christofk 2015). In queste circostanze, l'attivazione di AMPK, in seguito al deficit del CI, potrebbe attivare p53, il quale innescerebbe delle risposte adattive. Infatti, è noto che in condizioni di deprivazione di glutammina p53 promuove l'espressione di *SLC1A3*, un trasportatore glutammato/aspartato, favorendo l'adattamento delle cellule tumorali (Tajan et al. 2018). In presenza di un difetto sul CI, l'espressione di *SLC1A3* mediata da p53 potrebbe favorire l'uptake di aspartato, compensando l'auxotrofia tipica dei tumori con un deficit indotto sul CI. Inoltre, p53 è noto regolare positivamente un altro trasportatore della famiglia SLC, *SLC7A3*, incrementando l'uptake di arginina e supportando la sopravvivenza cellulare (Lowman et al. 2019). Infine, in condizioni di carenza di serina, p53 attiva p21 ed induce un arresto del ciclo cellulare, promuovendo la sopravvivenza in cellule di carcinoma colon rettale (Maddocks et al. 2013).

P53 gioca anche un importante ruolo in risposta allo stress ossidativo, condizione che si instaura frequentemente in presenza di deficit generale dell'ETC, in particolare del CI. Potremmo speculare che l'incremento di espressione di *TIGAR*, noto target di p53, in seguito al deficit del CI, potrebbe mitigare gli eccessivi livelli di ROS, sottolineando una funzione citoprotettiva indiretta mediata da p53. Infatti, l'espressione di *TIGAR* si riflette in un rallentamento del flusso glicolitico ed un reindirizzamento degli intermedi glicolitici verso lo shunt dei pentoso fosfati, cruciale per ripristinare il pool di NADPH intracellulare e per rinforzare le difese antiossidanti (Bensaad et al. 2006). Ed infine, p53 regola l'espressione di *GLS2*, la glutaminasi mitocondriale che idrolizza la glutammina a glutammato, alimentando i processi anaplerotici e potenziando la sintesi di glutatione (GSH) in funzione citoprotettiva (Hu et al. 2010; Suzuki et al. 2010). La molteplicità di possibili target molecolari regolati da p53 wild-type in seguito al deficit del CI, o ad un danno generale dell'ETC, sottolineano un suo ruolo cruciale svolto nell'adattamento metabolico, rendendo sempre più ambigua la sua funzione nel cancro.

2. SCOPO

La riprogrammazione metabolica è ormai riconosciuta come un hallmark del cancro. Il primo segnale di riprogrammazione metabolica è guidato dall'attivazione di segnali oncogenici (De Berardinis and Chandel 2016). Ad esempio, mutazioni nell'oncosoppressore *TP53* sono correlate ad attività anaboliche o cataboliche, includendo la glicolisi. La glicolisi aerobia è tra le vie metaboliche adottate da gran parte dei tumori solidi, evidenziando una forte dipendenza alla disponibilità di glucosio (Heiden, Cantley, and Thompson 2009). Nei tumori, tale sensibilità è fortemente accentuata in presenza di un deficit del Complesso I mitocondriale ove il metabolismo glicolitico è tra le vie alternative attuate per compensare il difetto nella respirazione mitocondriale (Iommarini et al. 2013), sebbene, mutazioni che danneggiano la funzionalità dei mitocondri possano anche innescare una riprogrammazione metabolica verso la carbossilazione riduttiva della glutammina (Mullen et al. 2012).

Sulla base di quanto emerge dalla letteratura, lo scopo principale di questo studio è comprendere se e come lo stato genetico di p53, mutato in circa il 50% dei tumori umani, possa influenzare l'adattamento metabolico in seguito al deficit indotto sul CI. Riuscire a stratificare i tumori in base all'effetto sul metabolismo delle mutazioni nei più noti driver della tumorigenesi, assumerebbe rilevanza in clinica, in particolare nell'ambito della medicina personalizzata.

3. MATERIALI E METODI

MATERIALI

3.1 Colture cellulari

In questo studio sono state utilizzate diverse linee cellulari tumorali:

- La linea di osteosarcoma 143B presenta una mutazione missenso nel quinto esone del gene oncosoppressore *TP53* in corrispondenza del suo dominio di legame al DNA (c.467G>C), generando una sostituzione amminoacidica p.R156P e contiene mtDNA wild-type. Nella medesima linea è stato precedentemente indotto, tramite *genome editing*, il knock-out nel gene di codifica nucleare *NDUFS3*, mediante inserzione c.9_10insCGGCG, impedendo l'assemblaggio del Complesso I. In particolare, il *genome editing* genera una mutazione frameshift in omozigosi che risulta in un prematuro codone di stop e nella sintesi di una proteina tronca, non funzionale. Inoltre, mediante tale procedura sperimentale, sono stati ottenuti i cloni revertanti *NDUFS3*^{+/+}, che rappresentano la linea di controllo CI competente (Kurelac et al.; 2019). La linea 143B è stata acquistata su ATCC (#CRL-8303).
- Le linee cellulari di carcinoma colon-rettale HCT116, con uno stato genetico *TP53* nullo e mtDNA wild-type in cui, come nella linea 143B, è stato precedentemente indotto, tramite *genome editing*, il knock-out per il gene nucleare *NDUFS3* con l'inserzione c.9_10insCGGCG. In particolare, il *genome editing* genera una mutazione frameshift in omozigosi che risulta in un prematuro codone di stop e nella sintesi di una proteina tronca, non funzionale. Dalla selezione clonale, successiva al *genome editing*, si è ottenuta anche la linea singenica *NDUFS3*^{+/+} (Kurelac et al.; 2019). In parallelo, dalle linee HCT116^{NDUFS3-/-; p53-/-} e HCT116^{NDUFS3+/+; p53-/-}, attraverso infezioni con virus ricombinanti, sono state generate le controparti p53wild-type e p53R156P, rinominate: HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} e HCT116^{NDUFS3+/+; p53+/+}, HCT116^{NDUFS3-/-; p53R156P} e HCT116^{NDUFS3+/+; p53R156P}.

- La linea di carcinoma ovarico OV90 deriva dal liquido ascitico prelevato da una paziente affetta da diagnosi di adenocarcinoma sieroso in stadio avanzato al momento della diagnosi (Provencher, D. M. et al; 2000). La linea presenta una mutazione missenso nel sesto esone del gene oncosoppressore *TP53*, in corrispondenza del suo dominio di legame al DNA (c.643A>C), generando una sostituzione amminoacidica p.S215R. Nella linea OV90 è stata introdotta una mutazione frameshift nel gene *NDFUS3* grazie al sistema CRISPR/Cas9, usando una guide indirizzata sull'esone 2 TGTCAGACCACGGAATGATG (De Luigi et al.; 2021). Dalla selezione clonale, si è ottenuta la linea singenica *NDUFS3*^{+/+}. La linea è stata acquistata da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).
- La linea cellulare XTC1 deriva da metastasi nella ghiandola mammaria di un tumore oncocitico tiroideo ed è caratterizzata dalla mutazione omoplasmica m.3571ins/*MT-ND1*, che causa un completo disassemblaggio del CI. Tali cellule risultano mutate nell'oncosoppressore p53 (P171T).

| Linea cellulare | Mutazione cDNA <i>TP53</i> | Mutazione proteina p53 | Terreno di coltura |
|--|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 143B ^{NDUFS3+/+} | c.467G>C | p.R156P | DMEM +uridina |
| 143B ^{NDUFS3-/-} | c.467G>C | p.R156P | “ |
| HCT116 ^{NDUFS3+/+} | WT | WT | “ |
| HCT116 ^{NDUFS3-/-} | WT | WT | “ |
| HCT116 ^{NDUFS3+/+} | NULLO | NULLO | “ |
| HCT116 ^{NDUFS3-/-} | NULLO | NULLO | “ |
| XTC1 ^{m.3571ins/<i>MT-ND1</i>} | c.451C>A | p.P151T | “ |
| OV90 ^{NDUFS3+/+} | c.643A >C | p.S215R | DMEM |
| OV90 ^{NDUFS3-/-} | c.643A >C | p.S215R | “ |
| HCT116 ^{NDUFS3-/-} pool | c.467G>C | p.R156P | DMEM+uridina + puromicina |
| HCT116 ^{NDUFS3-/-} pool | WT | WT | “ |
| HCT116 ^{NDUFS3-/-} pool | NULLO | NULLO | “ |

Tabella 1: Elenco delle linee cellulari utilizzate nello studio, classificate in base allo stato genetico di *TP53* ed al terreno di coltura utilizzato per il mantenimento in coltura.

METODI

3.2 Condizioni di coltura

Le linee cellulari tumorali in esame sono state coltivate in un terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Euroclone #ECM0749L) 25mM di D-Glucosio e 110mg/L di sodio piruvato (Na-Pyr), a cui è stato addizionato il 10% di Siero Fetale Bovino (FBS) (Euroclone #ECS0180L), 2mM di L-Glutammina (Euroclone #ECB3000D), 100µg/mL di streptomina (Euroclone #ECB3001D), 100µg/mL di penicillina (Euroclone #ECB3001D) e 50ng/mL di uridina (Sigma-Aldrich #U3003), a 37°C in atmosfera umidificata ed in presenza del 5% di O₂.

Per i trattamenti in basso glucosio (LG) è stato utilizzato il terreno DMEM, no glucosio (Gibco™ 11966025) 4mM di L-Glutammina, addizionato con il 10% FBS, 100µg/mL streptomina/penicillina, 50ng/mL di uridina, 1mM di sodio piruvato e 5mM di D-glucosio (Sigma-Aldrich #G8270). Inoltre, per gli esperimenti di supplemento di aspartato, il medesimo terreno LG è stato addizionato con 5mM di aspartato (Sigma-Aldrich #56-84-8). Dopo aver pesato e solubilizzato l'aspartato nel terreno, si è misurato il pH tramite un piaccmetro, aggiungendo gocce di NaOH 5N fino al raggiungimento di valori di pH fisiologicamente tollerati dalle cellule in coltura (pH 7.2 circa). Il terreno è filtrato sotto cappa a flusso laminare.

3.3 Saggio di proliferazione con IncuCyte S3

IncuCyte live-cell Analysis System è uno strumento che permette lo studio di molteplici processi biologici cellulari in tempo reale attraverso un sistema automatizzato di *live-imaging*. Lo strumento è posizionato all'interno di un incubatore standard, in modo da garantire il mantenimento delle condizioni di coltura ottimali (37°C e 5% di CO₂) durante l'analisi della vitalità cellulare. Lo strumento è costituito da un vassoio, su cui è possibile posizionare sei piastre diverse ad ogni utilizzo, e da un sistema di obiettivi, al di sotto del vassoio, che acquisisce le immagini in live imaging per l'intera durata dell'esperimento. Gli obiettivi di cui è dotato *IncuCyte* sono in grado di acquisire immagini ad alta risoluzione, sia in contrasto di fase che in fluorescenza (nel rosso e nel

verde). Il sistema ottico completamente automatizzato include diversi ingrandimenti ed autofocus. Lo strumento è collegato ad un software attraverso il quale è possibile impostare le condizioni sperimentali, la visualizzazione delle immagini e l'analisi dei dati (Fig.3.3).



Fig.3.3: *IncuCyte live-cell Analysis System*

Per i saggi di proliferazione, le cellule tumorali sono state seminate in una piastra 96-well, utilizzando un numero di cellule specifico per ogni combinazione cellulare, così da ottenere una confluenza nel pozzetto di circa il 70-90% dopo 72h.

| Linea cellulare | Numero di cellule seminate |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| HCT ^{NDUFS3+/+; p53+/+} | 2500 |
| HCT ^{NDUFS3-/-; p53-/-} | 2500 |
| OV90 ^{NDUFS3+/+; p53S215R} | 5000 |
| OV90 ^{NDUFS3-/-; p53S215R} | 5000 |
| 143B ^{NDUFS3+/+; p53R156P} | 2600 |
| 143B ^{NDUFS3-/-; p53R156P} | 2600 |

Tabella 2: *Numero di cellule seminate per ogni combinazione cellulare*

Una volta eseguiti i trattamenti, si posiziona la piastra nello strumento e si impostano le condizioni di acquisizione delle immagini come segue:

- Obiettivo: 10X
- Contrasto di fase
- Numero di immagini per pozzetto (5)
- Acquisizione delle immagini ogni 2 ore per un intervallo di tempo di 72h
- Tipo di analisi: *basic-analyzer*

Per ottenere i dati relativi alla confluenza, il software applica una maschera di confluenza che viene impostata dallo sperimentatore in base alla morfologia della linea cellulare che sta analizzando. Questo passaggio è cruciale per stabilire il numero esatto di oggetti che il software conta e quantifica, permettendo l'esclusione di detriti che erroneamente possono essere quantificati, alterando l'analisi (Fig.3.4).

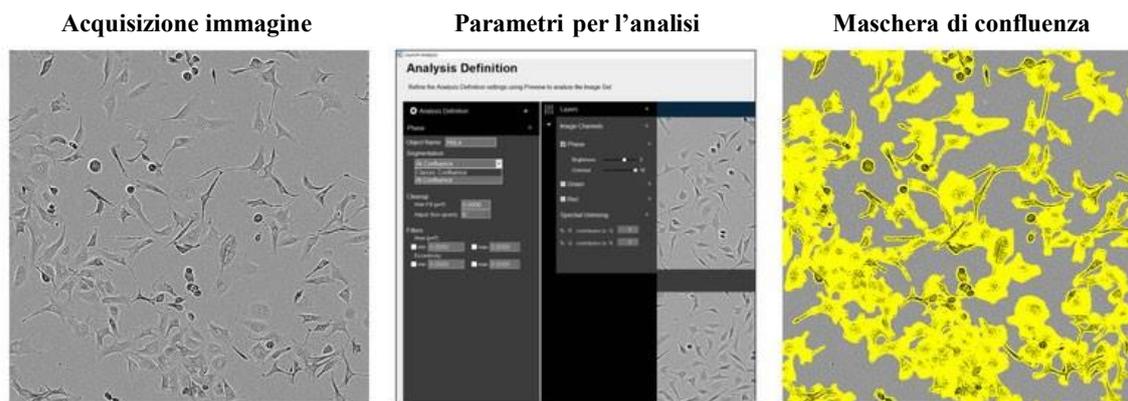


Fig.3.4: *IncuCyte Vessel View. L'analisi della confluenza cellulare viene effettuata dal software applicando una maschera (in giallo) in grado di riconoscere il numero di oggetti (cellule) nel pozzetto.*

L'analisi dei dati, a partire dalla confluenza cellulare rilevata dallo strumento, è stata effettuata con una normalizzazione al tempo zero (T0), che equivale al giorno 0 di trattamento.

Ogni esperimento è stato condotto, al minimo, in triplicato biologico ed il dato raffigurato rappresenta la media di almeno tre esperimenti indipendenti.

3.4 Clonaggio

Il clonaggio del gene *TP53* mutato (c.467G>C) nel vettore retrovirale pMSCVpuro (Clontech) (Fig.3.5), derivato dal virus delle cellule staminali murine (MSCV), ha previsto:

- La preparazione dell'inserto contenente la sequenza di *TP53* con la mutazione in esame e del vettore
- L'inserzione stabile dell'inserto nel vettore mediante reazione di ligazione con T4 DNA ligasi
- La trasformazione di cellule batteriche competenti, selezionandole in un terreno selettivo

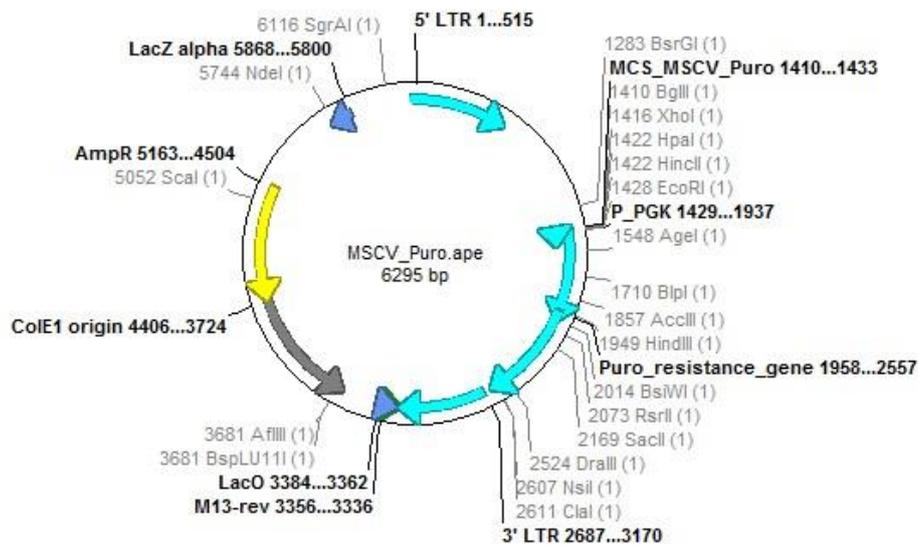


Fig.3.5: Mappa del vettore pMSCV in cui è stato clonato il cDNA di *TP53*.

3.4.1 Amplificazione del gene *TP53* mediante la reazione a catena della Polimerasi (PCR)

Per ottenere l'inserto codificante per la proteina p53^{R156P} è stata eseguita una reazione di PCR utilizzando come stampo il vettore pcDNA3.1 (-), contenente il gene di interesse. Sono stati utilizzati primer specifici per il gene *TP53* contenenti alle estremità

degli adattatori con i siti di restrizione degli enzimi *BglIII* e *XhoI* (Thermo Scientific). Le sequenze dei primer sono riportate in tabella:

| Primer | Sequenza FASTA |
|-----------|----------------------------------|
| BglIII FW | 5'-ATTAGATCTATGGAGGAGCCG-3' |
| XhoI RV | 5'-CTTCTCGAGTCAGTCTGAGTCAGGCC-3' |

Tabella 3: Primer utilizzati per inserire a monte del prodotto di PCR (l'inserto contenente il cDNA di TP53 con la mutazione in esame) due nuovi siti di restrizione. In verde: i tre nucleotidi inseriti come protezione del sito di taglio; in rosso: i cinque nucleotidi corrispondenti al sito di taglio specifico.

Di seguito sono riportate le condizioni relative alla miscela di reazione di PCR (V_f : 20 μ L) e dei cicli di amplificazione. Per la reazione è stata utilizzata la *Taq Herculase II fusion DNA polymerase* (Agilent).

| Reagenti | Volume |
|--|-------------|
| Herculase II reaction buffer (5X) | 4 μ L |
| dNTP mix (25mM each dNTP) | 0.5 μ L |
| DNA (20ng) | 2 μ L |
| Primer FW (0.25 μ m) | 1 μ L |
| Primer RV (0.25 μ m) | 1 μ L |
| DMSO (1,5%) | 0.3 μ L |
| Taq Herculase II fusion DNA polymerase | 0.2 μ L |
| H ₂ O distillata | 11 μ L |

Tabella 4: Condizioni relative alla miscela di reazione di PCR.

| Temperatura | Tempo | Cicli |
|-------------|-------|-------|
| 95°C | 1min | 1 |
| 95°C | 20sec | 30 |
| 58°C | 20sec | |
| 68°C | 60sec | |
| 68°C | 4min | 1 |

Tabella 5: Impostazioni del termociclatore per la reazione di PCR.

L'integrità del prodotto di PCR è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 2%. Successivamente, il DNA di interesse amplificato è stato purificato mediante estrazione su gel di agarosio all'1,5%, utilizzando il kit commerciale Expin™ Gel SV Protocol (GeneAll). La banda di interesse è stata escissa dal gel mediante taglio e pesata per calcolare la quantità di gel tagliato. Sono stati aggiunti tre volumi di Buffer GB rispetto al volume di gel pesato. Questo reagente è fondamentale per permettere, in seguito, il legame del DNA alla membrana di silice. Dopo una breve centrifuga, il campione è stato posto in bagnetto termostato (50°C) per 10 min. Il gel disciolto, contenente il prodotto di PCR di interesse, è stato trasferito su una colonnina e centrifugato per un 1 minuto a 12.000 rpm. Dopo aver eliminato lo scarto, sono stati aggiunti alla colonnina 700 µL di Buffer NW e centrifugato per 30 secondi a 12.000 rpm. Per l'eluizione del prodotto di PCR, la colonnina è stata trasferita in una nuova eppendorf aggiungendo 50 µL di acqua nucleasi-free e centrifugando per un 1 minuto a 12.000 rpm. Il DNA eluito è stato conservato a -20°C.

3.4.2 Digestione del DNA con endonucleasi di restrizione

Le reazioni di digestione con endonucleasi di restrizione effettuate in questo lavoro sono state condotte tutte a 37°C rispettando i tempi di azione di ogni singolo enzima. È stata utilizzata la stessa coppia di enzimi per la digestione del vettore e dell'inserto.

Per evitare la chiusura del vettore senza l'inserto, il vettore linearizzato è stato sottoposto ad un ulteriore trattamento con fosfatasi alcalina *FASTAP* (*Thermo Scientific*).

La miscela di reazione del vettore, in un volume finale di 20 µl, conteneva:

- 2 µl di DNA plasmidico *pMSCVpuro* vuoto (500ng/µl)
- 2 µl di Buffer FD 10X
- 1 µl di BglII
- 1 µl di XhoI
- 1 µl di FAST AP (1U/µl)
- 13 µl di H2O sterile

La miscela di reazione dell'inserto codificante *TP53*, in un volume finale di 30 µl, conteneva:

- 10 µl di DNA (0.2 µg)
- 2 µl di Buffer FD 10X
- 1 µl di BglII
- 1 µl di XhoI
- 16 µl di H₂O sterile

Gli enzimi di restrizione non sono stati aggiunti contemporaneamente nella miscela, ma sono stati seguiti i singoli tempi di azione, rispettivamente 25 minuti per *BglII*, e 10 minuti per *XhoI* e per la *FASTAP*. Infine, per inattivare l'attività delle endonucleasi, le miscele sono state poste a 80°C per 5 minuti.

Successivamente, i prodotti di digestione sono stati precipitati con due approcci differenti, mediante cui è stato possibile isolare sia il vettore aperto sia l'amplificato digerito grazie alla diversa grandezza dei frammenti.

La soluzione contenente il vettore vuoto, con l'aggiunta di Sodio Acetato (NaAc) 3M pari ad 1/10 del volume iniziale e di etanolo assoluto pari ad un volume di 2.5 volte il volume complessivo, è stata incubata a -20°C per 30 minuti. In seguito, la soluzione è stata centrifugata a 1600 g per 40 minuti a 4°C ed il pellet ottenuto è stato lavato con 30 µl di etanolo al 70%, centrifugando a 1600 g per 15 minuti a 4°C.

Il pellet allontanato del surnatante è stato essiccato e risospeso in 20 µl di H₂O sterile. Invece, la purificazione dell'inserto è stata ottenuta mediante precipitazione su piastra *Millipore* insieme all'azione della pompa a vuoto, con l'intento di evitare di perdere gran parte del prodotto, essendo quest'ultimo di dimensioni ridotte. Il DNA è stato risospeso in 20 µl di H₂O.

3.4.3 Reazione di ligazione e trasformazione batterica

L'inserto codificante *TP53/c.467G>C* è stato integrato all'interno del vettore pMSCVpuro grazie all'enzima T4 DNA ligasi (*Thermo Scientific*). La reazione di ligazione è stata preparata in un volume di 20 µl aggiungendo:

-
- 1.42 µl di vettore (≈50 ng)
 - 2.60 µl di inserto (≈65 ng)
 - 2 µl di Buffer 10X
 - 1 µl di T4 ligasi
 - 12.98 µl di H₂O sterile

Come controllo negativo della ligazione, è stata eseguita una reazione identica alla precedente ma priva dell'inserto. La reazione di ligazione è avvenuta alla temperatura di 22°C per 1 ora, seguita da una reazione di inattivazione dell'enzima a 70°C per 5 minuti.

Il vettore è stato clonato in cellule competenti di *Echerichia Coli*, ceppo HST08 (*Takara-Clontech*). Le cellule competenti, conservate a -80°C, sono state scongelate in ghiaccio. A 50 µl di cellule scongelate, sono stati aggiunti 2.5 µl di miscela di entrambe le ligasi. Le cellule sono state incubate insieme al plasmide in ghiaccio per 30 minuti; quindi, sono state sottoposte a shock termico ponendole in bagnetto termostato a 42°C per un tempo di 45 secondi e in seguito la sospensione batterica è stata posta in ghiaccio per 2 minuti. Questo shock termico porta alla formazione di sbilanciamenti di carica sulla membrana plasmatica, favorendo la formazione di correnti che portano all'entrata del plasmide nelle cellule. Le cellule sono state inoculate in 500 µl di *SOC Medium* (*Clontech*) e incubate a 37°C in agitazione (200 rpm) per 1 ora. Questa è una fase molto importante in quanto permette ai batteri trasformati correttamente di esprimere il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina contenuto nel plasmide pMSCVpuro. Successivamente, sono stati distribuiti 50 µl, 125 µl e 250 µl su piastre contenenti 20 ml di terreno LB-Broth solido (Tryptone 10g/L, NaCl 5g/L, Estratto di Lievito 5g/L e Agar 15g/L) con aggiunta dell'antibiotico selettivo (ampicillina 100 µg/ml). Le piastre sono state incubate a 37°C *overnight*.

La corretta integrazione del plasmide è stata verificata attraverso una reazione di *PCR colony*. Come stampo sono state utilizzate alcune cellule batteriche prelevate da singole colonie selezionate e risospese in LB liquido.

Sono stati utilizzati i primer interni di pMSCV che fiancheggiano l'inserto riportati di seguito:

| Primer | Sequenza FASTA |
|----------------------|-------------------------------|
| pMSCV <i>forward</i> | 5'-CCCTTGAACTCCTCGTTTCGACC-3' |
| pMSCV <i>reverse</i> | 5'-GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC-3' |

Tabella 6: Sequenza per esteso dei primer utilizzati per verificare la corretta integrazione del plasmide (PCR colony).

La miscela di reazione conteneva:

- 1 µl primer forward (5µM)
- 1 µl primer reverse (5µM)
- µl KAPA2G Fast PCR (KAPA Biosystems)
- µl H2O distillata

La reazione di PCR è avvenuta alle seguenti condizioni:

| Temperatura | Tempo | Cicli |
|-------------|--------|-------|
| 94°C | 5 min | 1 |
| 94°C | 10 sec | 40 |
| 60°C | 10 sec | |
| 72°C | 3 sec | |
| 72°C | 1 min | 1 |

Tabella 7: Impostazioni del termociclatore per la reazione di PCR colony.

3.5 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico ricombinante

Singole colonie batteriche contenenti rispettivamente il vettore integrante la sequenza di *TP53/c.467G>C* e il vettore pMSCV vuoto sono state coltivate in 50 mL di LB e ampicillina 100µg/ml *overnight* e in agitazione. Dai pellet, ottenuti centrifugando le colture a 4500 rpm per 15 minuti a 4°C, è stato estratto il DNA plasmidico mediante il kit *Genopure Plasmid Midi 7.0 (Roche)*, seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Il DNA ottenuto è stato quantificato con il NanoDrop2000 (*Thermobioscience*), diluito

alla concentrazione di 20ng/μl ed è stata verificata l'effettiva integrazione dell'inserto attraverso il sequenziamento Sanger. L'entità del DNA plasmidico è stata confrontata con la sequenza di riferimento *TP53* WT, reperita su Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) (ENST00000617185.4).

Sono stati utilizzati i seguenti primers e programma di reazione:

| Primer | Sequenza FASTA |
|----------------------|-------------------------------|
| pMSCV <i>forward</i> | 5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC-3' |
| pMSCV <i>reverse</i> | 5'-GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC-3' |
| TP53-1F | 5'-GTCCCCGGACGATATTGAAC-3' |
| TP53-2F | 5'-CCTTCCCAGAAAACCTACCA-3' |
| TP53-3F | 5'-CTTTTCGACATAGTGTGGTGGT-3' |

Tabella 8: Sequenza per esteso dei primer utilizzati per la reazione di sequenza.

| Temperatura | Tempo | Cicli |
|-------------|--------|-------|
| 96°C | 1 min | 1 |
| 96°C | 10 sec | 35 |
| 50°C | 5 sec | |
| 60°C | 4 min | |

Tabella 9: Impostazioni del termociclatore per la reazione di sequenza.

Le sequenze ottenute sono state osservate grazie al software *Sequencer 4.9*.

3.6 Mutagenesi sito specifica mediante la reazione a catena della Polimerasi (PCR)

La mutagenesi sito-specifica è stata effettuata con il sistema *QuikChange II XL* (*Stratagene*), che permette di ottenere rapidamente mutanti con un'efficienza dell'80% grazie all'alta fedeltà della DNA polimerasi, un basso numero dei cicli termici e la bassa probabilità di ottenere mutazioni casuali. Il metodo prevede l'utilizzo di un vettore di DNA a doppio filamento, due oligonucleotidi sintetici complementari contenenti la mutazione desiderata e una polimerasi termostabile, la *PfuUltra High Fidelity DNA*

polimerasi, che replica entrambi i filamenti plasmidici senza rimuovere i primer mutati. La *DpnI* è un'endonucleasi specifica per DNA metilati ed emi-metilati, usata per digerire il DNA parentale e selezionare quello contenente la mutazione (Fig.3.6).

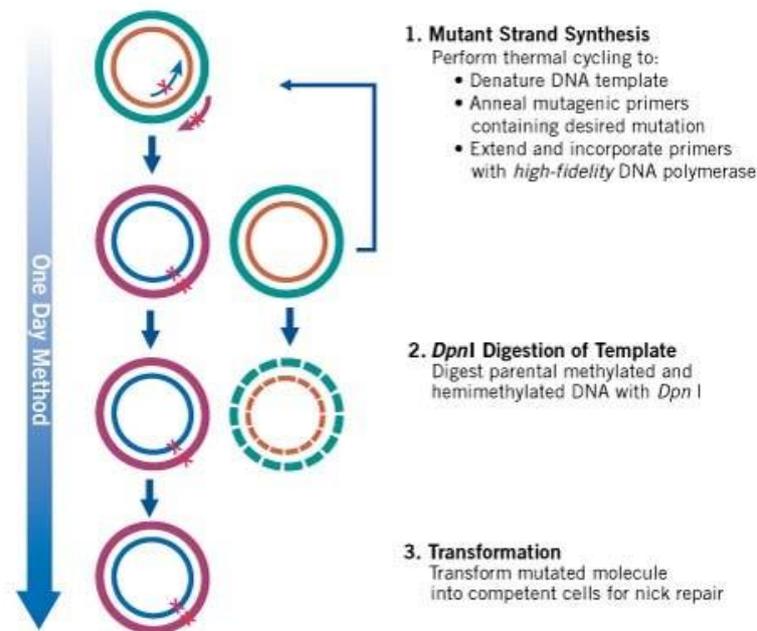


Fig.3.6: Metodo QuickChange II XL per mutazioni sito-specifiche.

Il plasmide mutato viene sintetizzato a partire dai primer mutagenici che devono essere progettati con una temperatura di fusione (T_m) maggiore o uguale a 78°C ed una lunghezza compresa tra 25 e 45 basi. La mutazione desiderata deve trovarsi al centro del primer mutagenico e la regione del “mismatch” deve avere sia a monte che a valle 10-15 basi correttamente appaiate con lo stampo.

In questo studio, la mutagenesi è stata una tecnica utile a revertire la mutazione c.467G>C del gene *TP53* in wild-type introducendo al posto di una citosina una guanina.

Sono stati disegnati i seguenti oligonucleotidi mutagenici:

| Primer | Sequenza FASTA |
|-------------------|-----------------------------|
| MP53-C17G-Forward | 5'-CCCGGCACCCGCGTCCGCGCC-3' |
| MP53-C17G-Reverse | 5'-GGCGCGACGCGGGTGCCGGG-3' |

Tabella 10: Sequenza per esteso dei primer utilizzati per la mutagenesi sito-specifica mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR).

La base evidenziata è la base sostituita per ripristinare il gene WT. È stata allestita la seguente reazione di PCR in un volume finale di 50 μ l:

| Reagenti | Volume |
|-----------------------------|---------------|
| 10X buffer di reazione | 5 μ L |
| dNTPs mix | 1 μ L |
| DNA (10ng) | 2 μ L |
| Primer FW (125ng) | 1.25 μ L |
| Primer RV (125ng) | 1.25 μ L |
| QuickSolution | 3 μ L |
| PfuUltra HF DNA polimerasi | 1 μ L |
| H ₂ O distillata | 35.5 μ L |

Tabella 11: Condizioni relative alla miscela di reazione di PCR.

Il campione così preparato e miscelato in una eppendorf da 0.5 ml viene sottoposto ai seguenti cicli di amplificazione:

| Temperatura | Tempo | Cicli |
|--------------------|--------------|--------------|
| 95°C | 1 min | 1 |
| 95°C | 50 sec | 18 |
| 60°C | 50 sec | |
| 68°C | 8 min | |
| 68°C | 7min | 1 |

Tabella 12: Impostazioni del termociclatore per la reazione di PCR.

Si aggiunge 1 μ l di enzima di restrizione DpnI (10 U/ μ l) e la miscela di reazione viene incubata a 37°C per 1 ora per la digestione dei filamenti parentali. Infine, si effettua una trasformazione con cellule super-competenti XL10-Gold usando 4.5 μ l dell'amplificato della PCR.

Dei cloni selezionati è stata eseguita una mini-preparazione del DNA plasmidico, la quale è servita per avere una conferma preliminare della presenza della mutazione in diverse colonie attraverso il sequenziamento Sanger. Dalla colonia selezionata, risultata positiva per la presenza della mutazione presentando la sostituzione della base, è stata eseguita l'estrazione del DNA plasmidico utilizzando il kit *Genopure Plasmid Midi 7.0*

(Roche), come precedentemente descritto nel paragrafo 3.5. Infine, una volta quantificato il DNA estratto, è stato eseguito un ultimo controllo attraverso il sequenziamento Sanger.

3.7 Trasfezione

La trasfezione consiste nel trasferimento di DNA esogeno in cellule al fine di analizzare il funzionamento del gene d'interesse. Le cellule del carcinoma del colon-retto HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{-/-}}, sono state trasfettate con il plasmide pMSCVpuro contenente l'inserto *TP53/c.467G>C*.

I cloni sono stati seminati in piastre da sei pozzetti aventi un'area di 9,4 cm² e raggiunta la confluenza del 70-90% è stata allestita la reazione di trasfezione. In un tubo da 1,5 ml è stata preparata la miscela che prevedeva per singolo campione: 1 µg di plasmide, 200 µl di terreno OPTIMEM senza siero, il quale potrebbe inibire la formazione di vescicole che permettono l'ingresso del plasmide in cellula, e l'aggiunta dell'agente trasfettante in un rapporto 3:1 rispetto al plasmide, fornita dal kit *X-tremeGENETM HP DNA Transfection Reagent*. La miscela è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente è stata trasferita in ogni singolo pozzetto. Le cellule sono state incubate per 48, 72 e 96 ore prima di misurare l'espressione della proteina d'interesse. La durata di incubazione può dipendere da diversi fattori quali la densità delle cellule, il tipo di vettore, e l'efficienza di trasfezione.

3.8 Trasduzione

La trasduzione virale consiste nel trasporto di materiale genetico all'interno di una cellula attraverso l'utilizzo di particelle virali. Nel nostro esperimento lo scopo ultimo è stato trasdurre il gene *TP53/c.467G>C* nella linea cellulare HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{-/-}}. Il modello è stato creato mediante *Retro-XTM Tet-On® 3G Inducible Expression System* seguendo il protocollo fornito dal produttore e qui descritto. La produzione dei retrovirus utilizzati nel processo di trasduzione è consentita grazie all'utilizzo di linee cellulari capaci di produrre le particelle virali ricombinanti (linee di packaging) (Fig.3.8).

Queste cellule formano quella che viene definita una “*Virion-Like Particle*”, un capsido virale privo del genoma, in grado di riconoscere il suo recettore e di legarlo, ma non di compiere un ciclo produttivo d’infezione. Successivamente le cellule packaging vengono infettate con un retrovirus contenente le sequenze LTR, la sequenza di *packaging* (ψ) ed il gene d’interesse senza *gag*, *pol* ed *env*. Questi geni virali codificano rispettivamente per le proteine strutturali del core, del capsido e per gli enzimi virali. Il risultato sarà la formazione di un vettore virale ricombinante.

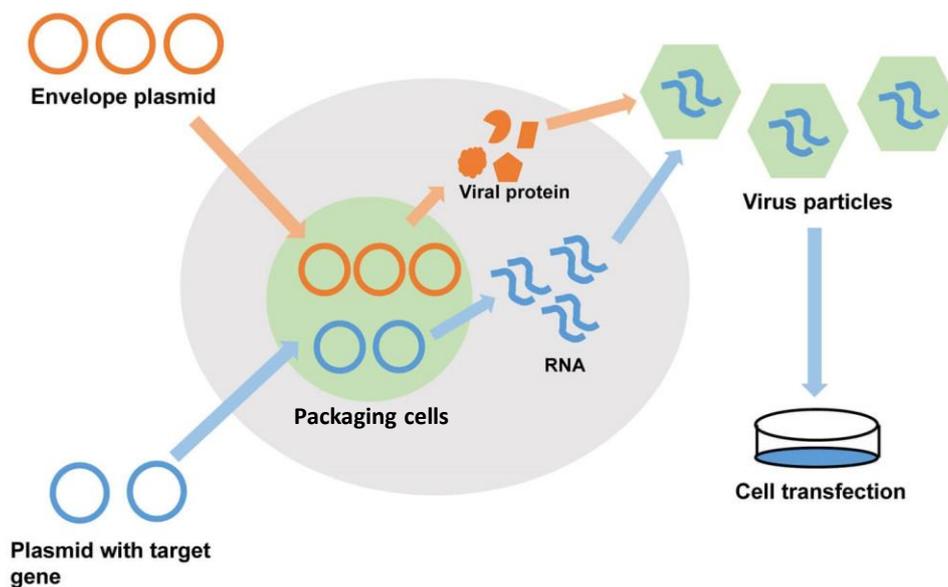


Fig.3.7: Rappresentazione schematica del processo di ricombinazione in trans che avviene nelle cellule packaging.

I vettori utilizzati sono stati i seguenti:

- pMSCVpuro_*TP53/c.467G>C*, che esprime il gene *TP53* mutato
- pMSCVpuro, cioè il plasmide vuoto o *mock*
- pAmpho, che contiene il gene *env* e consente l’infezione selettiva delle cellule eucariote di mammifero

Le GP2-293, derivanti dalle HEK-293, sono una linea cellulare di packaging “ausiliare”. Sono state utilizzate nel nostro esperimento per la produzione di proteine necessarie alla formazione delle particelle retrovirali. Nei cromosomi di tali cellule sono

inserite due porzioni del genoma retrovirale: i geni *gag* e *pol*; in seguito, i virioni ricombinanti sono stati prodotti trasfettando contemporaneamente le cellule GP2-293 con i vettori contenenti i transgeni *env* e *TP53/c.467G>C*. Gli mRNA codificati dai geni *gag*, *pol* ed *env* sono privi delle long terminal repeats (LTR), minimizzando la probabilità di ricombinazione inter-genica; inoltre, sono privi della sequenza di impacchettamento (ψ) in modo da impedire il loro inserimento all'interno delle particelle virali. In tal modo i virioni saranno privi della capacità di replicarsi autonomamente.

Sono state seminate 1.5×10^6 cellule GP2-293 in T75. Dopo aver raggiunto una confluenza del 60-70%, sono state effettuate le trasfezioni transienti. I costrutti trasfettati sono stati:

- pMSCVpuro_*TP53/c.467G>C* + pAmpho
- pMSCVpuro + pAmpho

Successivamente sono state preparate rispettivamente due miscele di reazione, riportate nella seguente tabella:

| Tubo 1 (DNA plasmidico) | Tubo 2 (DNA plasmidico) |
|---|---|
| 750 μ L Xfect Reaction Buffer | 750 μ L Xfect Reaction Buffer |
| 37.5 μ L pAmpho (0.5 μ g/ μ L) | 37.5 μ L pAmpho (0.5 μ g/ μ L) |
| 37.5 μ L pMSCVpuro_ <i>TP53/c.467G>C</i> | 37.5 μ L pMSCVpuro DNA (0.5 μ g/ μ L) |
| 825 μ L Volume totale | 825 μ L Volume totale |

Ad ognuna delle due soluzioni è stata aggiunta la seguente miscela:

| Tubo 3 e 4 (Polymer) |
|-----------------------------------|
| 750 μ L Xfect Reaction Buffer |
| 11.25 μ L Xfect Polymer |
| 825 μ L Volume totale |

Tabella 13: Condizioni relative alle miscele di reazione preparate per la trasduzione virale.

Dopo aver preparato le due miscele per ogni costrutto e aver agitato con vortex per pochi secondi, queste sono state unite in un'unica falcon da 15 ml. I complessi Dna-agente trasfettante sono stati dispensati goccia a goccia sopra la coltura cellulare, in un volume finale di terreno di circa 11 ml. Dopo 48h dalla co-trasfezione è stato raccolto il

surnatante contenente i virioni. I residui cellulari sono stati eliminati mediante centrifugazione a 500 g per 10 minuti a 4°C e il surnatante conservato a -80°C. I campioni retrovirali ottenuti sono stati utilizzati per infettare le cellule HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{-/-}}. A questo scopo, sono state seminate 500.000 cellule in piastre da sei pozzetti. Una volta raggiunta la confluenza del 60-70% sono state infettate con surnatante retrovirale prodotto dalle linee cellulari packaging. Uno dei sei pozzetti contenenti le cellule non ha subito l'infezione, in modo da rappresentare il controllo non trasdotto (NT) dell'esperimento.

Con lo scopo di ridurre la repulsione di carica tra il virus e la membrana cellulare, all'interno del terreno di coltura è stato aggiunto un policatione specifico, il polybrene, alla concentrazione di 4 µg/ml. Per aumentare ulteriormente l'efficienza di infezione virale, è stata effettuata una centrifuga a 32°C per 90 minuti. Infine, le piastre sono state incubate a 32°C per altre 6 ore.

Per selezionare le cellule in cui il DNA prodotto dal retrovirus si è integrato stabilmente nel genoma cellulare, queste sono state cresciute aggiungendo al terreno di coltura 0.5 µg/ml di puomicina per 72 ore. Questi parametri di selezione, determinati in precedenza sulla linea cellulare d'interesse, permettono di selezionare i cloni che esprimono la resistenza all'antibiotico e quindi il transgene.

Terminata la fase di selezione, le cellule contenute nelle piastre di controllo, non resistenti all'azione della puomicina, hanno mostrato una morte cellulare pari al 100%, mentre, nelle altre piastre, solo le cellule che avevano integrato il vettore ricombinante pMSCV nel proprio genoma sono sopravvissute. Il terreno di coltura è stato supplementato con una concentrazione, non più di selezione ma di mantenimento in puomicina, pari a 0.25 µg/ml.

Successivamente è stata effettuata la selezione clonale delle cellule HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{-/-}} trasdotte con il costrutto pMSCVpuro_*TP53/c.467G>C* esprimente il transgene, che con il vettore retrovirale vuoto pMSCVpuro. Sono stati ottenuti cinque cloni pMSCVpuro_*TP53/c.467G>C*, uniti in proporzione 1:1, e cinque cloni con il costrutto retrovirale vuoto, quindi mock, uniti con la medesima proporzione.

3.9 Estrazione RNA

L'RNA è stato estratto in ambiente RNasi-free, mediante kit *RNasy Mini Kit* (QIAGEN), in modo da lisare le componenti cellulari e da mantenere contemporaneamente l'integrità dell'RNA. La concentrazione di quest'ultimo è stata determinata attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro *NanoDrop2000* (Thermo Scientific).

3.10 Retrotrascrizione

Dagli RNA estratti sono state preparate diluizioni 50ng/μl e per ciascun campione sono stati retrotrascritti 500 ng di RNA attraverso Reverse Transcriptase-PCR utilizzando il kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher Scientific). Il protocollo ha previsto la preparazione della seguente mix in un volume finale di 20 μl:

- RT Buffer 10X;
- dNTP Mix (100mM) 25X;
- RT Random Primers 10X;
- Multiscribe™ Reverse Transcriptase 20X;
- RNA (300 ng).

La reazione è stata condotta nel termociclatore *Applied Biosystem 2700 PCR System* con il seguente programma:

| Temperatura | Tempo |
|-------------|---------|
| 25°C | 10 min |
| 37°C | 120 min |
| 85°C | 5 min |

Tabella 14: Impostazioni del termociclatore per la RT-PCR.

In questo modo l'intero trascrittoma è stato convertito in cDNA, impiegato nelle successive analisi di Real-Time Quantitative PCR (qRT-PCR), al fine di valutare il grado di espressione dei geni d'interesse nelle linee cellulari prese in esame.

3.11 qRT-PCR

I cDNA ottenuti sono stati sottoposti a qRT-PCR, una tecnica che consente di quantificare in tempo reale durante l'amplificazione uno specifico target oggetto di studio. La quantificazione è resa possibile dal SYBR Green, un fluoroforo capace di intercalare il DNA a doppio filamento creando così un complesso che assorbe luce ad una lunghezza d'onda massimale λ_{max} di 488 nm ed emette luce verde ad una λ_{max} di 522 nm. La master mix utilizzata, GoTaq® qPCR Master Mix (Applied Biosystems®), fornita dal kit comprende: SYBR Green I Dye, GoTaq Hot Start Polymerase, dNTPs con dUTP, il buffer e MgCl₂. In una piastra da 96 pozzetti sono stati aliquotati 10 μ l per campione di una miscela di reazione così composta:

- GoTaq qPCR Master Mix 2X;
- Primer forward;
- Primer reverse;
- 2 μ l del cDNA ottenuto in seguito alla retrotrascrizione di 500 ng di RNA e diluito 1:10;
- H₂O RNase Free per portare a volume.

Nella Tabella 15 sono riportati i primers utilizzati in SYBR:

| Primer | Sequenza FASTA |
|------------------|----------------------------|
| TUB γ FW | 5'TGCTGTGTCACCTCCATTGCT3' |
| TUB γ REV | 5'GTAAGGCTGGACCACCACAT3' |
| ATF4 FW | 5'GGCCAAGCACTTCAAACCTC3' |
| ATF4 REV | 5'AAGGCATCCTCCTTGCTGTTG3' |
| ASNS FW | 5'CTGCACGCCCTCTATGACA3' |
| ASNS REV | 5'TAAAAGGCAGCCAATCCTTCT3' |
| GLS2 FW | 5'CAACATTGTGCTCCTGACCC3' |
| GLS2 REV | 5'AGCTGAGGGATGTAGGCTG |
| XBP1 FW | 5'GGAGTTAAGACAGCGCTTGG3' |
| XBP1s REV | 5'GCACCTGCTGCGGACTCAG3' |
| XBP1u REV | 5'CTGCAGAGGTGCACGTAGTC3' |
| DDIT3 FW | 5'CATGTTAAAGATGAGCGGGTGG3' |
| DDIT3 REV | 5'ACTTCCTTCTGAACACTCTCTC3' |

Tabella 15: Sequenza per esteso delle coppie di primer utilizzate per l'analisi qRT-PCR mediante chimica SYBR.

Per la quantificazione di altri trascritti è stato utilizzato il protocollo generale secondo le istruzioni fornite dalla GoTaq® Probe qPCR Master Mix della Promega. In una piastra da 96 pozzetti sono stati aliquotati 10 μ l per campione di una miscela di reazione così composta:

- GoTaq qPCR Master Mix 2X (con CXR);
- Probe;
- 2 μ l del cDNA ottenuto in seguito alla retrotrascrizione di 500 ng di RNA e diluito 1:10;
- H₂O RNase Free per portare a volume.

Nella Tabella 16 sono riportate le sonde TAQMAN utilizzate:

| Gene | Primer FASTA |
|---------------|--|
| SCO2 | Sonda: 5'-/56-FAM/CCTCCCCTACTGACACTTCTCAACCA/36-TAMSp/-3' Primer1: 5'-GGTGAGGGAATGGAAAGGAAG-3' Primer2: 5'-TTGTTTCCCCAAGGACAGG-3' |
| P53 | Sonda: 5'-/56-FAM/AGACTGCCT/ZEN/TCCGGGTCACTG/3IABkFQ/-3' Primer1: 5'-GACACGCTTCCCTGGATTG-3' Primer2: 5'-GACGCTAGGATCTGACTGC-3' |
| SLC1A3 | Sonda: 5'-/56-FAM/CGCCGCCAT/ZEN/TCCTGTGACAAG/3IABkFQ/-3' Primer1: 5'-GAGGATGTTACAGATGCTGGTC-3' Primer2: 5'-TAATAGACTACAGCTCGCATTCC-3' |
| ACTB | Sonda: 5'/5Cy5/ TCATCCATGGTGAGCTGGCGG/3IAbRQSp/-3' Primer1: 5'-ACAGAGCCTCGCCTTTG-3' Primer2: 5'-CCTTGCACATGCCGGAG-3' |

Tabella 16: Sequenza per esteso delle coppie di primer e delle specifiche sonde utilizzate per l'analisi qRT-PCR mediante saggio TAQMAN.

In ogni saggio di qRT-PCR è stata effettuata la quantificazione del cDNA relativo al gene housekeeping TUB γ per la successiva normalizzazione dei dati. Per l'amplificazione e quantificazione dei campioni è stata utilizzata la macchina Applied Biosystems® 7900HT Fast Real-Time PCR System utilizzando le seguenti condizioni:

| Temperatura | Tempo | Cicli |
|--------------------|--------------|--------------|
| 95°C | 10 min | 1 |
| 95°C | 15 sec | 40 |
| 60°C | 45 sec | |

Tabella 17: Impostazioni del termociclatore Applied Biosystems® 7900HT Fast Real-Time PCR System per la qRT-PCR.

Allo scopo di ridurre l'errore tecnico, ogni campione è stato testato in duplicato in modo da poter calcolare la media dei due relativi Ct. È stato poi calcolato il ΔCt sottraendo la media dei Ct relativi al gene housekeeping alla media dei Ct relativi ai campioni. I valori così ottenuti sono stati utilizzati nella fase successiva di elaborazione

dati in cui, attraverso il calcolo del fold change, è stata valutata la diversa espressione dei geni d'interesse tra gruppi di campioni mediante la seguente equazione:

$$\text{Fold change} = \frac{2^{\Delta\text{Ct (target)}}}{2^{\Delta\text{Ct (reference)}}} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Ogni saggio di qRT-PCR è stato ripetuto un minimo di tre volte e, sui dati raccolti, è stata effettuata un'analisi statistica mediante il Test-F per il confronto tra due varianze. È stato quindi calcolato, attraverso il T-Test di Student, il valore "p" indicante la significatività del risultato ottenuto, rappresentata graficamente mediante uno o più asterischi (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

3.12 Estrazione DNA

L'estrazione di DNA da cellule è stata eseguita mediante l'uso del kit *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep* (#G1N350, Sigma-Aldrich). I pellet sono stati risospesi in 200 μl di *Resuspension Solution*, 20 μl di proteinasi K e 200 μl di *Lysis Solution* e incubati a 70°C per 10 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 200 μl di EtOH 100% ai lisati e l'intero volume è stato caricato in una colonnina con filtro in silice precedentemente trattata con 500 μl di *Column Preparation* per massimizzare la resa del *binding* del DNA alla membrana. In seguito, sono stati effettuati due lavaggi con 500 μl di *Wash Solution* ed infine il DNA è stato eluito con 200 μl di H₂O deionizzata centrifugando a 6500 g per 1 minuto.

La concentrazione del DNA estratto è stata quantificata utilizzando lo spettrofotometro *NanoDrop2000* (Thermo Scientific), misurando l'assorbanza a 260 nm. Il Nano Drop inoltre fornisce due valori indicanti la purezza del campione, il rapporto 260/280 (indicante contaminazioni dovute alla presenza di proteine) ed il rapporto 260/230 (indicante la contaminazione da solventi e composti organici). Tutti i campioni misurati rientravano nei parametri stabiliti indicanti campioni non contaminati, presentando valori intorno ad 1,8 per il rapporto 260/280 e intorno al 2 per il rapporto 260/230.

3.13 Sequenziamento SANGER

I prodotti di PCR da sequenziare sono stati purificati grazie a piastre *millipore* (Merck™ #MSNU03010) e risospesi in un volume di H₂O milliQ variabile (25-50µl) in base all'intensità della banda osservata su gel. È stata quindi allestita una reazione di PCR di sequenza, preparando la seguente mix in un volume finale di 10 µl:

- 2 µl prodotto di PCR purificato;
- Primer *forward* o *reverse* alla concentrazione finale di 0,32µM;
- BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) 20X;
- Buffer 5X;
- H₂O *nuclease-free* per portare a volume.

La reazione è avvenuta nel termociclatore *Applied Biosystem 2700 PCR System* con le seguenti impostazioni:

| Temperatura | Tempo | Cicli |
|-------------|--------|-------|
| 96°C | 1 min | 1 |
| 96°C | 10 sec | 35 |
| 50°C | 5 sec | |
| 60°C | 4 min | |

Tabella 18: Impostazioni del termociclatore per la reazione di sequenza.

I frammenti ottenuti in seguito alla reazione di sequenza sono stati sottoposti a precipitazione, in modo da purificare il DNA dalle componenti della mix di reazione prima della reazione di sequenziamento. Per prima cosa è stata aggiunta alla reazione di sequenza una mix di sodio acetato (C₂H₃NaO₂) ed etanolo 100% e, dopo circa 40 minuti a -20°C, le reazioni di sequenza sono state centrifugate a 1600 g per 40 minuti a 4°C. In seguito, è stato effettuato un lavaggio in etanolo al 70% centrifugando nuovamente i campioni a 1600 g per 20 minuti a 4°C, al fine di rimuovere i residui di C₂H₃NaO₂, ed i pellet sono stati risospesi in 20 µl di *Injection Solution* e caricati nel sequenziatore. Per l'analisi delle sequenze ottenute è stato impiegato il software *Sequencher 4.9*, utilizzando

la sequenza di riferimento del gene *TP53* WT, reperita su Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) (ENST00000617185.4).

3.14 Estrazione delle proteine e WES

Per l'estrazione delle proteine, le cellule sono state staccate dal substrato a cui sono adese mediante l'azione meccanica di uno scraper. La sospensione cellulare in PBS è stata centrifugata a 1200 rpm per 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato e il pellet cellulare risospeso in 50 µL della soluzione di lisi RIPA (Tris HCl 50 mM a pH 7.4, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, Triton-X 100 1%, EDTA 1mM) a cui sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi per ridurre la degradazione delle proteine durante la procedura di estrazione. I campioni sono stati trasferiti a -80°C (circa per 15 minuti) per favorire il processo di rottura delle membrane cellulari grazie alla formazione dei cristalli di ghiaccio, poi scongelati a temperatura ambiente dopo i 15 minuti. Per indurre un'efficiente lisi delle membrane, i campioni sono stati sottoposti a due cicli di congelamento e scongelamento.

Successivamente, i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 13000 rpm a 4°C per rimuovere i detriti cellulari. È stato quindi recuperato il surnatante, contenente le proteine, e trasferito in nuove eppendorf da 1,5 mL. I lisati proteici sono stati conservati a -80°C.

Le proteine sono state quantificate tramite il metodo colorimetrico *Lowry*, utilizzando il kit *Lowry High Standard Curve (Biorad)* che ha previsto la misurazione dell'assorbanza a 260 nm mediante spettrofotometro e il calcolo della concentrazione proteica per regressione lineare.

Tutti i campioni sono stati denaturati in presenza di una Master Mix Fluorescente fornita dal kit per 5 minuti a 95°C. I lisati totali sono stati diluiti utilizzando il buffer 0.1X (Protein simple 042-195) ad una concentrazione di 0.5ug/uL e sono stati analizzati su un capillare automatizzato chiamato *Protein Simple Wes* sfruttando il modulo di separazione di 12-230 kDa. Per la rilevazione delle proteine di interesse sono stati utilizzati i moduli Anti-Mouse (DM-001, ProteinSimple) e Anti-Rabbit (DM-001, ProteinSimple). È stato utilizzato anche un anticorpo secondario anti-capra marcato con HRP (1:100) (040-656,

ProteinSimple) per diminuire la chemiluminescenza della Vinculina. Le proteine sono state identificate usando i seguenti anticorpi primari:

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati diluiti in soluzione di *blocking* come segue:

- anti-p53 (*Santa Cruz* #A3017) 1:50 mouse.
- anti-AMPK α (*Cell Signaling* #2532) 1:50 rabbit.
- anti-phosphoAMPK α (*Cell Signaling* #2535) 1:50 rabbit.
- anti-ATF4 (*Cell Signaling* #11815) 1:50 rabbit.
- anti-Vinculina (*Cell Signaling* #E1E9V) 1:20000 rabbit;
- anti- β -Actina (*Sigma* #128K4805) 1:1000 mouse.

I risultati (area sotto la curva, AUC) sono stati analizzati utilizzando Compass per SW software v4.0.0.

3.15 SDS page e Western Blot

In base alla proteina d'interesse, sono stati caricati su gel di poliacrilammide 40-80 μ g di lisati proteici totali diluiti in LaemmLi Sample Buffer (63mM TrisHCl, pH 6.8, 10% glicerolo, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanolo, 0.0025% blu di bromofenolo) e denaturati per 5 minuti a 99°C. Sono stati usati gel con percentuale di poliacrilammide variabile da 8% a 12%, in base al peso molecolare della proteina da saggiare. La corsa elettroforetica è stata effettuata in Running Buffer 1X (la soluzione 10X contiene: 30,3g di Trizma-Base, 144 g di glicina, SDS 1%) con un voltaggio costante di 150 V per un'ora.

Terminata la corsa, le proteine sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa mediante il Trans-Blot Turbo TM Transfer System (BIORAD). La membrana di nitrocellulosa è stata colorata con Rosso Ponceau (Sigma-Aldrich) che, legandosi in maniera reversibile alle proteine presenti, ne ha permesso la rilevazione, fornendo così un primo controllo del caricamento. Per la rilevazione delle proteine è stato utilizzato il WesternBreeze® Chemiluminescent Western blot Immunodetection kit (Invitrogen),

contenente soluzione di blocking, anticorpi secondari, buffer di lavaggio, e substrato per la rilevazione del segnale, secondo il protocollo fornito dal produttore.

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati diluiti in soluzione di blocking come segue:

- anti-p53 (*Santa Cruz* #A3017) 1:1000 mouse.
- anti-LC3 (*Novus Biological* #NB100-2220) 1:2000 rabbit.
- anti-ATF4 (*Cell Signaling* #11815) 1:500 rabbit.
- anti-PERK (*Cell Signaling* #3192S) 1:1000 rabbit.
- anti-Caspase3 (*Cell Signaling* #9662) 1:1000 rabbit.
- anti-PARP (*Cell Signaling* #9542) 1:1000 rabbit.
- anti-Vinculina (*Sigma-Aldrich* #V9131) 1:10000 mouse.
- anti- β -Actina (*Sigma-Aldrich* #128K4805) 1:10000 mouse.
- anti-Calreticulin (*Sigma-Aldrich* #C4606) 1:2000 rabbit.
- anti-puromocina (Millipore #12D10) 1:20000 mouse

La rilevazione del segnale è stata, infine, eseguita con il ChemiDoc™ MP System (Biorad).

3.16 Analisi densitometrica Western Blot

L'analisi densitometrica è stata effettuata tramite ImageJ, un software di elaborazione digitale delle immagini sviluppato dal National Institutes of Health (USA). ImageJ permette di assegnare un valore numerico ad ogni banda, proporzionale all'intensità del segnale. La normalizzazione dei dati viene eseguita a priori, caricando la stessa quantità di proteine per ogni pozzetto, ma anche a posteriori, tramite il rapporto del valore 20 numerico assegnato a ciascuna banda e quello assegnato alla proteina housekeeping nel rispettivo campione. La variazione di espressione tra diverse condizioni sperimentali viene quindi espressa come fold change, ovvero come rapporto tra il valore dell'esperimento e quello del controllo.

3.17 Saggio radioattivo con aspartato radio marcato

L'assorbimento dell'acido aspartico è stato valutato incubando le cellule con una soluzione tampone di assorbimento (140 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES/Na, 2.5 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L CaCl₂, e 5 mmol/L KCl, pH 7.4) contenente [U-14C] metaboliti radioattivi per 15 minuti. Le cellule sono state successivamente lavate con PBS freddo e lisate con 0.1 mol/L NaOH. Il pellet è stato risospeso in H₂O deionizzata e trasferito in una fiala per scintillazione e contato sul contatore a scintillazione. Tutti i segnali radioattivi sono stati normalizzati sul contenuto proteico.

3.18 Misurazione dei livelli di aspartato intracellulari

Le cellule di interesse per la misurazione dei livelli di aspartato intracellulari sono state seminate in piastre da 96 well. Dopo 24h dalla semina, le cellule sono state incubate con terreno supplementato di aspartato 5mM per 30 minuti. Prima della raccolta delle cellule è stato effettuato un lavaggio, a freddo, in soluzione salina di NaCl 0,9%. Successivamente, le cellule sono state staccate in NaCl 0,9%. Parte della sospensione cellulare è stata utilizzata per la conta cellulare. La sospensione cellulare è stata congelata in azoto liquido e conservata a -80°C. I campioni sono stati inviati ed analizzati ad Heidelberg presso il *Metabolomics Core Technology Platform Centre for Organismal Studies*. La misurazione di aspartato intracellulare è stata normalizzata sul contenuto proteico.

3.19 Analisi statistiche

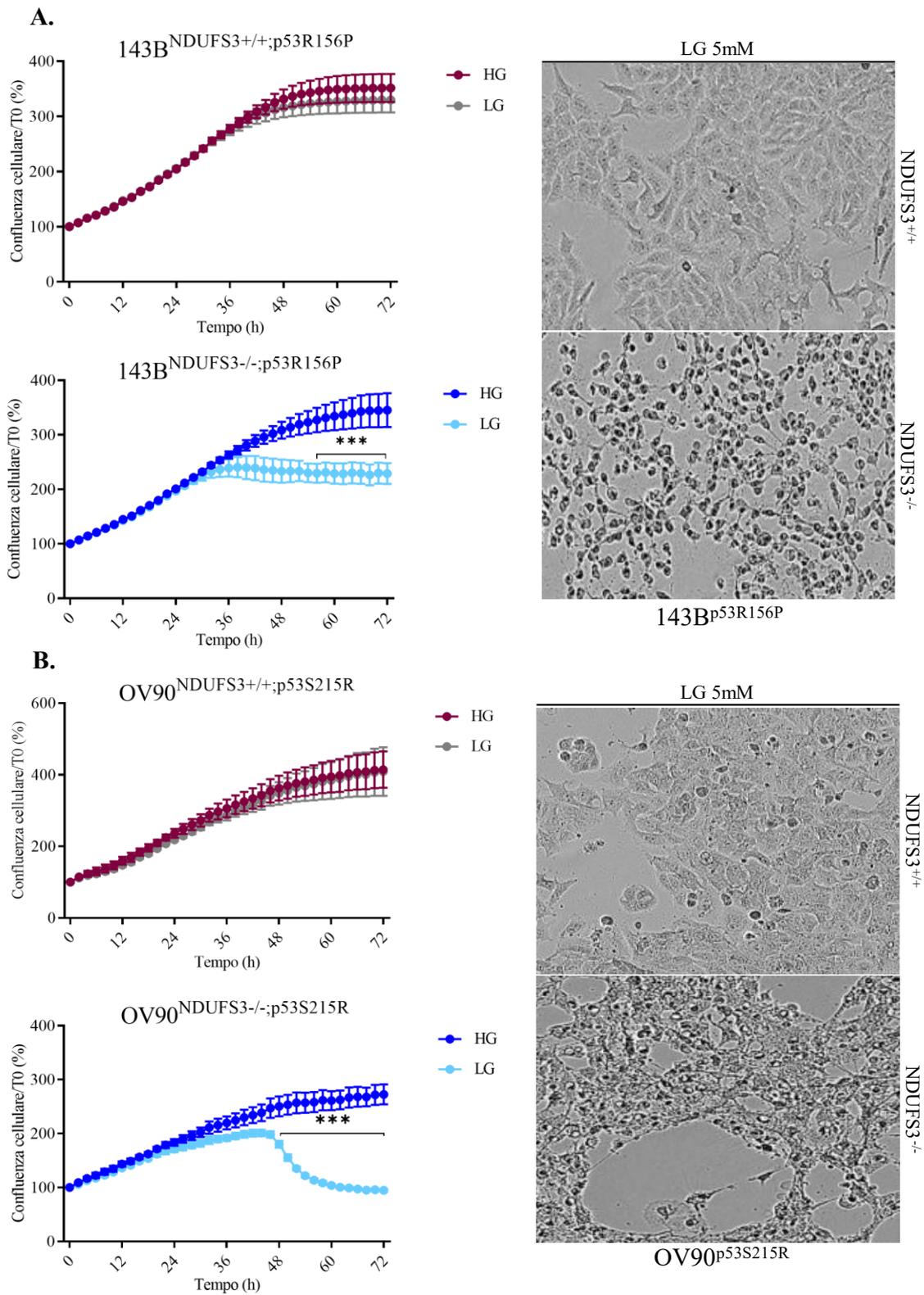
GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) è stato utilizzato per eseguire test statistici e creare grafici e diagrammi a barre. Se non diversamente specificato, per confrontare le medie è stato eseguito un test t di Student a due code, ipotizzando una varianza uguale. Quando il test F, per confrontare le varianze tra i due gruppi, era significativo, i dati sono stati trasformati ($y' = \log y$) prima del calcolo del t-test. Nei pochi casi in cui la trasformazione log non ha corretto le varianze, è stato

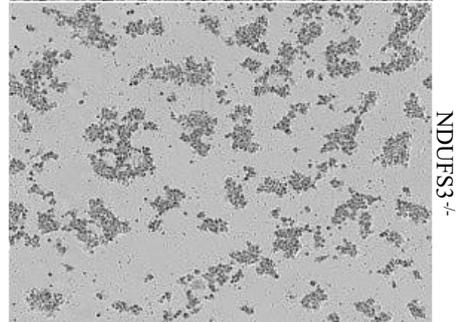
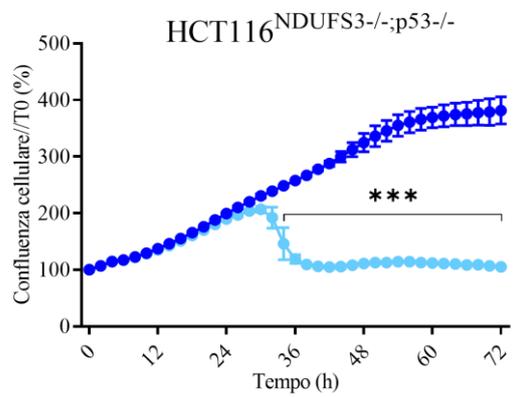
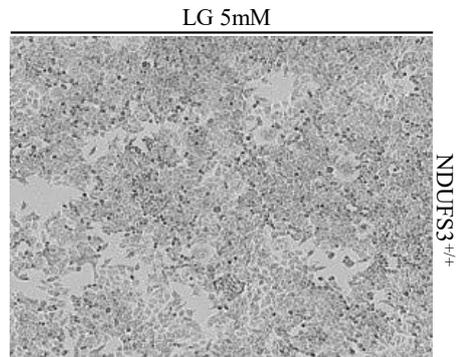
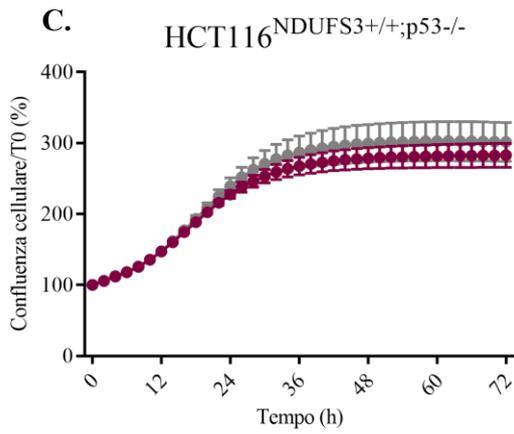
applicato un t-test per varianze disuguali. Per ogni esperimento, sono stati analizzati almeno tre replicati biologici. Per ogni esperimento i p-value (*p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001) sono indicati nelle leggende delle figure.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

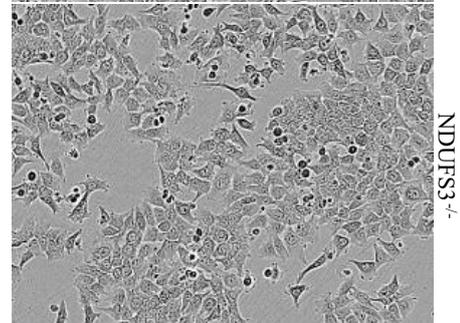
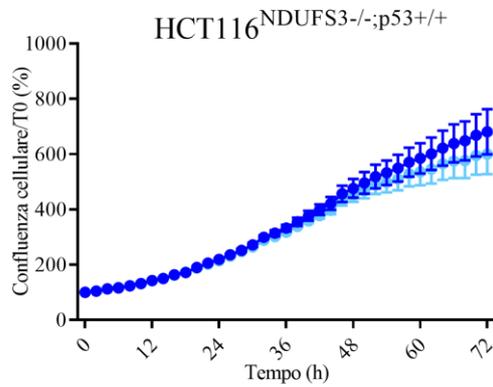
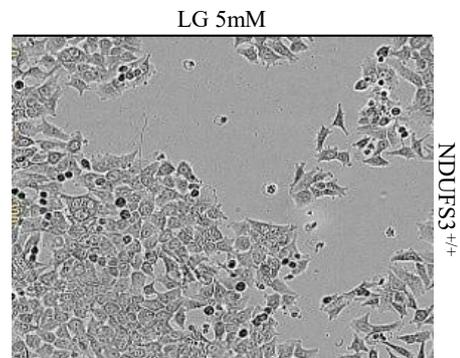
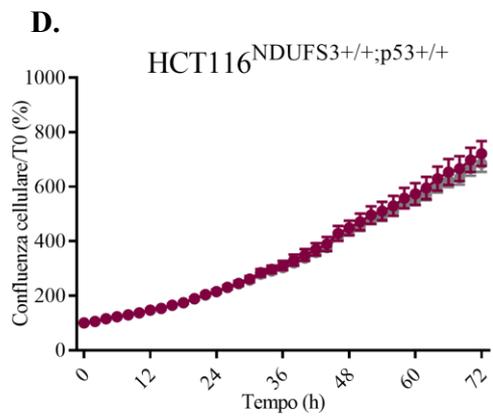
4.1 La carenza di glucosio inibisce la proliferazione in condizioni di deficit del CI mitocondriale

La glicolisi aerobia, nota come effetto Warburg, è tra le vie metaboliche adottate da gran parte dei tumori solidi per adattarsi all'eterogeneo microambiente tumorale, rimarcando l'estrema suscettibilità delle cellule tumorali alla disponibilità di glucosio (Heiden, Cantley, and Thompson 2009). Nei tumori, tale sensibilità è fortemente accentuata in presenza di un deficit del Complesso I mitocondriale ove il metabolismo glicolitico è tra le vie alternative attuate per compensare il difetto nella respirazione mitocondriale (Iommarini et al. 2013). Al fine di caratterizzare tale dipendenza dal glucosio, in questo studio abbiamo preliminarmente investigato l'effetto dello stress metabolico indotto dalla restrizione di glucosio in un pannello di linee cellulari tumorali. Il nostro gruppo di ricerca ha generato e caratterizzato le linee 143B (osteosarcoma) ed HCT116 (carcinoma colon-rettale) con un deficit indotto sul CI tramite il knock-out della subunità d'assemblaggio essenziale *NDUFS3*, chiamate 143B^{NDUFS3^{-/-}} ed HCT116^{NDUFS3^{-/-}}, rispettivamente (Kurelac et al. 2019). Dalla linea HCT116^{NDUFS3^{-/-}} con stato p53 nullo abbiamo generato la controparte p53 wild-type, rinominata (HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}}). È stata inoltre generata la linea tumorale ovarica OV90 in cui è stato indotto il medesimo deficit genetico sulla subunità *NDUFS3* (OV90^{NDUFS3^{-/-}}). Infine, per tutte e quattro le linee cellulari sopra descritte, sono stati ottenuti i cloni revertanti *NDUFS3^{+/+}*, che rappresentano la linea di controllo CI-competente. Nelle otto linee cellulari illustrate è stata saggiata la vitalità cellulare sia nelle condizioni di coltura standard 25mM di glucosio (indicato come HG nelle figure) che in presenza di una concentrazione di glucosio in coltura prossima alla fisiologica *in vivo*, 5mM di glucosio (indicato come LG nelle figure) fino alle 72h. Come atteso, il basso glucosio non influenza la vitalità delle linee tumorali CI-competenti, grazie ad una funzionale respirazione mitocondriale (Fig.4.1A-B-C).





HCT116^{p53-/-}



HCT116^{p53+/+}

Fig.4.1: Saggio di proliferazione in IncuCyte S3. **A.** Le linee $143B^{NDUFS3+/+}$ e $143B^{NDUFS3-/-}$ sono coltivate in un terreno di coltura alla concentrazione di glucosio 25mM (indicato come, HG) e 5mM (indicato come, LG), rispettivamente, per 72h, (n=4). Le immagini sono state acquisite alle 48h. **B.** Le linee $OV90^{NDUFS3+/+}$ e $OV90^{NDUFS3-/-}$ sono coltivate in un terreno di coltura alla concentrazione di glucosio 25mM e 5mM per 72h, (n=3). Le immagini sono state acquisite alle 48h. **C.** Le linee $HCT116^{NDUFS3+/+;p53-/-}$ e $HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-}$ sono coltivate in un terreno di coltura alla concentrazione di glucosio 25mM e 5mM per 72h, (n=2). Le immagini sono state acquisite alle 36h. **D.** Le linee $HCT116^{NDUFS3+/+;p53+/+}$ e $HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+}$ sono coltivate in un terreno di coltura alla concentrazione di glucosio 25mM e 5mM per 72h, (n=2). Le immagini sono state acquisite alle 72h. Per tutte le otto linee cellulari, la normalizzazione è stata eseguita sul T0 (indicato come 100%). I dati sono rappresentati come media \pm SD. ANOVA test bidirezionale è stato usato per l'analisi statistica (***) $p < 0,001$.

Al contrario, le tre linee con deficit del CI mostrano una significativa riduzione della vitalità cellulare in basso glucosio a tempi prolungati, ma variabili tra le tre linee, evidenziando un'eterogenea sensibilità alla carenza di glucosio anche all'interno dei modelli con deficit del CI (Fig.4.1A-B-C). La linea $HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+}$, invece, non sembra risentire dell'effetto del basso glucosio in termini di proliferazione cellulare, con un andamento paragonabile alla controparte CI-competente (Fig.4.1D). Inoltre, il deficit energetico e nutrizionale è sempre associato ad un caratteristico fenotipo di stress nei modelli in esame (Fig.4.1A-B-C), eccetto nella linea $HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+}$, che appare resistente (Fig.4.1D).

Tale resistenza suggerirebbe un adattamento al deficit del CI ed un riarrangiamento delle vie metaboliche. Infatti, è noto che, in alcune cellule tumorali, mutazioni che danneggiano la funzionalità dei mitocondri innescano una riprogrammazione metabolica verso la carbossilazione riduttiva della glutammina (Mullen et al. 2012) o l'attivazione della piruvato carbossilasi (Cheng et al. 2011), sostenendo i processi anaplerotici e anabolici necessari per la proliferazione.

Il primo segnale di riprogrammazione metabolica è guidato dall'attivazione di segnali oncogenici (De Berardinis and Chandel 2016). Ad esempio, mutazioni nell'oncosoppressore *TP53*, o amplificazioni nell'oncogene *c-myc* sono correlate ad attività anaboliche o cataboliche, includendo la glicolisi ed il controllo dell'omeostasi redox nel cancro (Kruiswijk, Labuschagne, and Vousden 2015; Stine et al. 2015). L'attivazione oncogenica del proto-oncogene (*c-myc*), che codifica per una fosfoproteina nucleare che controlla il ciclo cellulare e l'apoptosi, è associata ad un incremento del

flusso glicolitico, favorendo l'espressione del trasportatore del glucosio di tipo 1 (*GLUT1*), della fosfo-fruttochinasi (*PFK*) che promuove la terza reazione della glicolisi (Osthus et al. 2000), ovvero la fosforilazione del fruttosio-6-fosfato in fruttosio 1-6 bisfosfato e della lattato deidrogenasi A (*LDHA*), una subunità dell'enzima lattato deidrogenasi che converte il piruvato ed il NADH in lattato e NAD⁺ (Shim et al. 1997). Inoltre, l'attivazione di *c-myc* influenza il metabolismo della glutammina tramite l'espressione della glutamminasi 1 (*GLS1*), che idrolizza la glutammina in glutammato ed ammoniacca, e del trasportatore di amminoacidi neutri (*SLC1A5*) (Gao et al. 2009). Controverso è, invece, il ruolo dei mutanti p53 nella regolazione del metabolismo. Gli hotspot mutazionali più noti e caratterizzati (p.R175H, p.R181H, p.R249S, p.R273H) sembrano indurre il metabolismo glicolitico (Eriksson et al. 2017; Cen Zhang et al. 2013), ma alcune mutazioni identificate sono di significato biologico ancora ignoto. Anche mutazioni nell'enzima appartenente alla classe delle GTPasi (*KRAS*), che converte il nucleotide guanosina trifosfato (GTP) in nucleotide guanosina difosfato (GDP), frequentemente mutato nei tumori, sono associate ad un potenziamento del flusso glicolitico, favorendo l'espressione di *GLUT1*, dell'esochinasi 1 ubiquitaria (*HK1*), che promuove la fosforilazione del glucosio in glucosio-6-fosfato nella prima reazione della glicolisi ed dell'esochinasi 2 del muscolo scheletrico (*HK2*), che promuove la fosforilazione del glucosio in glucosio-6-fosfato nella prima reazione della glicolisi (Ying et al. 2012). Inoltre, anche l'attivazione di *KRAS* influenza il metabolismo della glutammina, riducendo l'espressione della glutammato deidrogenasi 1 (*GLUD1*), che catalizza la conversione del L-glutammato in α -chetoglutarato ed incrementando quella della transaminasi 1 glutammato/ossalacetato citosolica (*GOT1*) (Son et al. 2013) (Fig.4.2).

Dunque, una o più mutazioni ad acquisto di funzione in oncogeni e/o a perdita di funzione in oncosoppressori possono contribuire alla riprogrammazione metabolica nelle linee cellulari in esame. Per esempio, nella linea OV90 si identificano quattro possibili varianti genetiche nella serina/treonina chinasi appartenente alla famiglia RAF (*BRAF*), in *TP53*, nel membro 4 della famiglia delle SMAD (*SMAD4*) e nell'inibitore 2A della chinasi ciclina dipendente (*CDKN2A*) che possono contribuire nel definire il fenotipo tumorale.

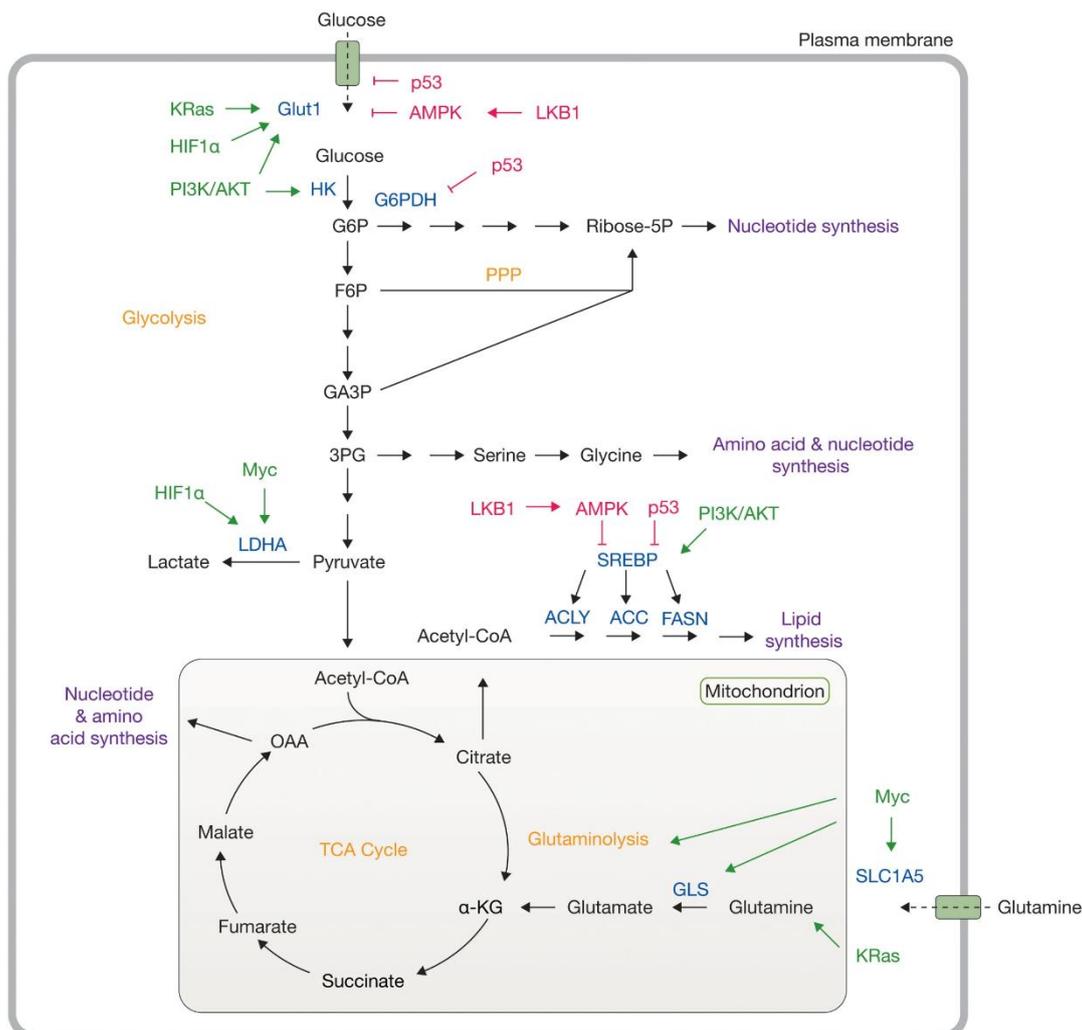


Fig.4.2: Rappresentazione schematica di come la segnalazione oncogenica e la disponibilità di nutrienti influenzano il metabolismo cellulare (Boroughs and Deberardinis 2015).

Nella linea 143B sono presenti solo due varianti genetiche, in *TP53* e *MED12*. Ed infine, nella linee HCT116, sia $p53^{-/-}$ che $p53^{+/+}$, si identificano 63 possibili varianti genetiche, tra cui *KRAS* (Tab.4.1). La valutazione del genotipo delle otto linee cellulari in esame evidenzia che la mutazione nell'oncosoppressore *TP53* è l'unica mutazione condivisa, eccetto nella linea HCT116 $p53^{+/+}$ in cui il gene è wild-type. Pertanto, si può ipotizzare che siano proprio le mutazioni in *TP53*, seppur sia ignoto il loro effetto biologico, responsabili della maggiore suscettibilità al basso glucosio osservata nelle linee OV90 $NDUFS3^{-/-}$, 143B $NDUFS3^{-/-}$ ed HCT116 $NDUFS3^{-/-};p53^{-/-}$. Inoltre, ciò suggerirebbe che la stimolazione del flusso glicolitico è l'effetto biologico indotto dalle mutazioni in *TP53*

in esame, come è riportato per i noti hotspot mutazionali (p.R175H, p.R181H, p.R249S, p.R273H) (Eriksson et al. 2017; Cen Zhang et al. 2013), che potrebbe essere compromesso quando la disponibilità di glucosio è carente. Tale ipotesi sarebbe confermata anche nelle linee HCT116^{NDUFS3-/-} in cui, anche in presenza della medesima mutazione nell'oncogene *KRAS* (c.38G>A), è il diverso stato di p53 che potrebbe influenzare la diversa sensibilità al basso glucosio.

| Linee cellulari | Gene | cDna | Effetto | Proteina | VAF |
|-----------------|----------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------------|---------------|
| OV90 | <i>CDKN2A</i> | c.257C>A | missense | p.A86D | 0.9231 |
| | TP53 | c.643A>C | missense | p.S215R | 1 |
| | <i>SMAD4</i> | c.1333C>T | nonsense | p.R445* | 0.9737 |
| | <i>BRAF</i> | c.1457_1471delATG TGACAGCACCTA | inframe | p.N486_P490delN VTAP | 0.4364 |
| | <i>PREX2</i> | c.1087C>T | missense | p.R363W | 0.5535 |
| | <i>CUX1</i> | c.2638C>T | nonsense | p.Q880* | 0.7083 |
| | <i>FLT4</i> | c.3137C>T | missense | p.S1046L | 0.5652 |
| | <i>FAT2</i> | c.2648G>A | missense | p.R883H | 0.5556 |
| | <i>PIK3CA</i> | c.3140A>G | missense | p.H1047R | 0.4556 |
| | <i>MLH1</i> | c.755C>A | nonsense | p.S252* | 1 |
| | <i>MCM3AP</i> | c.3061G>T | nonsense | p.E1021* | 0.75 |
| HCT116 | <i>PLCG1</i> | c.2657G>A | missense | p.R886H | 0.4648 |
| | <i>ACVR2A</i> | c.1303A>T | nonsense | p.K435* | 0.2857 |
| | <i>ZNF429</i> | c.199C>T | nonsense | p.R67* | 0.5108 |
| | <i>PPP2R1A</i> | c.548G>C | missense | p.R183P | 0.4545 |
| | <i>NIN</i> | c.4734+5G>T | ess_splice | p.? | 0.375 |
| | <i>ERCC5</i> | c.2533+2T>C | ess_splice | p.? | 0.5526 |
| | <i>FOXO1</i> | c.1609C>T | missense | p.R537C | 0.5469 |
| | <i>CHD4</i> | c.3484C>T | missense | p.R1162W | 0.3762 |
| | KRAS | c.38G>A | missense | p.G13D | 0.2632 |
| | <i>ATM</i> | c.3380C>T | missense | p.A1127V | 0.4342 |
| | <i>CDC73</i> | c.370+5G>A | ess_splice | p.? | 0.6984 |
| | <i>BCORL1</i> | c.5036delC | frameshift | p.P1681fs*20 | 1 |
| | <i>BCOR</i> | c.3621_3622insA | frameshift | p.Q1208fs*8 | 1 |
| | <i>WNK2</i> | c.4905_4906insG | frameshift | p.D1638fs*9 | 0.8333 |
| | <i>CDKN2A</i> | c.97delG | frameshift | p.E33fs*15 | 0.5 |
| | <i>CACNA1D</i> | c.2220delC | frameshift | p.P741fs*6 | 0.329 |
| | <i>CTNNB1</i> | c.131_133delCTT | inframe | p.S45delS | 0.4107 |
| | <i>EP300</i> | c.5095delA | frameshift | p.N1700fs*9 | 0.4018 |
| | <i>EP300</i> | c.4402delA | frameshift | p.M1470fs*26 | 0.5052 |
| | <i>DNM2</i> | c.1316_1317insA | frameshift | p.C442fs*41 | 0.5 |
| | <i>RUNX1T1</i> | c.789_790insA | frameshift | p.Q264fs*11 | 0.6203 |
| | <i>KMT2C</i> | c.4030delA | frameshift | p.I1344fs*1 | 0.5294 |
| | <i>KMT2C</i> | c.8390delA | frameshift | p.K2797fs*26 | 1 |
| | <i>QKI</i> | c.394delA | frameshift | p.K134fs*14 | 0.1719 |
| | <i>LATS1</i> | c.1596delT | frameshift | p.P533fs*8 | 0.5294 |
| | <i>FLT4</i> | c.1267delC | frameshift | p.Q423fs*70 | 0.375 |
| | <i>PPM1D</i> | c.1344delT | frameshift | p.L450fs*1 | 0.3095 |

| | | | | | |
|-------------|-----------------|--------------------|-----------------|----------------|---------------|
| | <i>RNF43</i> | c.349delC | frameshift | p.R117fs*41 | 0.8333 |
| | <i>STAT5B</i> | c.1102delC | frameshift | p.Q368fs*2 | 1 |
| | <i>NF1</i> | c.2027delC | frameshift | p.P678fs*10 | 0.8919 |
| | <i>NF1</i> | c.2026_2027insC | frameshift | p.I679fs*21 | 0.9091 |
| | <i>FLCN</i> | c.1285_1286insC | frameshift | p.H429fs*27 | 0.6667 |
| | <i>NCOR1</i> | c.2465_2466delTG | frameshift | p.V822fs*3 | 0.5179 |
| | <i>FANCA</i> | c.1844delC | frameshift | p.P615fs*25 | 0.2121 |
| | <i>CDH1</i> | c.357delG | frameshift | p.H121fs*94 | 0.5882 |
| | <i>PTPRT</i> | c.3281delC | frameshift | p.P1094fs*6 | 0.6061 |
| | <i>BMPR2</i> | c.1742delA | frameshift | p.N583fs*44 | 0.4853 |
| | <i>ACVR2A</i> | c.1303delA | frameshift | p.K437fs*5 | 1 |
| | <i>FOXD4L1</i> | c.758delC | frameshift | p.R256fs*188 | 0.25 |
| | <i>MSH6</i> | c.3253_3254insC | frameshift | p.F1088fs*5 | 0.4674 |
| | <i>BAX</i> | c.114delG | frameshift | p.E41fs*19 | 0.3333 |
| | <i>ARHGAP35</i> | c.4330delC | frameshift | p.G1446fs*353 | 0.3521 |
| | <i>KMT2B</i> | c.5631delG | frameshift | p.G1879fs*16 | 0.5862 |
| | <i>KMT2B</i> | c.1649_1650insC | frameshift | p.K553fs*46 | 0.425 |
| | <i>ZNF429</i> | c.1162delA | frameshift | p.I390fs*294 | 0.5968 |
| | <i>SMARCA4</i> | c.359_360insC | frameshift | p.S122fs*7 | 0.4722 |
| | <i>STIL</i> | c.3366delA | frameshift | p.K1122fs*3 | 0.4808 |
| | <i>PRDM2</i> | c.4459delA | frameshift | p.V1490fs*74 | 0.9972 |
| | <i>RPL22</i> | c.44delA | frameshift | p.K15fs*5 | 0.439 |
| | <i>NBEA</i> | c.3355delA | frameshift | p.N1121fs*9 | 0.453 |
| | <i>BRCA2</i> | c.8015_8016insA | frameshift | p.I2675fs*6 | 0.4 |
| | <i>CDX2</i> | c.916delG | frameshift | p.V306fs*2 | 0.48 |
| | <i>RNF6</i> | c.848delA | frameshift | p.N283fs*9 | 0.4599 |
| | <i>KMT2D</i> | c.7325_7326insC | frameshift | p.R2443fs*6 | 0.5417 |
| | <i>ZFP36L1</i> | c.98delG | frameshift | p.G33fs*47 | 0.5455 |
| | <i>ARHGAP5</i> | c.2670delT | frameshift | p.F892fs*9 | 0.4507 |
| 143B | <i>MED12</i> | c.1102-1G>C | ess_splice | p.? | 0.9306 |
| | TP53 | c.467G>C | missense | p.R156P | 0.9831 |

Tab.4.1: Valutazione delle varianti genetiche nelle tre linee cellulari OV90, 143B, HCT116 utilizzando il tool Cell Model Passport.

L'adattamento metabolico è, quindi, un evento di riprogrammazione multifattoriale ed organo-specifico, frutto di una complessa integrazione di eventi mutazionali nei più noti driver della tumorigenesi e segnali cellulari intrinseci ed estrinseci, tra cui l'espressione genica regolata a livello epigenetico, la composizione cellulare, l'architettura del tessuto e spesso anche il microbioma della cellula ospite (Faubert, Solmonson, and DeBerardinis 2020).

Per mirare terapeutamente a tale plasticità metabolica, in un recente lavoro (Elgendy et al. 2019) associano il digiuno intermittente, un approccio clinicamente fattibile per ridurre la disponibilità di glucosio ematico, con l'inibitore non specifico del

CI, metformina. Nei topi esposti a cicli di alimentazione/digiuno per 24h, la metformina compromette la crescita tumorale solo quando somministrata durante l'ipoglicemia indotta dal digiuno. *In vitro*, il trattamento con metformina associato alla carenza di glucosio conduce le cellule tumorali ad un collasso metabolico ed apoptosi grazie alla modulazione della via PP2A-GSK3 β -MCL1 (Fig.4.3).

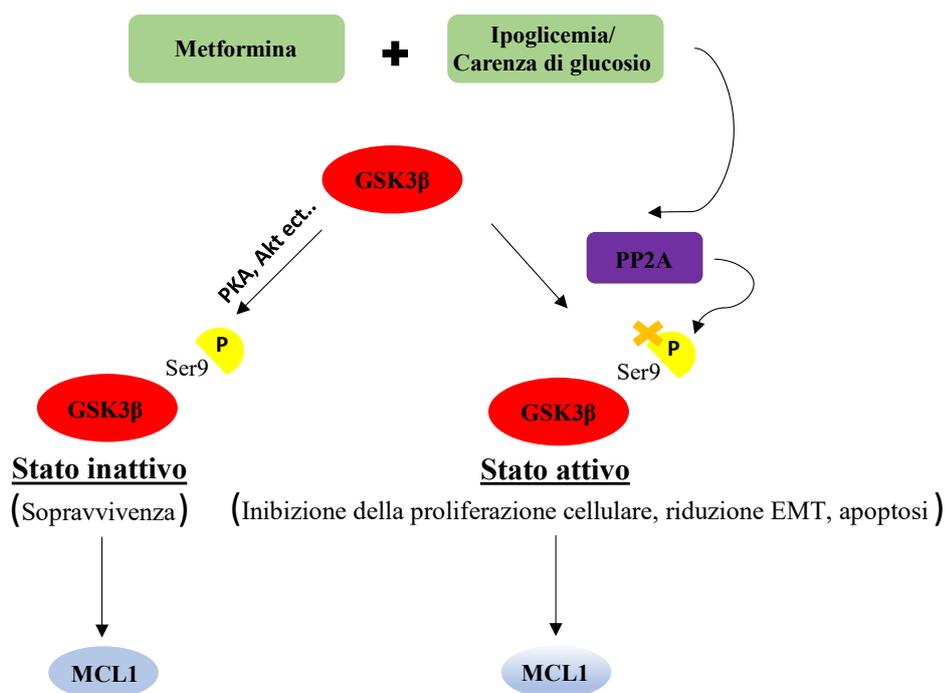


Fig.4.3: Rappresentazione schematica del meccanismo molecolare che mira alla plasticità metabolica delle cellule tumorali in seguito al trattamento sinergico con metformina ed ipoglicemia.

La glicogeno sintetasi chinasi 3 beta (GSK3 β) è un determinante cruciale del collasso energetico, regolando la cascata apoptotica. Di fatto, l'associazione ipoglicemia e metformina potrebbe mimare le condizioni di stress energetico e nutrizionale (ablazione del CI e crescita in basso glucosio) utilizzate nei modelli cellulari in esame. Così, per spiegare se il declino energetico ed il distintivo fenotipo di stress osservato nei modelli con deficit del CI in basso glucosio, eccetto nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}}, dipendesse dall'attivazione di eventi molecolari specifici, abbiamo investigato la possibile attivazione della GSK3 β . In accordo con il fenotipo di stress osservato, GSK3 β risulta essere de-fosforilata nel residuo inibitorio della Ser9, quindi attivata, nelle linee 143B^{NDUFS3^{-/-}} ed OV90^{NDUFS3^{-/-}}, ma fortemente inattiva nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}},

suggerendo che quest'ultime potrebbero evadere la risposta apoptotica mediata da GSK3 β innescando delle vie di sopravvivenza (Fig.4.4).

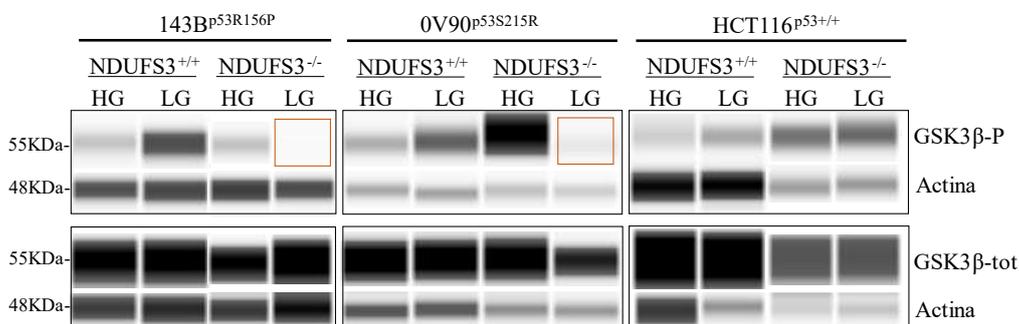


Fig.4.4: Valutazione dello stato di attivazione della glicogeno sintasi chinasi 3 beta (GSK3 β) nelle tre linee tumorali 143B^{p53R156P} (n=3), OV90^{S215R} (n=2), HCT116^{p53+/+} (n=2), sia NDUFS3^{-/-} che NDUFS3^{+/+}, coltivate in presenza di una concentrazione di 25mM e 5mM di glucosio nel terreno di coltura per 48h sfruttando un sistema di elettroforesi capillare (WES).

La riprogrammazione metabolica nel cancro è regolata da molteplici oncosoppressori, tra cui p53, il cui stato genetico è diverso tra i vari modelli cellulari in esame. Mutazioni somatiche sul gene *TP53* sono state identificate in circa il 50% dei tumori umani, che potrebbero condurre alla perdita della canonica funzione di oncosoppressore e/o all'acquisto di funzioni neomorfe pro-oncogeniche, molte delle quali ricadono nel suo dominio di legame al DNA, come nel nostro caso (p.R156P e p.S215R). Sebbene gran parte degli studi sperimentali si sia focalizzata sull'attività di noti hotspot mutazionali di *TP53*, raggruppati in corrispondenza dei codoni 175, 245, 248, 249, 273, e 282, di recente sono state identificate nuove mutazioni su quasi tutti i codoni presenti nel dominio di legame al DNA, ma sono poco caratterizzate. Un ulteriore livello di complessità è rappresentato da una diversa frequenza di mutazioni missenso tra sottoclassi di tumori originati, però, dallo stesso organo (Dumay et al. 2013). È stato visto, però, che non solo la posizione della mutazione, ma anche la natura della sostituzione può influenzare l'attività del mutante p53 (Muller and Vousden 2014). Ciò sottolinea la difficoltà di comprendere le conseguenze di ogni mutazione in *TP53* in relazione sia alla progressione della malattia che alla risposta alla terapia. Controverso, è il ruolo di p53 wild-type nel metabolismo del cancro. Evidenze scientifiche dimostrano come p53 sia in grado di rispondere ad un danno al DNA e a segnali iper-proliferativi, assolvendo alla sua

canonica funzione di oncosoppressore; in presenza di uno stress non genotossico (ipossia, carenza di nutrienti, stress ossidativo), però, può ripristinare l'omeostasi regolando positivamente il metabolismo ossidativo (Matoba et al. 2006). Quest'ultima funzione, in alcune circostanze metaboliche, potrebbe contribuire alla trasformazione neoplastica (Labuschagne, Zani, and Vousden 2018).

A riguardo, basandoci su un'idea ormai conclamata per cui il metabolismo ossidativo è la via metabolita adottata da alcune cellule metastatiche per favorire la migrazione e l'invasività (Porporato et al. 2014) e consolidato che l'oncosoppressore *TP53* può mediare il passaggio da un metabolismo glicolitico a pro-ossidativo mediante l'espressione di *SCO2*, subunità cruciale per l'assemblaggio ed il mantenimento della citocromo c ossidasi (Complesso IV) della catena respiratoria (Matoba et al. 2006), è evidente che se p53 wild type, in un contesto tumorale, rallenti o favorisca la trasformazione maligna è una questione ancor'oggi dibattuta ed aperta (Khan et al. 2017).

Interpretando i dati ottenuti, ipotizziamo che le cellule tumorali con un danno mitocondriale possano trarre un vantaggio da un genotipo p53 wild-type.

4.2 La carenza di glucosio induce un abbattimento dell'espressione dei mutanti p53, ma non wild-type, in assenza del CI mitocondriale

Per comprendere se lo stato di p53 possa influenzare la diversa plasticità metabolica osservata tra i vari modelli cellulari studiati, abbiamo valutato se il deficit del CI ed il basso glucosio influenzino l'espressione proteica di p53. Nelle linee 143B^{NDUFS3^{-/-}} ed OV90^{NDUFS3^{-/-}} con una mutazione in emizigosi sul gene *TP53*, che porta ad un cambio amminoacidico sul dominio di legame al DNA (p.R156P e p.S215R rispettivamente), osserviamo la scomparsa della proteina p53 in basso glucosio (Fig.4.5A). Sebbene non vi siano studi in letteratura che caratterizzino l'effetto biologico delle due mutazioni su *TP53*, un'analisi condotta sull'*IARC TP53* database definisce la sostituzione amminoacidica p.R156P (143B) come non patogenetica e la sostituzione p.S215R (OV90) come patogenetica. Tuttavia, l'elevato livello di espressione proteica dei mutanti p.R156P e p.S215R, osservata in presenza di glucosio alla concentrazione di 25mM, al

contrario della linea HCT116 in cui la p53 è wild-type, suggerirebbe che la proteina possa avere una funzione pro-oncogenica e la sua diminuzione potrebbe abbassare il potenziale tumorigenico e sfavorire il tumore. Di fatti, è noto che l'accumulo e la stabilizzazione dei mutanti p53 conferiscono proprietà tumorigeniche (GOF) durante la progressione maligna (Freed-Pastor and Prives 2012; Muller and Vousden 2013; Yue et al. 2017). Per tali ragioni, mirare farmacologicamente ai meccanismi che regolano la sua stabilizzazione sta emergendo come un promettente approccio terapeutico (Muller and Vousden 2013). I meccanismi di regolazione della stabilità dei mutanti p53 non sono pienamente compresi, ma tra i più annoverati si distingue il ruolo di un'isoforma di MDM2, altamente espressa nei tumori, MDM2-B, la quale interagisce con MDM2, sequestrandola a livello del citosol ed impedendole di ubiquitinare i mutanti p53 (Zheng et al. 2013). Un ruolo è anche svolto da un membro della famiglia delle chaperone "heat shock", HSP90, che interagisce con MDM2 e CHIP, le due E3 Ubiquitina ligasi note regolare p53, inibendole (Li et al. 2011) e favorendo la stabilizzazione indiretta dei mutanti p53. Pertanto, l'inibizione farmacologica della chaperone HSP90 è stato dimostrato un approccio terapeutico valido. Attualmente, SAHA (l'acido suberoilamide idrossamico) è l'unico farmaco, approvato dalla FDA, capace di inibire la HDAC6, noto regolatore positivo della HSP90. La riduzione dell'attività di HSP90 rimuove l'inibizione esercitata su MDM2 e CHIP, le quali libere possono indirizzare i mutanti p53 alla degradazione (Li et al. 2011).

Tra le interazioni proteiche, si distingue una famiglia di proteine, chiamate BAG, costituita da 6 membri (BAG1-BAG6). Le proteine BAG, grazie al loro dominio "BAG", possono interagire con proteine coinvolte in varie cascate di segnalazione, prendendo parte a diversi processi cellulari, tra cui divisione cellulare, morte cellulare e differenziamento (Kabbage and Dickman 2008). Recenti studi dimostrano un'interazione diretta tra le proteine BAG2 e BAG5 con i mutanti p53, proteggendoli dai meccanismi di degradazione e stabilizzandoli (Yue et al. 2015, 2016).

Infine, un meccanismo di regolazione della stabilità di p53 sono le modifiche post-traduzionali. In realtà, la maggior parte delle modifiche post-traduzionali studiate su p53 non ricade sul dominio di legame al DNA che, come prima anticipato, è la regione che accumula più mutazioni in *TP53*, per cui lo stato genetico di p53 non dovrebbe influenzare l'evento post-traduzionale.

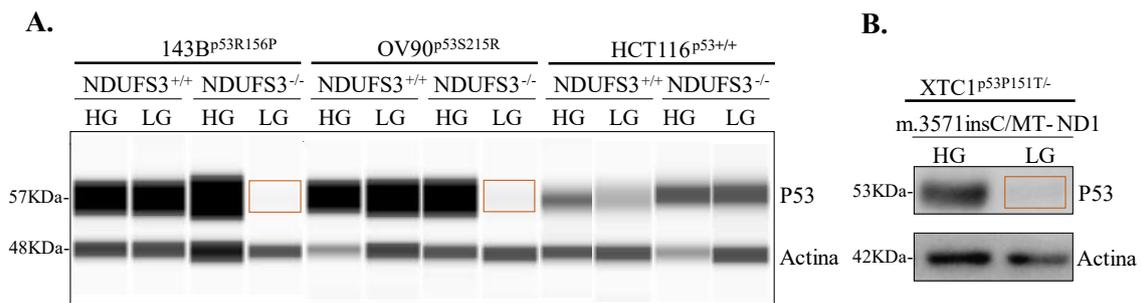


Fig.4.5: **A.** Valutazione dei livelli di espressione della proteina p53 nelle linee 143B, OV90 ed HCT116 coltivate in un terreno alla concentrazione di 25mM (HG) e 5mM (LG) di glucosio per 48h, rispettivamente, sia in presenza (NDUFS3^{+/+}) che in assenza (NDUFS3^{-/-}) del deficit genetico sul CI sfruttando un sistema di elettroforesi capillare (WES), (n=3). **B.** Valutazione dei livelli di espressione della proteina p53 nella linea XTC1 coltivate in un terreno alla concentrazione di 25mM (HG) e 5mM (LG) di glucosio per 48h tramite Western Blot, (n=3).

Però, modificazioni su specifici residui, Lys132, Thr155, Lys164, Ser215, Glu258, Asp259, and Cys277, localizzati nel dominio di legame al DNA, sebbene non hotspot mutazionali, possono regolare la stabilità dei mutanti p53 (Nguyen et al. 2014) (Fig.4.7). La scomparsa dei mutanti p53 (p.R156P e p.S215R) correla con la spiccata sensibilità alla carenza di glucosio e con il fenotipo di stress sopra descritti, osservati unicamente nelle linee 143B ed OV90 con un deficit del CI. Inoltre, in entrambe le linee singeniche CI-competenti, non si osservano differenze nell'espressione dei mutanti p53 in basso glucosio, presupponendo che il contributo maggiore al fenomeno molecolare osservato sia dovuto al deficit sul CI.

Per escludere che la riduzione dei livelli di espressione dei mutanti p53 sia causata specificatamente dalla mutazione sul gene nucleare *NDUFS3*, abbiamo sfruttato la linea di oncocitoma tiroideo XTC1 caratterizzata da una mutazione omoplasmica m.3571insC/*MT-ND1*, che causa un disassemblaggio del CI (Iommarini et al. 2014), ed una mutazione sull'oncosoppressore *TP53* (c.451C>A) che porta ad un cambio amminoacidico patogenico (p.P1517) secondo lo *IARC TP53* database. Anche nella linea XTC1 il deficit del CI associato ad una condizione di basso glucosio replica il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata (Fig.4.5B), come osservato in Fig.4.5A. Ciò ci dimostra che l'evento molecolare esplorato dipende da un danno complessivo e generico sul CI e non subunità-specifico e che, presumibilmente, si estende a diverse forme mutate di p53. Non

si osservano, invece, variazioni nell'espressione della proteina p53 nella linea HCT116^{p53+/+} in basso glucosio, nonostante il diverso grado di funzionalità del CI (Fig.4.5A).

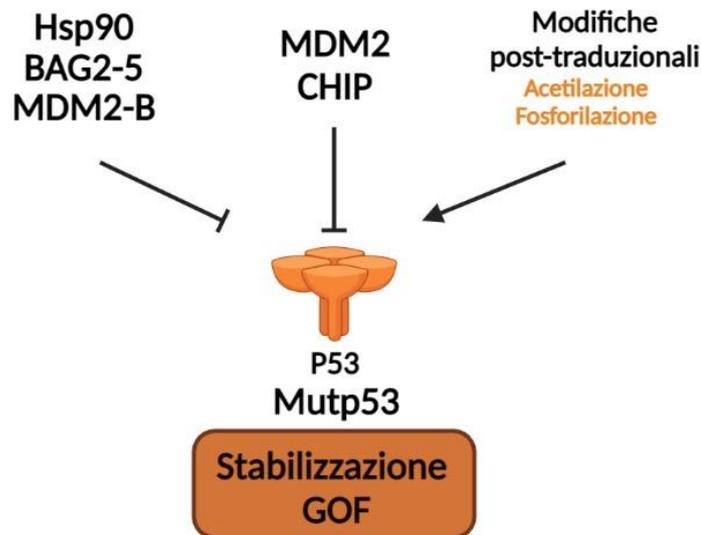


Fig.4.6: Rappresentazione schematica dei meccanismi molecolari responsabili della stabilizzazione dei mutanti p53.

Il deficit del CI indotto geneticamente nelle linee cellulari in esame genera un blocco o rallentamento della catena di trasporto degli elettroni (ETC) che potrebbe riflettersi in uno sbilanciamento del rapporto AMP/ATP ed una possibile attivazione della chinasi dipendente da AMP (AMPK), noto sensore energetico intracellulare. Abbiamo così valutato l'attivazione di AMPK nelle tre linee 143B^{NDUFS3-/-}, OV90^{NDUFS3-/-} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} sia in condizioni di coltura standard che in carenza di glucosio per 48h. Come atteso, una maggiore attivazione di AMPK si osserva nelle linee 143B^{NDUFS3-/-} ed OV90^{NDUFS3-/-} in basso glucosio (Fig.4.7), indicando una crisi energetica in atto, che spiegherebbe l'inibizione della proliferazione osservata in Fig.4.1A-B.

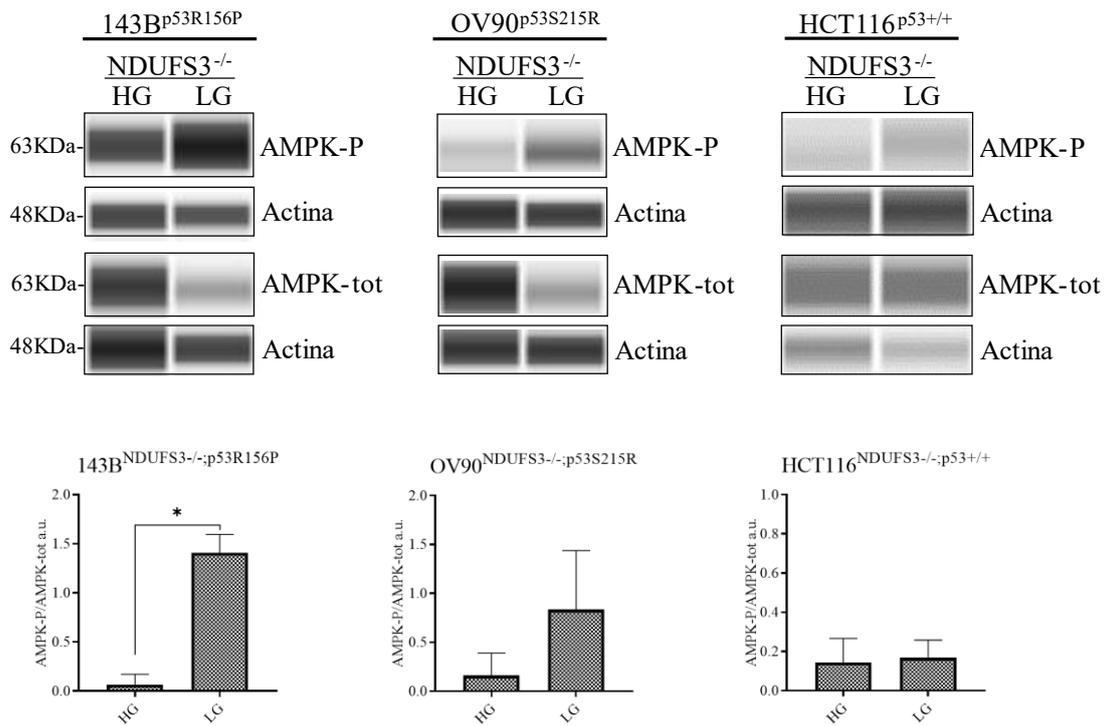


Fig.4.7: Valutazione dei livelli di fosforilazione nel residuo Thr172 di AMPK nelle linee 143B^{NDUFS3^{-/-};p53R156P}, OV90^{NDUFS3^{-/-};p53S215R} ed HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} coltivate in carenza di glucosio ed in presenza del deficit genetico sul CI tramite il sistema di elettroforesi capillare (WES). I valori densitometrici per ogni singola proteina sono stata ottenuti in automatico dallo strumento WES. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (* $p < 0,05$). 143B (n=3), OV90 (n=2), HCT116 (n=2).

Nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}}, invece, non si osserva una forte induzione di AMPK in basso glucosio (Fig.4.7), che suggerirebbe una maggiore disponibilità di risorse energetiche intracellulari, probabilmente dovute all'innescò di vie metaboliche alternative capaci di compensare il deficit energetico indotto dall'assenza del CI. È noto che l'attivazione di AMPK, indotta dalla carenza di glucosio, fosforila a valle p53 sul residuo di Ser15 (Jones et al. 2005), attivandola (Fig.4.8).

Sebbene nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} si osservi solo una parziale attivazione di AMPK in basso glucosio, potremmo ipotizzare che un possibile contributo alla riprogrammazione metabolica in atto nella HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} sia dovuto all'attivazione di p53 mediante AMPK.

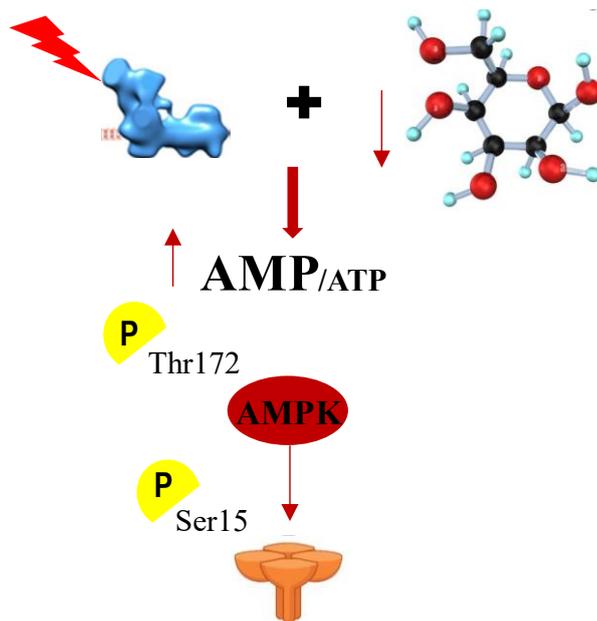


Fig.4.8: Rappresentazione schematica dell'attivazione di p53 mediata da AMPK.

Sebbene il nostro gruppo abbia dimostrato che le cellule tumorali con severe disfunzioni sul CI siano dipendenti dalla glicolisi per sostenere la proliferazione (Iommarini et al. 2013), cellule tumorali con un danno generico sull'ETC possono indurre una riprogrammazione metabolica verso carbossilazione riduttiva della L-glutamina come meccanismo di adattamento alternativo per sostenere i processi anaplerotici (Mullen et al. 2012), Fig.4.9.

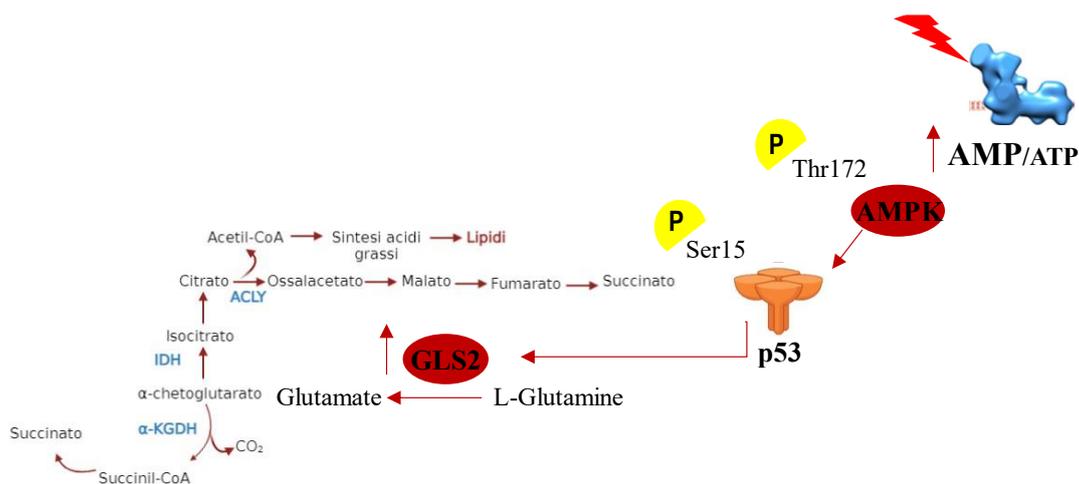


Fig.4.9: Rappresentazione schematica del controllo di p53 sul metabolismo della glutamina in condizioni di deficit del CI.

Una tale riprogrammazione metabolica potrebbe attuarsi nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+}, che potrebbe spiegare la resistenza alla deprivazione di glucosio (vedi Fig.4.1D). Infatti, tra le risorse di carbonio alternative che una cellula tumorale può metabolizzare per sostenere la crescita e la sintesi dei precursori biosintetici vi è la L-glutamina. La glutaminasi (GLS) idrolizza la glutamina in glutammato, favorendo le reazioni anaplerotiche e la produzione di NADPH. A supporto di ciò, è stato dimostrato che la glutaminasi 2 mitocondriale (GLS2), localizzata nella membrana mitocondriale interna, è un nuovo target della p53 wild-type (Suzuki et al. 2010). Tale regolazione positiva p53 dipendente potrebbe contribuire a fronteggiare il collasso metabolico indotto dal deficit del Complesso I e dalla carenza di glucosio.

Per corroborare la nostra ipotesi abbiamo verificato se nelle medesime condizioni di stress vi fosse un incremento di espressione di *GLS2*, confrontando le linee HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-} e HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} tramite qRT-PCR. Il significativo incremento di espressione di *GLS2* nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} suggerirebbe un possibile ruolo citoprotettivo esercitato dalla p53 wild-type (Fig.4.10). Inoltre, l'aumento significativo di *GLS2* osservato anche in alto glucosio (25mM), rispetto alla controparte p53-/-, confermerebbe che la regolazione positiva di *GLS2* avviene sia in assenza che in presenza di stress, come dimostrato nel lavoro di (Hu et al. 2010) (Fig.4.10).

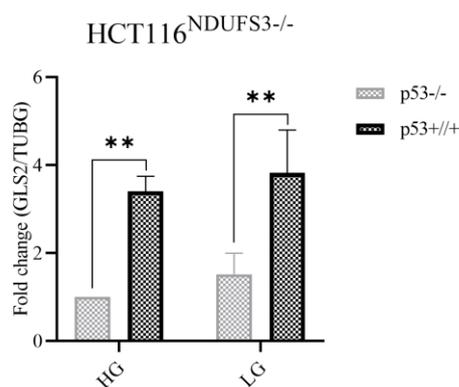


Fig.4.10: Misurazione quantitativa dei livelli di espressione di *GLS2* nelle linee HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-} ed HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} sia in condizioni di coltura standard (25mM) che in basso glucosio (5mM) tramite qRT-PCR. I valori sono rappresentati sottoforma di fold-change, ponendo la linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-} in alto glucosio uguale ad 1. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=1 in triplicato tecnico. L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test ANOVA bidirezionale (**p<0,001).

4.3 Identificazione del meccanismo molecolare responsabile dell'abbattimento della proteina p53 mutata

Il severo danno genetico indotto sul CI associato ad una crescita in basso glucosio potrebbe instaurare una crisi energetica tale da bloccare il macchinario trascrizionale, spiegando la riduzione dei livelli di espressione proteica di p53 nelle linee 143B^{NDUFS3-/-} ed OV90^{NDUFS3-/-} in basso glucosio. Abbiamo, così, valutato i livelli di espressione di TP53 nella linea 143B^{NDUFS3-/-} sia in condizioni di coltura standard (25mM di glucosio) che in basso glucosio. Si osserva una riduzione significativa in basso glucosio di TP53, ma un decremento di circa il 50% è poco probabile che possa giustificare la scomparsa di p53 osservata in proteina (Fig.4.11).

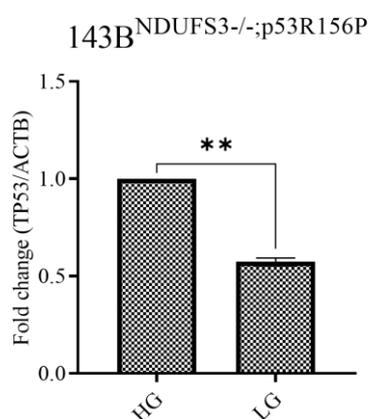


Fig.4.11: Misurazione quantitativa dei livelli di espressione del trascritto di TP53 nella linea 143B^{NDUFS3-/-} coltivata in un terreno alla concentrazione di 25mM e 5mM di glucosio per 48h tramite qRT-PCR. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=3. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test Student (**p<0,01).

Escluso un blocco trascrizionale, il secondo step di indagine è stato verificare l'innesco di eventuali meccanismi di degradazione, verosimilmente attivati in condizioni di stress energetico e nutrizionale. I più noti meccanismi di degradazione intracellulare sono mediante il proteasoma (Fig.4.12A) o l'autofagia (Fig.4.12B).

Stimoli estrinseci o intrinseci ne mediano l'attivazione, ma è la persistenza dello stress che ne finalizza lo scopo. Da un lato, infatti, l'innesco di meccanismi di degradazione può ripristinare l'omeostasi, rifornendo il pool di aminoacidi e

macromolecole essenziali per garantire i processi biosintetici; dall'altro, però, in presenza di uno stress cronico e persistente, la degradazione è il meccanismo molecolare che indirizza la cellula verso la morte cellulare. In un tessuto normale, l'espressione di p53 wild-type è mantenuta a livelli fisiologici grazie all'azione del suo più noto regolatore negativo, MDM2. Quest'ultima è un'E3 Ubiquitina ligasi che, grazie al suo dominio RING, lega l'ubiquitina attivata, coniugata all'enzima E2, a specifici residui di lisina sull'estremità C-terminale di p53, mediando l'ultimo step del complesso processo di ubiquitinazione (Pan and Blattner 2021). Complessivamente, dopo circa 4 cicli di ubiquitinazione, le proteine sono indirizzate al proteasoma 26S e degradate (Glickman and Ciechanover 2002). Per alcune proteine, tra cui p53, è occasionalmente richiesto un enzima aggiuntivo, chiamato E4, per assistere ad una organizzazione di ordine superiore della catena di poli-ubiquitina, evidenziando la complessità del macchinario di degradazione (Hoppe 2005). *Mdm2* è allo stesso tempo un target trascrizionale di p53, instaurando un meccanismo a feedback negativo, in cui al crescere dei livelli di p53 wild-type corrisponde un incremento di MDM2, il quale riporta p53 ai canonici livelli fisiologici, indirizzandola alla degradazione (Wu et al. 1993). La delezione genetica di *Mdm2* in modelli murini conduce a morte embrionale, superata dalla simultanea delezione di p53, rimarcando la centralità di MDM2 nella sua regolazione (De Rozières et al. 2000). L'esposizione delle cellule a vari segnali di stress come stress ossidativo, danno al DNA o ipossia, attivano svariate chinasi, tra cui l'enzima DNA-PK (treonina-serina chinasi), che fosforila p53 in specifici residui di serina (15 e 37), diminuendo l'abilità di MDM2 di interagire con p53, favorendone la stabilizzazione (Shieh et al. 1997). Tuttavia, se numerosi meccanismi sono stati identificati per spiegare l'interferenza nel legame tra MDM2 e p53 wild-type che ne causano l'accumulo, poco è chiaro sui meccanismi di regolazione dei mutanti p53, il cui turnover nelle cellule tumorali è rallentato.

È noto in letteratura che l'interazione tra la chaperone HSP90 e alcuni mutanti p53, ostacola l'azione di MDM2, favorendo la stabilizzazione proteica dei mutanti p53. Precedenti studi, infatti, dimostravano che il trattamento con geldamicina (noto inibitore della chaperone HSP90) inibiva l'interazione costitutiva tra i mutanti p53 e HSP90, promuovendone la degradazione (Peng et al. 2001).

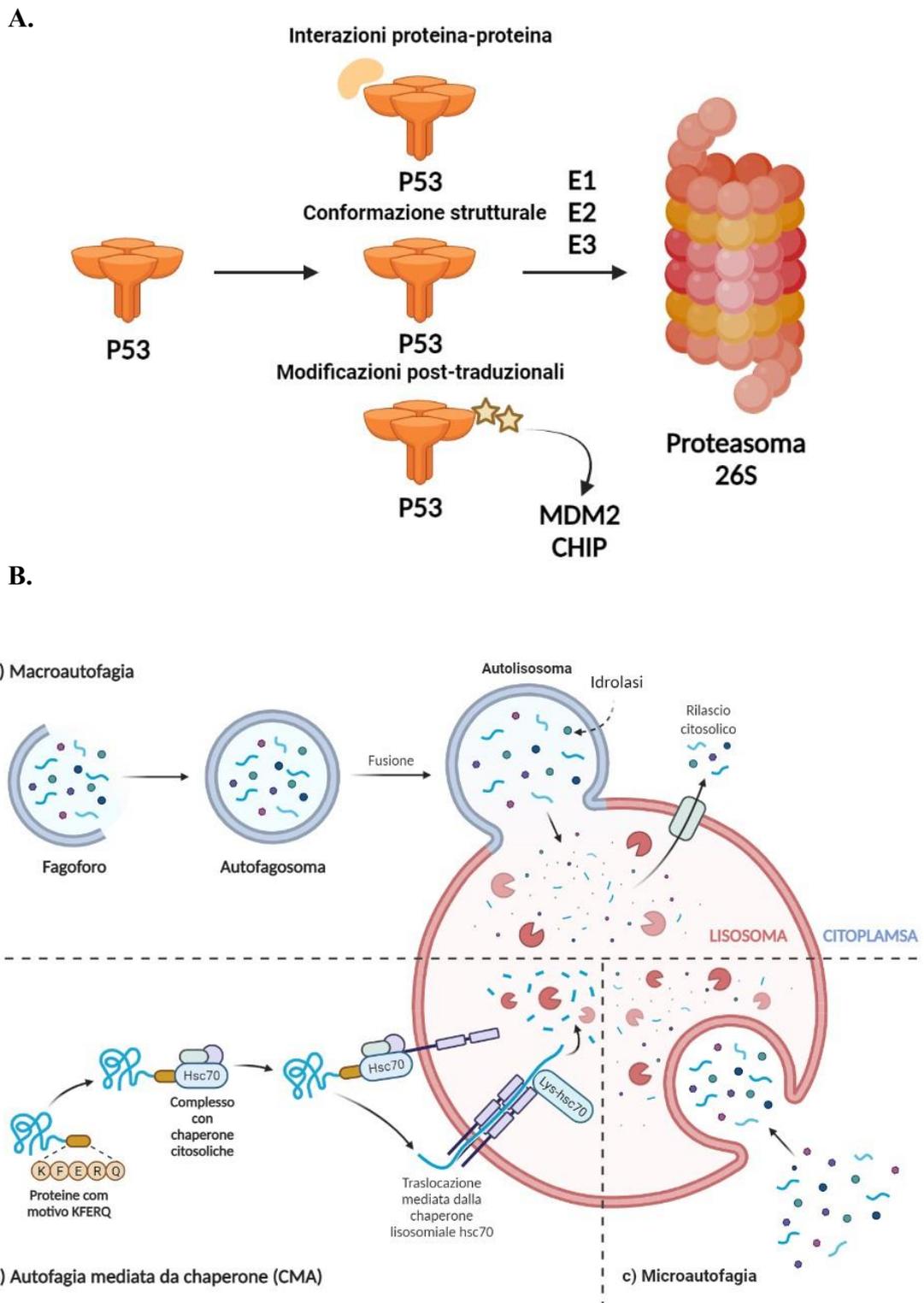


Fig.4.12: *A. Descrizione schematica del meccanismo di degradazione proteasoma dipendente. B. Descrizione schematica del meccanismo di degradazione autofagia dipendente.*

Inoltre, due lavori pubblicati nel 2003 dimostrano l'importanza del dominio acido di MDM2 nel bloccare l'ubiquitinazione di p53 wild-type (Kawai et al. 2003; Meulmeester et al. 2003). A conferma di ciò, in un recente lavoro dimostrano che è proprio la maggiore interazione dei mutanti p53 con sia il dominio acido che il dominio RING di MDM2 ad impedirne l'ubiquitinazione (Yang et al. 2019). Alla luce di ciò è evidente che, ad oggi, la comprensione dei possibili meccanismi di regolazione della proteina p53 wild-type e dei suoi mutanti è ancora controversa. Tuttavia, per comprendere se la destabilizzazione dei mutanti p53 sia dovuta ad una degradazione proteasoma-dipendente, la linea di osteosarcoma 143B^{NDUFS3-/-} è stata incubata con MG132 (10µM), inibitore della subunità 26S del proteasoma. L'incubazione è avvenuta per 5 ore in un terreno di coltura alla concentrazione di 25mM e 5mM di glucosio in cui le cellule sono coltivate per 48h. L'inibizione del proteasoma non correla con un recupero dell'espressione della proteina p53 mutata, suggerendo che la degradazione proteasoma dipendente non è il meccanismo responsabile (Fig.4.13).

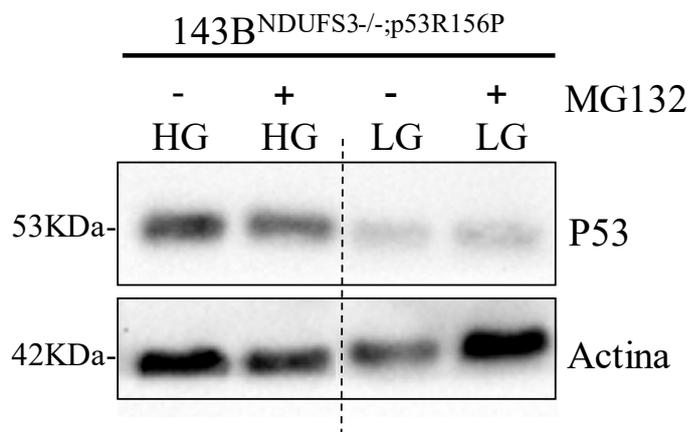


Fig.4.13: Valutazione dei livelli di espressione della proteina p53 mutata nella linea 143B^{NDUFS3-/-} coltivata in un terreno DMEM 25mM e 5mM di glucosio per 48h in presenza dell'inibitore MG132 (10uM) tramite Western Blot. Le condizioni di HG e LG rappresentano i controlli positivi e negativi all'interno dell'esperimento, rispettivamente. Il trattamento con MG132 è stato condotto per 5h all'interno delle 48h di trattamento, n=3.

Sebbene sia noto in letteratura che *Mdm2* non sia un target trascrizionale dei mutanti p53, Peng ed i suoi collaboratori dimostrano, nel lavoro del 2001 sopra citato, che i livelli fisiologici di MDM2 nelle linee tumorali p53 mutate sono paragonabili, se

non più elevati, a quelli delle linee tumorali p53 nulle o p53 wild-type. Sebbene l'espressione di MDM2 non sia stata valutata nella linea 143B^{NDUFS3-/-}, il lavoro di Peng suggerisce che l'inibizione di p53 sia indipendente dall'accumulo di MDM2, ma dipendente dal tipo di interazione. Ad ogni modo, è plausibile ipotizzare che la condizione di stress energetico e nutrizionale che si instaura *in vitro* indirizzi il destino della p53 mutata ad altre vie di regolazione che richiedono un minor dispendio di energia. Per continuare ad investigare sulle possibili cause della scomparsa della proteina p53 mutata in presenza del deficit del CI e del basso glucosio si è testato il secondo meccanismo di degradazione comune nelle cellule, ovvero l'autofagia. Durante l'autofagia, le cellule formano delle vescicole, note come autofagosomi, che internalizzano organelli danneggiati, componenti citoplasmatiche e proteine da indirizzare ai lisosomi per la degradazione. In condizioni fisiologiche, l'autofagia è mantenuta a livelli basali nelle cellule, ma perturbazioni provenienti dall'ambiente extracellulare, in particolare la deplezione di nutrienti, la attiva con una funzione citoprotettiva (Kroemer, Mariño, and Levine 2010) e di ripristino dell'omeostasi. Per tali ragioni esiste una stretta interazione tra le vie che regolano l'uptake dei nutrienti ed i processi che regolano l'autofagia. Le forme di autofagia responsabili del turnover dei mutanti p53 sono suddivisibili in due macro-gruppi: macro-autofagia (la più studiata e caratterizzata) e l'autofagia mediata da chaperone (CMA). In un lavoro del 2012, Rodriguez ed i suoi collaboratori dimostrano che la scomparsa dei mutanti p53 in esame (p.R175H e p.R280K), in condizioni di basso glucosio, dipende dall'innescamento di un meccanismo autofagico, poiché la carenza di glucosio influenza la disponibilità del pool di acetil-CoA intracellulare, modificando lo stato di acetilazione di numerose proteine. Lavori successivi dimostrano che l'autofagia è la via di degradazione più comune tra i mutanti p53 (Allende-Vega and Villalba 2019; Foggetti et al. 2017; Garufi et al. 2014). Alla luce dei dati in letteratura, la linea di osteosarcoma 143B^{NDUFS3-/-} è stata incubata, alternativamente, con due noti inibitori dell'autofagia, bafilomicina A1 e cloroquina. La scelta di testare due diversi inibitori nasceva da studi in letteratura che dimostravano sottili differenze nei loro meccanismi di inibizione. Infatti, la bafilomicina A1 è un inibitore dello stadio tardivo dell'autofagia, impedendo sia la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma che l'acidificazione autolisosomiale (Mauvezin and Neufeld 2015); la cloroquina, invece, il farmaco attualmente più in uso nei trial clinici per la cura del cancro, approvato dalla FDA, inibisce

il flusso autofagico, diminuendo sia la fusione diretta tra autofagosoma e lisosoma che inducendo una severa disorganizzazione del Golgi e dei sistemi endo-lisosomiali, eventi che possono impattare indirettamente sulla fusione tra autofagosoma e lisosoma (Mauthe et al. 2018) Fig.4.14.

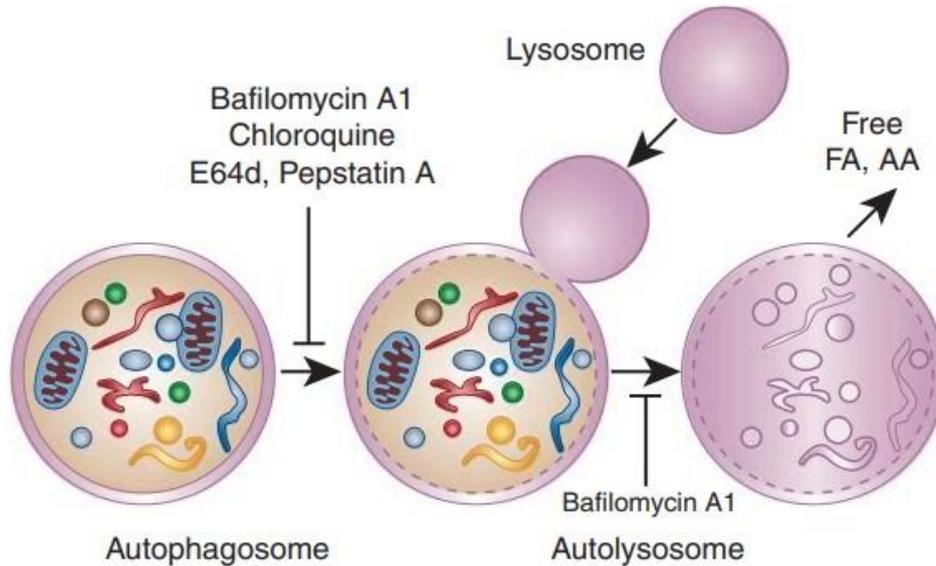


Fig.4.14: Rappresentazione schematica delle fasi del processo autofagico inibite in seguito al trattamento con Bafilomicina A1 e cloroquina (Kaushal et al.; 2012).

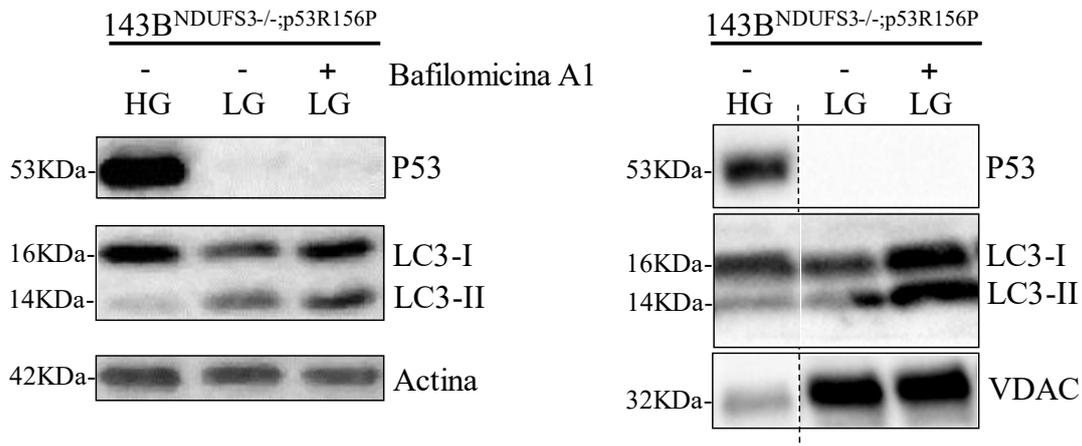


Fig.4.15: Valutazione dell'espressione della proteina p53 mutata nella linea 143B^{NDUFS3-/-} coltivata in un terreno DMEM 5mM di glucosio in presenza dell'inibitore bafilomicina A1 (0,2uM) e cloroquina (50uM) per 24h, rispettivamente (n=3).

L'inibizione dell'autofagia non ripristina i livelli di espressione della proteina p53 mutata nei modelli 143B^{NDUFS3-/-} coltivati in basso glucosio, con entrambi gli inibitori testati, nonostante l'autofagia risulti essere il meccanismo di degradazione candidato per i mutanti p53 (Fig.4.15). Per escludere che il mancato recupero di espressione della proteina p53 mutata dipendesse da un'inefficacia del farmaco, abbiamo valutato l'accumulo della forma attiva di LC3, LC3-II, confermando la corretta inibizione del meccanismo autofagico (Fig.4.15).

La mancata correlazione tra l'inibizione dell'autofagia ed il recupero della proteina p53 mutata può dipendere da tanti fattori. In primo luogo, le mutazioni sul gene *TP53* descritte nei lavori sopra citati non includono la mutazione poco caratterizzata presente nei modelli 143B^{NDUFS3-/-}, facendo supporre che ogni mutante di p53, funzionalmente diverso, sia sottoposto a diverse vie di regolazione. In secondo luogo, in nessuno dei lavori è descritta una linea cellulare tumorale con un deficit sul CI o generico sull'OXPPOS, aspetto da non trascurare nell'identificazione dei possibili meccanismi di degradazione in atto. Basandoci sui dati ottenuti, l'autofagia non è il meccanismo molecolare responsabile della scomparsa della proteina p53 mutata.

Escluso l'insacco di un possibile meccanismo di degradazione, un blocco della sintesi proteica è l'unica via alternativa per spiegare il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata in basso glucosio. La sintesi proteica è un processo altamente dispendioso e finemente regolato per resistere alle costanti fluttuazioni nella disponibilità di nutrienti ed ossigeno nel microambiente tumorale. La riduzione dei livelli di ATP, a causa del deficit severo sul CI (Iommarini et al. 2014; Kurelac et al. 2019), associata alla deprivazione di nutrienti potrebbero influenzare la sintesi proteica, attivando cascate di segnalazione che conducono ad un'attenuazione della traduzione. Tra le principali risposte allo stress si distinguono: attivazione dell'ISR (la via che media la risposta allo stress integrato), attivazione dell'UPR^{mt} (la via che media la risposta a proteine non correttamente ripiegate a livello del mitocondrio) ed inibizione di mTOR (Topf, Uszczyńska-Ratajczak, and Chacinska 2019) (Fig.4.16). In presenza di uno stress acuto, le tre vie di risposta operano per ripristinare l'omeostasi (Morita et al. 2015; Pakos-Zebrucka et al. 2016); quando l'esposizione allo stress persiste l'ISR, in particolare, guida

la cascata di segnalazione verso l'innescò di meccanismi di morte cellulare (Pakos-Zebrucka et al. 2016).

Il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata osservata nella linea 143B^{NDUFS3^{-/-}} avviene dopo 48h di trattamento in basso glucosio, condizione sempre associata ad un caratteristico fenotipo di stress. Per tali ragioni è verosimile che il blocco della sintesi proteica sia un meccanismo che consegue ad una crisi metabolica in atto.

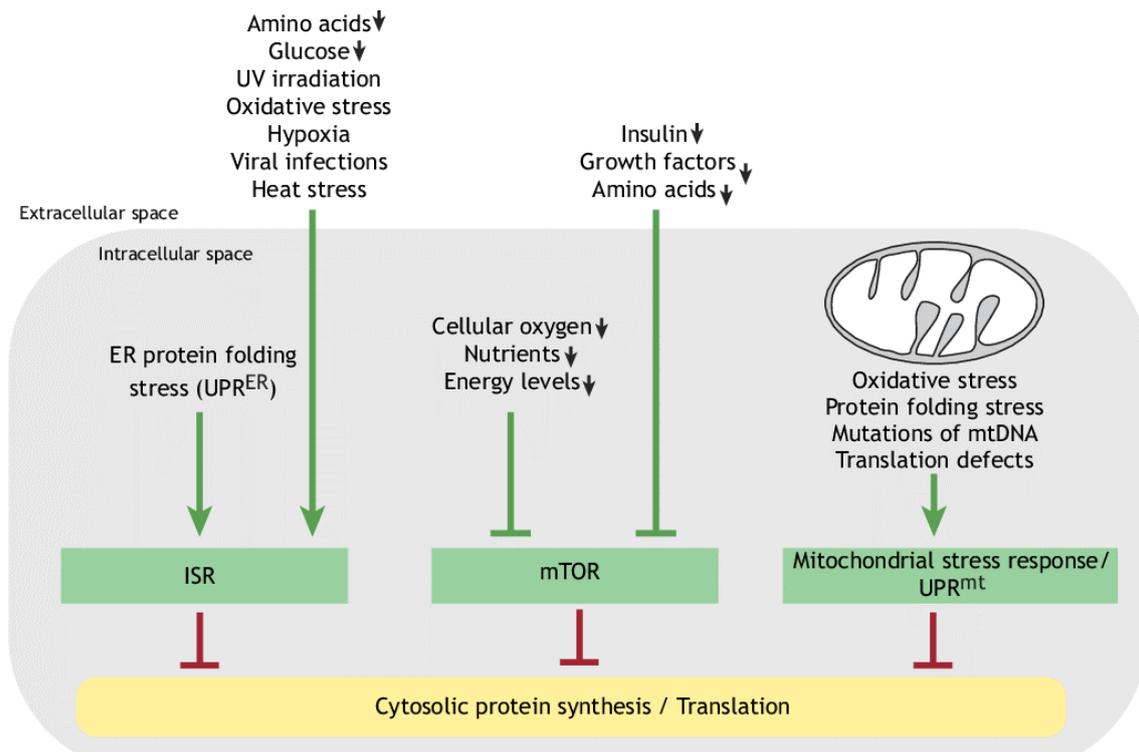


Fig.4.16: Rappresentazione schematica delle possibili vie di risposta allo stress in seguito al deficit dell'ETC (o Complesso I), auxotrofia da amminoacidi o deprivazione di nutrienti (Topf, Uszczyńska-Ratajczak, and Chacinska 2019).

Per valutare un eventuale blocco della sintesi proteica abbiamo trattato le cellule con puromicina, un analogo del tRNA, che causa un blocco prematuro della traduzione. L'esperimento è stato eseguito nella linea di osteosarcoma 143B^{NDUFS3^{-/-}} e nella rispettiva controparte singenica NDUFS3^{+/+}, sia in condizione di coltura standard (HG) che in basso glucosio (LG). Come è possibile osservare in Fig.4.17A solo la copresenza del deficit sul CI e del basso glucosio sinergizza nell'indurre un globale blocco traduzionale nella linea di osteosarcoma 143B (riquadro in grigio), al contrario della controparte CI-competente

che non risente di alcun effetto sulla sintesi proteica. Tale risultato, in linea con la vitalità ed il fenotipo di stress osservato, evidenzia che il fenomeno di scomparsa è parte di un processo generale e non proteina specifico, sebbene non si osservi alcuna variazione nei livelli di actina. In condizioni fisiologiche, le cellule sono in equilibrio dinamico, ove la sintesi proteica e i meccanismi di degradazione sono perfettamente bilanciati; in condizioni di stress, invece, si assiste ad un riarrangiamento del turnover proteico che dipende dall'integrazione di parametri intrinseci, funzionali o contestuali che caratterizzano ogni singola proteina. Le caratteristiche intrinseche di una proteina includono l'emivita del mRNA, la sequenza amminoacidica (ovvero la presenza di particolari amminoacidi) e la struttura secondaria assunta (struttura a foglietto beta/alfa elica). I parametri funzionali includono abbondanza relativa a livello intracellulare, l'appartenenza ad un complesso proteico ed il coinvolgimento in specifiche cascate di segnalazione molecolari. Ed infine, i determinanti contestuali, includono la localizzazione subcellulare, il tipo cellulare, il tessuto ed il microambiente (Ross, Langer, and Jovanovic 2021). Tutto ciò potrebbe spiegare il diverso turnover proteico dell'actina rispetto a buona parte delle proteine intracellulari, nonostante la persistenza dello stress nutrizionale nei modelli 143B^{NDUFS3^{-/-}}. Anche il ripiegamento di una proteina nella sua corretta struttura tridimensionale è un determinante della sua stabilità termodinamica. Infatti, lo stato nativo di una proteina, sebbene sia termodinamicamente favorevole, è spesso instabile in condizioni fisiologiche (Clausen et al. 2019). Dunque, studiare la cinetica e la dinamica del turnover proteico permette di comprendere come le cellule regolano processi essenziali come la crescita, il differenziamento e la risposta allo stress. È plausibile che dopo 48h di trattamento in basso glucosio si esauriscano i nutrienti nel terreno di coltura, commissionando la cellula tumorale ad un collasso metabolico.

Ragionando sui dati preliminari ottenuti nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}}, ove ipotizziamo un ruolo citoprotettivo svolto dalla p53 wild-type nel rallentare il collasso metabolico, abbiamo eseguito il medesimo saggio di sintesi proteica globale nelle linee HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} ed HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{-/-}} e nelle rispettive controparti singeniche NDUFS3^{+/+}, sia in alto che in basso glucosio. Come è possibile osservare in Fig.4.17B la combinazione sinergica deficit del CI e basso glucosio induce un totale abbattimento della sintesi proteica globale nella linea HCT116^{p53^{-/-}} (riquadro in grigio), ma solo un parziale

decremento nella linea HCT116^{p53+/+} (riquadro in blu), supportando la nostra ipotesi circa un ruolo protettivo svolto dalla p53 wild-type. Nessun effetto sulla sintesi proteica globale è, invece, osservato nelle rispettive controparti singeniche NDUFS3^{+/+}, dimostrando che il CI è necessario per non innescare un blocco della sintesi proteica.

Dunque, in accordo con i dati ottenuti, possiamo assumere che le cellule p53 nulle e p53 mutate mostrano una maggiore sensibilità al deficit indotto sul CI associato alla carenza di glucosio, contrariamente alla linea p53 wild-type capace di resistere e rallentare il collasso metabolico. Inoltre, il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata è causato da un blocco traduzionale, anche se globale. Però, nell'interpretazione dei dati ottenuti, non possiamo trascurare di confrontare due linee di origine diversa, mesenchimale (143B) ed epiteliale (HCT), rispettivamente, limitandoci nella generalizzazione del fenomeno osservato. Abbiamo così generato una linea isogenica, derivante dallo stesso clone, in cui l'unica differenza è lo stato genetico di *TP53*.

Poiché lo scopo di questo studio è comprendere come lo stato genetico di p53 possa influenzare la risposta ad un deficit indotto sul CI mitocondriale, ci siamo focalizzati sulla creazione e caratterizzazione di un modello isogenico stabile di HCT116^{NDUFS3^{-/-}} con un diverso stato di *TP53* (p53^{-/-}, p53^{+/+} e p53^{R156P}). Prima di procedere con la trasduzione stabile, abbiamo eseguito nel modello cellulare HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{-/-}} una trasfezione transiente del gene *TP53*c.467G>C, già clonato in un vettore di espressione retrovirale (pMSCV_puro) (Fig.4.18A). Dopo 48h dall'inizio della trasfezione è stato effettuato un cambio terreno sia in condizioni di coltura standard (HG) che in condizioni di basso glucosio (LG). Da un lato, sottoporre le cellule, dopo trasfezione, ad un cambio terreno in condizioni di coltura standard è essenziale per comprendere il mantenimento dell'espressione del transgene nel tempo; dall'altro, sottoporle, dopo trasfezione, ad uno stress come il basso glucosio è importante per mimare il fenomeno di scomparsa della proteina p53 in una linea diversa, di origine epiteliale, qualora l'evento si replicasse e non fosse dipendente dall'origine del tumore. L'analisi Western Blot osservata in Fig.4.18B dimostra che l'espressione del transgene è mantenuta sino alle 48 ore dal cambio terreno alla concentrazione di 25mM di glucosio. Inoltre, si osserva una riduzione dell'espressione del transgene dopo 48h dal cambio terreno in basso glucosio, replicando il fenomeno biologico osservato.

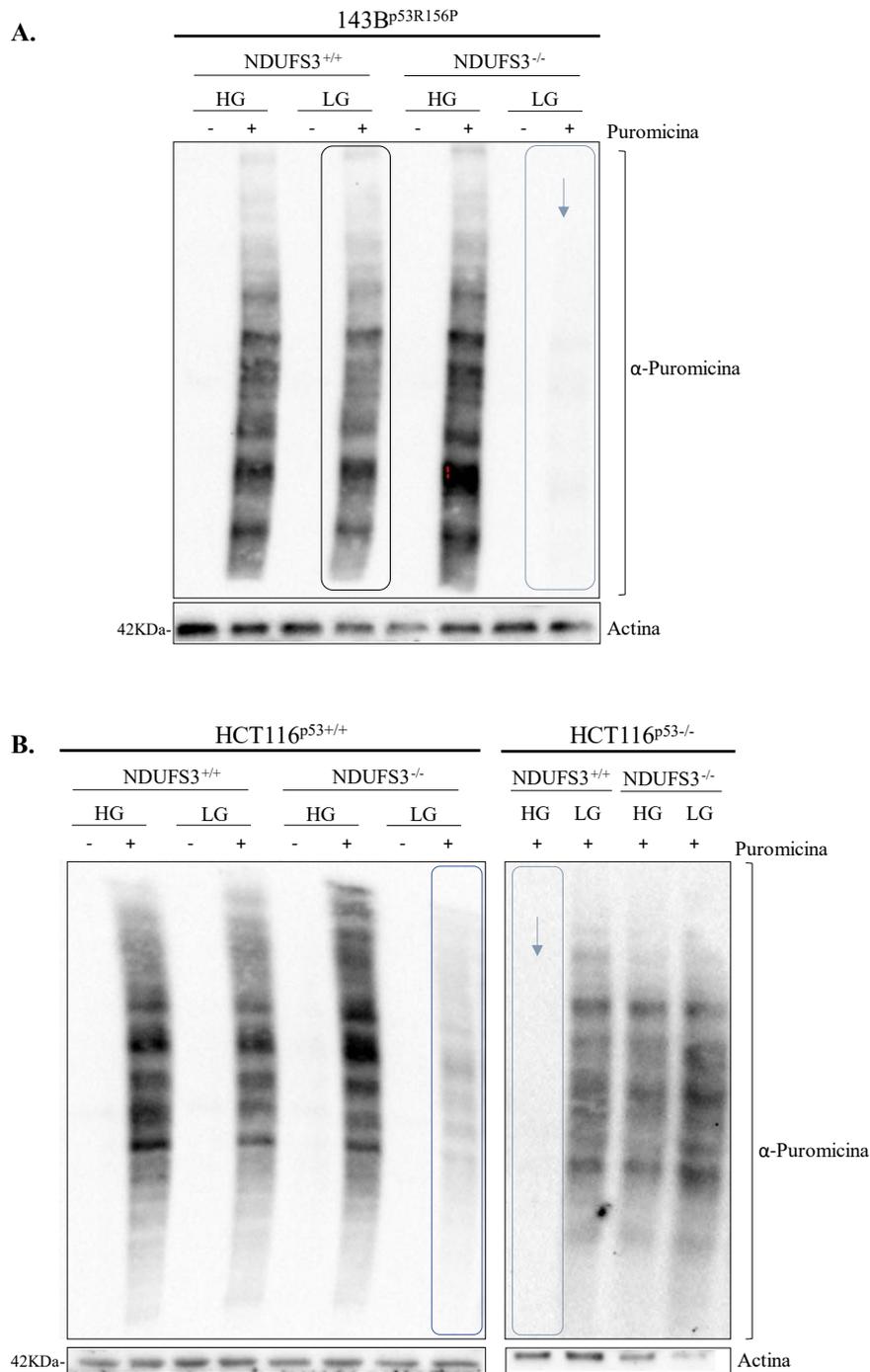


Fig.4.17: **A.** Saggio di sintesi proteica totale eseguito nelle linee 143B, sia NDUFS3^{+/+} che NDUFS3^{-/-}, coltivate in un terreno DMEM 25mM e 5mM di glucosio per 48h, in presenza o assenza di puromicina. Un'ora prima del termine dell'esperimento, le linee tumorali sono esposte ad un "pulse" di puromicina alla concentrazione di 10mg/mL per 10min (n=2). **B.** Saggio di sintesi proteica totale eseguito nelle linee HCT116^{p53+/+} e HCT116^{p53-/-}, sia NDUFS3^{+/+} che NDUFS3^{-/-}, coltivate in un terreno DMEM 25mM e 5mM di glucosio per 48h, in presenza o assenza di puromicina. Un'ora prima del termine dell'esperimento, le linee tumorali sono esposte ad un "pulse" di puromicina alla concentrazione di 10mg/mL per 10 min, (n=2). La metodica utilizzata è il Western Blot.

All'interno dello stesso esperimento è stata utilizzata, come controllo negativo, la linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-} sottoposta a trasfezione transiente per 48h con il plasmide pMSCV_vuoto.

Prima di procedere con la creazione dei modelli stabili di HCT116^{NDUFS3-/-} con un diverso stato di *TP53* (p53^{-/-}, p53^{+/+} e p53^{R156P}), abbiamo generato il costrutto pMSCV_*TP53*wild-type per retro-mutagenesi sito-specifica, sfruttando il plasmide pMSCV_*TP53*c.467G>C già ingegnerizzato. La sequenza dell'inserto retro-mutato è stata verificata attraverso sequenziamento Sanger. Dall'elettroferogramma (Fig.4.18C) è possibile notare la sostituzione della base citosina in guanina in posizione 467, confermando che la sequenza wild-type del cDNA di p53 clonato è stata ripristinata. Dunque, abbiamo eseguito tre separate infezioni virali nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-} per la creazione di tre modelli isogenici, ma con un diverso stato genetico di *TP53*. L'infezione è avvenuta utilizzando un virus ricombinante capace di favorire l'integrazione dei 3 plasmidi (pMSCV_*TP53*c.467G>C, pMSCV_*TP53*wild-type e pMSCV_vuoto). La popolazione di cellule trasdotte è stata selezionata aggiungendo puromicina (0.5µg/mL), grazie al gene per la resistenza presente nel plasmide pMSCV_vuoto di partenza. Dalla selezione clonale derivata dall'infezione virale con il plasmide pMSCV_*TP53*c.467G>C abbiamo selezionato quattro cloni (B8-C7-D7 e G8), dall'infezione virale con il plasmide pMSCV_*TP53*wild-type abbiamo selezionato quattro cloni (D7-G8-B10 e A11) ed infine dall'infezione virale con il vettore pMSCV_vuoto abbiamo selezionato cinque cloni (H10-D9-D10-F9 ed F11), verificati e scelti tramite analisi Western Blot (Fig.4.18D). Il gruppo di cloni selezionato, per ogni infezione virale, è stato utilizzato per la generazione dei tre specifici pool cellulari: HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P}, HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} ed HCT116^{NDUFS3-/-;mock}.

Seguendo il medesimo approccio sperimentale, abbiamo valutato la vitalità cellulare in basso glucosio nei tre pool cellulari sopra descritti per 72h. Come atteso, le linee HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P} ed HCT116^{NDUFS3-/-;mock} rivelano una maggiore sensibilità alla crisi energetica indotta dal deficit del CI associata al basso glucosio, con una riduzione significativa della crescita già a partire dalle 18 ore rispetto alla controparte HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} (Fig.4.19A).

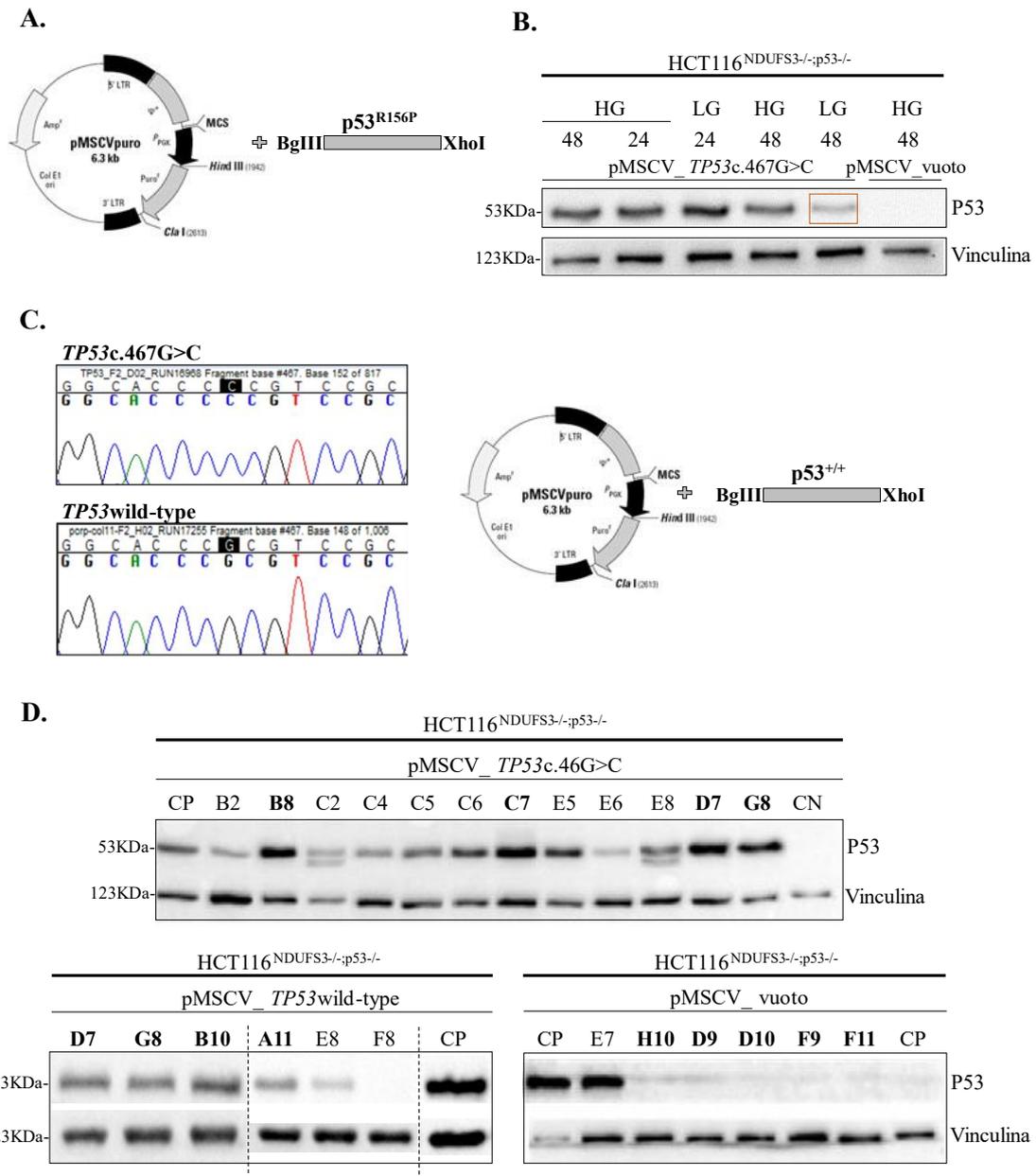


Fig.4.18: **A.** Mappa del vettore *pMSCV_puro* in cui è stato clonato il cDNA di *TP53/c.467G>C*. **B.** Analisi Western Blot della proteina *p53* dopo trasfezione transiente del plasmide *pMSCV_TP53/c.467G>C* nella linea cellulare HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-}. **C.** Valutazione della sequenza dell'inserto del gene *TP53* successiva alla retro-mutagenesi sito specifica mediante sequenziamento Sanger. **D.** Analisi Western Blot della proteina *p53* dopo trasduzione dei costrutti: *pMSCV_TP53/c.467G>C*, *pMSCV_TP53wild-type* e *pMSCV_vuoto* nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-}. Il controllo positivo è rappresentato dalla linea 143B^{NDUFS3+/+;p53R156}. Il controllo negativo, invece, è la linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53-/-} non sottoposta a trasduzione virale.

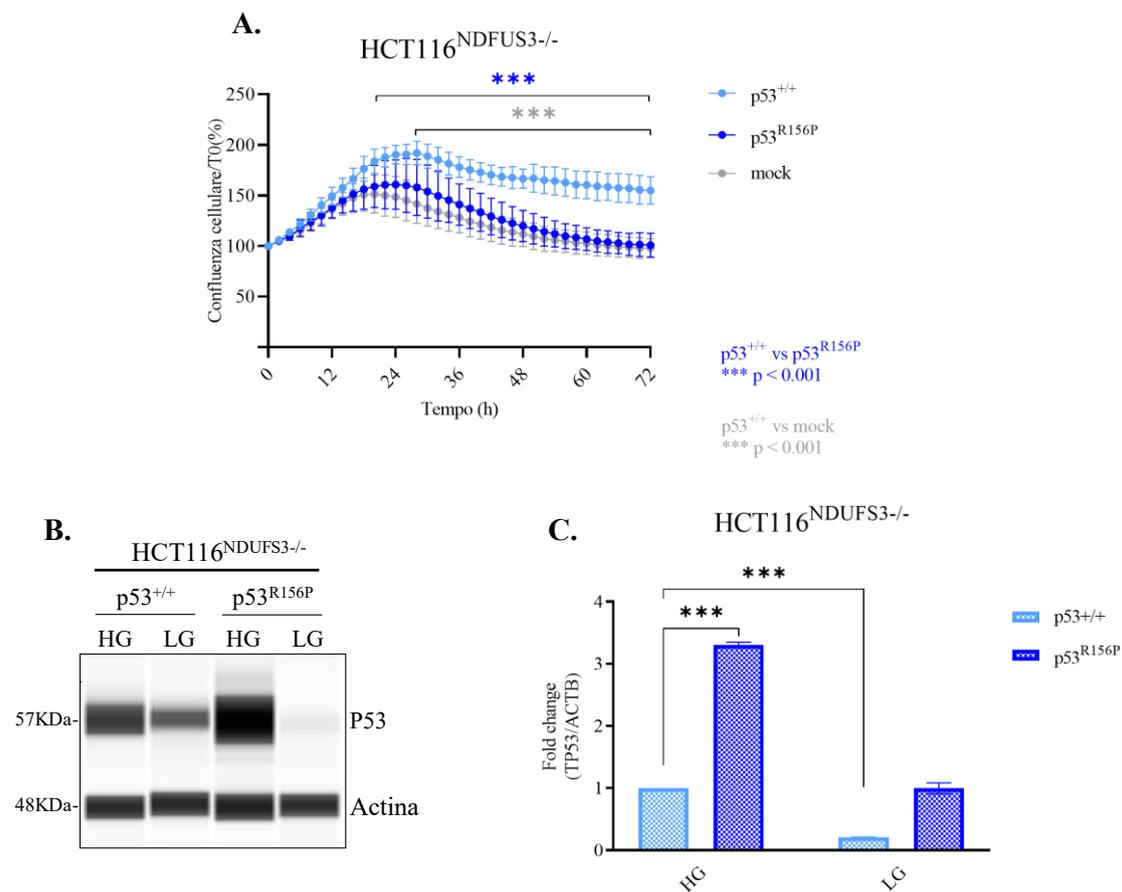


Fig.4.19: **A.** Saggio di proliferazione IncuCyte S3 nei tre modelli isogenici HCT116^{NDFUS3-/-} coltivate in un terreno DMEM alla concentrazione di 5mM di glucosio per 72h. La normalizzazione è stata eseguita sul T0 (indicato come 100%). I dati sono rappresentati come media \pm SD, (n=3). Per l'analisi statistica è stato applicato un T-test multiplo (***) p<0,001). **B.** Analisi dell'espressione di p53 nelle due linee isogeniche HCT116^{NDFUS3-/-;p53R156P} e HCT116^{NDFUS3-/-;p53+/+} coltivate in un terreno di coltura standard ed in basso glucosio per 24h utilizzando un sistema di elettroforesi capillare (WES). **C.** Valutazione dei livelli di espressione del trascritto di TP53 mediante qRT-PCR nelle linee HCT116^{NDFUS3-/-;p53R156P} e HCT116^{NDFUS3-/-;p53+/+} coltivate in un terreno di coltura standard per 24h. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=1 in triplicato tecnico. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test Student (***) p<0,001).

Successivamente, è stata valutata l'espressione di p53 sia in condizioni di coltura standard (HG) che in basso glucosio (LG) nelle due linee isogeniche HCT116^{NDFUS3-/-;p53R156P} e HCT116^{NDFUS3-/-;p53+/+}. L'ablazione del CI associata al basso glucosio ricapitola il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata, ma non della wild-type, i cui livelli non risentono di alcuna alterazione di espressione (Fig.4.19B). In Fig.4.19C sono valutati i livelli di espressione del trascritto di TP53 tramite qRT-PCR nelle due linee HCT116^{NDFUS3-/-;p53R156P} e HCT116^{NDFUS3-/-;p53+/+} coltivate in un terreno ad alta

concentrazione di glucosio 25mM e 5mM. Questo dato dimostra che, seppur sotto il controllo di un promotore forte e costitutivamente espresso, i due transgeni, contenenti la sequenza wild-type e mutata di *TP53*, rispettivamente, sono sottoposti ad una regolazione diversa, sia in termini di espressione genica (Fig.4.19C) che di stabilità proteica (Fig.4.19B). La creazione dei tre modelli isogenici HCT116^{NDUFS3-/-} potrebbe aiutare ad apprezzare delle differenze in funzione dello stato di *TP53*, ragione per cui sono i modelli cellulari su cui ci focalizziamo in tutte le analisi successive.

4.4 L'auxotrofia di aspartato nelle cellule prive del CI è responsabile della perdita di p53 in condizioni di basso glucosio

I dati mostrati in Fig.4.17A suggeriscono che il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata, osservata nella linea 143B^{NDUFS3-/-} in basso glucosio (5mM), possa dipendere da un blocco generale della traduzione, sebbene le proteine intracellulari siano sottoposte ad un diverso turnover proteico. Identificare la causa del blocco traduzionale osservato, in particolare della proteina p53 mutata, potrebbe rivelare uno dei meccanismi grazie ai quali i modelli nulli per il CI mostrano un basso potenziale tumorigenico. L'auxotrofia da amminoacidi è una caratteristica di alcuni tumori solidi (Ensor et al. 2002) la quale può essere esacerbata in presenza di un severo danno sull'ETC o un rallentamento nel ciclo dell'acido citrico (TCA). È noto, infatti, che l'inibizione generica dell'ETC, in particolare del Complesso I, riduce il pool di equivalenti riducenti essenziali per sostenere la sintesi di aspartato intracellulare (Gui et al. 2016), compensato dal supplemento esogeno di piruvato che fornisce un pathway alternativo per la rigenerazione del pool di NAD⁺ (Sullivan et al. 2015). L'aspartato può essere prodotto dall' α -chetoglutarato (α -KG) tramite due diverse vie biosintetiche: una riduttiva ed una ossidativa. Entrambe le vie, nel susseguirsi dei vari step di reazione, richiedono un cospicuo pool di NAD⁺ e FAD, la cui disponibilità potrebbe variare in particolari condizioni di stress, tra cui un difetto nella respirazione mitocondriale (Sullivan et al. 2015) (Fig.4.20A). A sostegno di ciò, in un lavoro del 2018, saggiano la vitalità cellulare in un pannello di linee cellulari tumorali in seguito all'inibizione dell'ETC, dimostrando che la diversa suscettibilità al deficit mitocondriale dipende dalla disponibilità di

aspartato (Garcia-Bermudez et al. 2018), metabolita limitante per la proliferazione. L'aspartato è un amminoacido polare, non essenziale, nutriente anaplerotico cruciale per sostenere il metabolismo ossidativo ed il TCA. Contribuisce alla biosintesi dei nucleotidi se convertito in adenil-succinato ed è precursore di molti amminoacidi, tra cui l'asparagina. Dunque, l'auxotrofia da aspartato rende altamente vulnerabili le cellule tumorali, elevando l'aspartato come un promettente target per la terapia anticancro. Pertanto, è plausibile ipotizzare che il danno genetico indotto sul CI nei modelli cellulari in esame, aggravato dalla crescita in carenza di glucosio, determini un blocco della via di biosintesi dell'aspartato che potrebbe avere un effetto sulla sintesi proteica. In queste circostanze, la carenza di aspartato può essere compensata attraverso due vie alternative: 1) a partire dall'ossalacetato o 2) tramite uptake dall'ambiente extracellulare (Garcia-Bermudez et al. 2018).

Nello specifico, l'ossalacetato può essere sintetizzato a partire dal piruvato mediante l'azione della piruvato carbossilasi (PC) (Owen, Kalhan, and Hanson 2002), dal citrato citosolico mediante l'azione dell'ATP citrato liasi (ACL) (Icard et al. 2020) ed infine dal malato grazie all'enzima malato deidrogenasi (MDH), il quale promuove l'ultima reazione del TCA (Alkan et al. 2018) (Fig.4.20B). Tuttavia, in presenza del deficit del CI, o in generale dell'ETC, la sintesi di ossalacetato a partire dal malato potrebbe non essere la via preferenziale a causa della riduzione dei livelli di NAD⁺ (Calabrese et al. 2013), sebbene la conversione del piruvato a lattato da parte della lattato deidrogenasi potrebbe rigenerare il pool di NAD⁺ citosolico.

La misurazione in spettrometria di massa dei livelli intracellulari di aspartato nei modelli HCT116^{NDUFS3^{-/-}} conferma una riduzione significativa rispetto alla controparte singenica HCT116^{NDUFS3^{+/+}} (Fig.4.21A). Inoltre, il terreno di coltura (DMEM) utilizzato in laboratorio per il mantenimento ed i trattamenti *in vitro* è privo di aspartato, escludendo l'uptake esogeno come possibile via di compensazione dall'auxotrofia di aspartato. Per di più, sebbene in seguito al deficit dell'ETC la sintesi di ossalacetato possa essere sostenuta dall'azione della PC e di ACL (vedi Fig.4.20B), la cui espressione non è stata approfondita in questo studio, la riduzione significativa dei livelli di aspartato nei modelli HCT116^{NDUFS3^{-/-}} suggerirebbe che i due enzimi, anche se attivi, non siano in grado di compensare l'auxotrofia da aspartato. La mancata disponibilità di aspartato potrebbe

causare un blocco della sintesi proteica ed un conseguente stallo degli mRNA sul ribosoma.

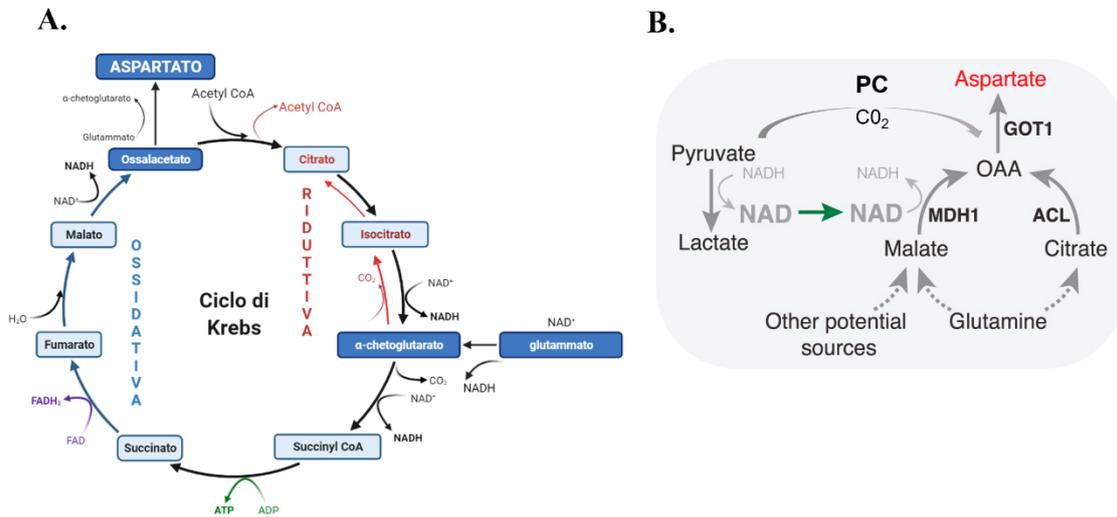
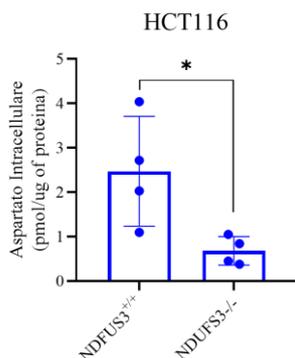


Fig.4.20: **A.** Rappresentazione schematica delle vie del TCA cruciali per la biosintesi di aspartato da glutammina. **B.** Rappresentazione schematica delle vie metaboliche coinvolte nella biosintesi di aspartato dal piruvato in condizioni di deficit dell'ETC. Il piruvato è convertito a lattato dall'enzima LDH (lattato deidrogenasi) rigenerando il pool di NAD^+ . La rigenerazione del NAD^+ può attivare l'enzima MDH citosolica (malato deidrogenasi) per fornire ossalacetato da malato e guidare la sintesi di aspartato mediante GOT1. In alternativa, un'altra fonte di ossalacetato è l'ATP citrato liasi (ACL) che catalizza la conversione del citrato e CoA in acetyl-CoA ed ossalacetato nel citosol. Infine, in seguito al deficit dell'ETC, anche l'attività della piruvato carbossilasi può generare ossalacetato da piruvato (Birsoy et al. 2015).

La frequenza media di aspartato calcolata su un totale di 1150 proteine è del 5,3% (Deshpande, Sicinski, and Hinds 2005)(Karpen, De Haseth, and Neet 1992) (Fig.4.21B). Grazie al tool bioinformatico ProtParam, abbiamo individuato una frequenza del 5,1% di aspartato all'interno della sequenza amminoacidica di p53 (393 aa) (Fig.4.21C). La frequenza osservata è simile alla frequenza di aspartato attesa. Nonostante ciò, abbiamo eseguito un'analisi in silico per conoscere la distribuzione dei 20 amminoacidi all'interno della sequenza di p53. Se considerassimo una distribuzione omogenea dell'aspartato in uno stretch di 60 amminoacidi, ci aspetteremmo 3 ripetizioni dello stesso. L'analisi *in silico*, però, mostra un arricchimento di 7 aspartato nei primi 60 amminoacidi che equivalgono a circa al 40% del numero totale presente nella sequenza (Fig.4.21D).

A.



B.

| Amino acid | Abbreviation/ symbol | M_r | pK_1 (-COOH) | pK_2 (-NH ₃ ⁺) | pK_R (R group) | pI | Hydropathy index* | Occurrence in proteins (%) [†] |
|---------------------------|-------------------------|-------|-------------------|--|---------------------|-------|----------------------|--|
| Polar, uncharged | | | | | | | | |
| R groups | | | | | | | | |
| Serine | Ser S | 105 | 2.21 | 9.15 | | 5.68 | -0.8 | 6.8 |
| Threonine | Thr T | 119 | 2.11 | 9.62 | | 5.87 | -0.7 | 5.9 |
| Cysteine | Cys C | 121 | 1.96 | 10.28 | 8.18 | 5.07 | 2.5 | 1.9 |
| Asparagine | Asn N | 132 | 2.02 | 8.80 | | 5.41 | -3.5 | 4.3 |
| Glutamine | Gln Q | 146 | 2.17 | 9.13 | | 5.65 | -3.5 | 4.2 |
| Positively charged | | | | | | | | |
| R groups | | | | | | | | |
| Lysine | Lys K | 146 | 2.18 | 8.95 | 10.53 | 9.74 | -3.9 | 5.9 |
| Histidine | His H | 155 | 1.82 | 9.17 | 6.00 | 7.59 | -3.2 | 2.3 |
| Arginine | Arg R | 174 | 2.17 | 9.04 | 12.48 | 10.76 | -4.5 | 5.1 |
| Negatively charged | | | | | | | | |
| R groups | | | | | | | | |
| Aspartate | Asp D | 133 | 1.88 | 9.60 | 3.65 | 2.77 | -3.5 | 5.3 |
| Glutamate | Glu E | 147 | 2.19 | 9.67 | 4.25 | 3.22 | -3.5 | 6.3 |

*A scale combining hydrophobicity and hydrophilicity of R groups; it can be used to measure the tendency of an amino acid to seek an aqueous environment (- values) or a hydrophobic environment (+ values). See Chapter 11. From Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

[†]Average occurrence in more than 1,150 proteins. From Doolittle, R.F. (1989) Redundancies in protein sequences. In *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Faerman, G.D., ed.), pp. 599-623. Plenum Press, New York.

Doolittle et al.; 1989

C.

Composizione amminoacidica di p53

| | | |
|---------|----|-------|
| Ala (A) | 24 | 6.1% |
| Arg (R) | 26 | 6.6% |
| Asn (N) | 14 | 3.6% |
| Asp (D) | 20 | 5.1% |
| Cys (C) | 10 | 2.5% |
| Gln (Q) | 15 | 3.8% |
| Glu (E) | 30 | 7.6% |
| Gly (G) | 23 | 5.9% |
| His (H) | 12 | 3.1% |
| Ile (I) | 8 | 2.0% |
| Leu (L) | 32 | 8.1% |
| Lys (K) | 20 | 5.1% |
| Met (M) | 12 | 3.1% |
| Phe (F) | 11 | 2.8% |
| Pro (P) | 45 | 11.5% |
| Ser (S) | 38 | 9.7% |
| Thr (T) | 22 | 5.6% |
| Trp (W) | 4 | 1.0% |
| Tyr (Y) | 9 | 2.3% |
| Val (V) | 18 | 4.6% |
| Pyl (O) | 0 | 0.0% |
| Sec (U) | 0 | 0.0% |

ProtParam tool

D.

| TAD | PRD | DBD | TD | BD |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| MEEPQSDPSV | EPPLSQETFS | DLWKLLPENN | VLSPLPSQAM | DDLMLSPDDI |
| 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| EQWFTEDDPG | DEAPRMPEAA | PPVAPAPAAP | TPAAPAPAPS | WPLSSSVPSQ |
| 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| KTYQGSYGR | LGFLHSGTAK | SVTCTYSPAL | NKMFQQLAKT | CPVQLWVDS |
| 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| PPPGTRVRAM | AIYKQSQHMT | EVVRRCPHHE | RCSDDGLAP | PQHLIRVEGN |
| 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| LRVEYLDLDRN | TFRHVVVPY | EPPEVGSDDCT | TIHNYMCNS | SCMGGMNRRP |
| 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| ILTIITLLEDS | SGNLLGRNSF | EVRVCACPGR | DRRTEENLR | KKGEPHHELP |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
| PGSTKRALPN | NTSSSPQPKK | KPLDGEYFTL | QIRGRERFEM | FRELNEALEL |
| 360 | 370 | 380 | 390 | |
| KDAQAGKEPG | GSAHSSHLK | SKKGQSTSRH | KKLMFKTEGP | DS |

Fig.4.21: **A.** Misura dei livelli aspartato intracellulare in spettrometria di massa (HPLC) nelle linee isogeniche HCT116^{NDUFS3+/+;p53R156P} e HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P} coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 30 min. I dati sono rappresentati come media \pm SD [NDUFS3+/+ (n=4) e NDUFS3-/- (n=4)]. La normalizzazione è stata eseguita sul contenuto proteico totale (pmol/µg). L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (*p<0,05). **B.** Frequenza dell'amminoacido aspartato in un campione di più di 1150 proteine (Doolittle et al.; 1989). **C.** Frequenza dell'aspartato osservata nell'intera sequenza amminoacidica di p53 (393aa) utilizzando il tool ProtParam. **D.** Rappresentazione schematica dei domini di p53: TAD, dominio di trans-attivazione; PRD, dominio ricco in proline; DBD, dominio di legame al DNA; TD, dominio di tetramerizzazione; BD, dominio basico. Analisi in silico della distribuzione dell'amminoacido aspartato (D) nell'intera sequenza amminoacidica di p53. L'aspartato (D) è evidenziato con riquadri azzurri. La sequenza di p53 umana è stata esportata da UniProtKB – P04637 (P53_HUMAN).

La ragione biologica di tale distribuzione non si conosce, ma un arricchimento in corrispondenza dei domini di trans-attivazione e di legame al DNA suggerirebbe un possibile effetto funzionale o strutturale sulla proteina. Oltre tutto, è verosimile che gli mRNA, con una organizzazione dei codoni che rispecchia una simile ripartizione dell'aspartato, possano in maniera più accentuata subire uno stallo sul ribosoma.

Se in parte, questa ipotesi, potrebbe giustificare il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata, difficile è comprendere perché ciò non accada per la proteina p53 wild-type. Di fatto, il deficit del CI e la crescita in basso glucosio rappresentano il denominatore comune tra le linee cellulari in esame, quindi in tutte si assiste ad un blocco della via di biosintesi dell'aspartato.

La differenza è il diverso grado di espressione della proteina p53, più abbondante e stabile nei mutanti p53 in esame (143B^{NDUFS3-/-}, OV90^{NDUFS3-/-}, HCT116^{NDUFS3-/-;p53R15P}). I livelli abbondanti di proteina nei mutanti p53, verosimilmente dovuta alla mancata regolazione di MDM2, potrebbe influenzare la frequenza con cui i trascritti giungono sul ribosoma rispetto alle linee con una p53 wild-type, anche a parità di livelli di trascritto. Apparentemente, una differenza significativa nei livelli di espressione di *TP53* si osserva tra le due linee isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} e HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P}, ma quasi sicuramente siamo di fronte ad un epifenomeno esclusivo del modello in esame (vedi Fig.4.19C). Idealmente, nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} i pool di mRNA di *TP53* che giungono sul ribosoma, con una frequenza inferiore, procedono con la traduzione, nonostante la poca disponibilità di aspartato; nei mutanti p53, invece, la frequenza maggiore con cui i trascritti giungono sul ribosoma, impedisce al pool di mRNA di *TP53* di proseguire con la traduzione, stallando sul ribosoma e generando un effetto quantitativamente più apprezzabile rispetto alla linea di carcinoma colon rettale.

Alla luce di ciò, l'unica via alternativa di compensazione all'auxotrofia di aspartato è il suo supplemento esogeno nel terreno di coltura. L'uptake di aspartato può essere favorito da tre diversi trasportatori appartenenti alla famiglia SLC, nello specifico SLC1A1, SLC1A2 ed SLC1A3. Sono dei trasportatori glutammato/aspartato accoppiati al trasporto ionico, con una diversa distribuzione tissutale, in particolare neuronale (Kanai et al. 2013). Nel 2018, Tajan e colleghi dimostrano che p53 promuove l'espressione di *SLC1A3* in condizioni di deprivazione di glutammina, sfruttando l'aspartato per

compensare i flussi anaplerotici e favorire la proliferazione (Tajan et al. 2018). Inoltre, in carenza di glutammina, p53 regola anche positivamente l'espressione di un altro membro della famiglia SLC, *SLC7A3*, favorendo l'uptake di arginina e la crescita (Lowman et al. 2019). Tali dati evidenziano un nuovo ruolo mediato da p53 nella riprogrammazione metabolica, in particolare in condizioni di deprivazione di amminoacidi. Abbiamo così valutato l'espressione del trasportatore *SLCIA3*, target di p53, nei modelli isogenici HCT116^{NDUFS3^{-/-}}, con diverso stato genetico di p53, in condizioni di coltura standard tramite qRT-PCR.

L'analisi in Fig.4.22A mostra già un livello di espressione del trasportatore *SLCIA3* significativamente più alto nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P} rispetto alle controparti singeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} e HCT116^{NDUFS3^{-/-};mock}, avvalorando l'idea di una mutazione sul gene *TP53* trans-attivante. Anche Tajan, nel suo lavoro, dimostra che alcuni mutanti p53 (p.L130V, p.R273H e p.R248W), esprimono livelli maggiori di *SLCIA3* rispetto alla controparte p53^{+/+}, suggerendo l'esistenza di un pannello di mutazioni puntiformi in *TP53* che non solo possono ritenere la stessa funzione della wild-type, ma anche accentuarla e supportarla in condizioni di stress metabolico. L'incremento di espressione di *SLCIA3* osservato in assenza di glutammina si realizza verosimilmente anche in basso glucosio, la condizione di stress nutrizionale necessaria affinché si osservi il fenomeno biologico sopra descritto.

Abbiamo, così, misurato, nel tempo, l'effetto del basso glucosio sull'espressione di *SLCIA3* in base allo stato di *TP53*. Solo nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P} si osserva un aumento di espressione significativo di *SLCIA3* in basso glucosio rispetto alla controparte mock (p53^{-/-}) che rappresenta il controllo dell'esperimento per ogni timepoint (Fig.4.22B). Ciò suggerirebbe che l'aumento di espressione di *SLCIA3* nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P} potrebbe risultare vantaggioso per superare l'auxotrofia da aspartato indotta dal deficit del CI, rendendoli più resistenti al collasso metabolico, se in presenza di aspartato esogeno. La concentrazione di aspartato oscilla tra i 10-30µM nel siero murino ed intorno a 150µM nel terreno di coltura standard RPMI. Così abbiamo eseguito un saggio di proliferazione in basso glucosio nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P}, che esprime elevati livelli di *SLCIA3*, testando un range di concentrazioni di aspartato

(da 0,25 a 5mM) per 72h, al fine di scegliere delle condizioni sperimentali che si avvicinino il più possibile a quelle fisiologiche *in vivo*.

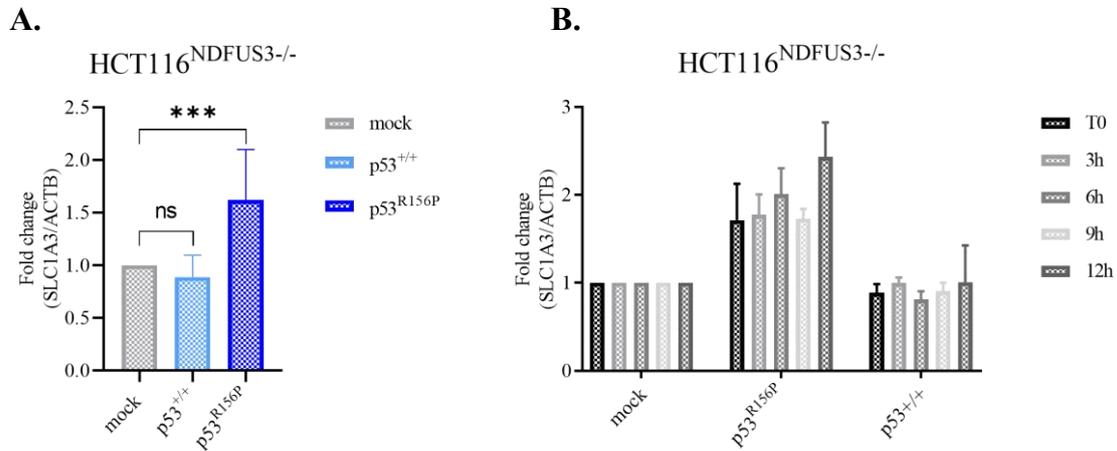


Fig.4.22: **A.** Valutazione dei livelli di espressione di *SLC1A3* tramite qRT-PCR nei tre modelli isogenici coltivati in condizioni di coltura standard per 24h. I dati sono rappresentati come media \pm SD, $n=4$. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a variabili indipendenti ($***p<0,001$). **B.** Valutazione dei livelli di espressione di *SLC1A3* in basso glucosio (5mM) a diversi timepoint (T0, 3h, 6h, 9h e 12h) tramite qRT-PCR nei tre modelli isogenici. La normalizzazione è stata eseguita ponendo uguale 1 ogni timepoint della linea HCT116^{NDFUS3-/-,mock}. I dati sono rappresentati come media \pm SD, $n=3$. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a variabili indipendenti ($*p<0,05$; $**p<0,01$).

L'analisi mostra che il guadagno proliferativo conferito dal supplemento di aspartato è dose dipendente, ma solo la concentrazione di 5mM lo rende significativamente vantaggioso, scegliendola come definitiva concentrazione per tutti gli esperimenti successivi (Fig.4.23A).

Abbiamo ottenuto in maniera indiretta, dal surnatante, i livelli di aspartato in ingresso, esponendo le cellule ad un trattamento di 24h in un terreno in basso glucosio (5mM) addizionato con aspartato (5mM), sia per verificare l'effettivo ingresso, che per valutare se ci fosse una proporzionalità diretta tra i livelli di espressione di *SLC1A3* e la capacità di farne uptake.

Come mostrato in Fig.4.23B, solo nei mutanti p.R156P si osserva un significativo ingresso di aspartato esogeno, proporzionale ai livelli di espressione del trasportatore. Lo step seguente è stato verificare l'effetto sulla proliferazione dovuto al supplemento di aspartato in basso glucosio in tutte e tre linee isogeniche HCT116^{NDFUS3-/-} per 72h.

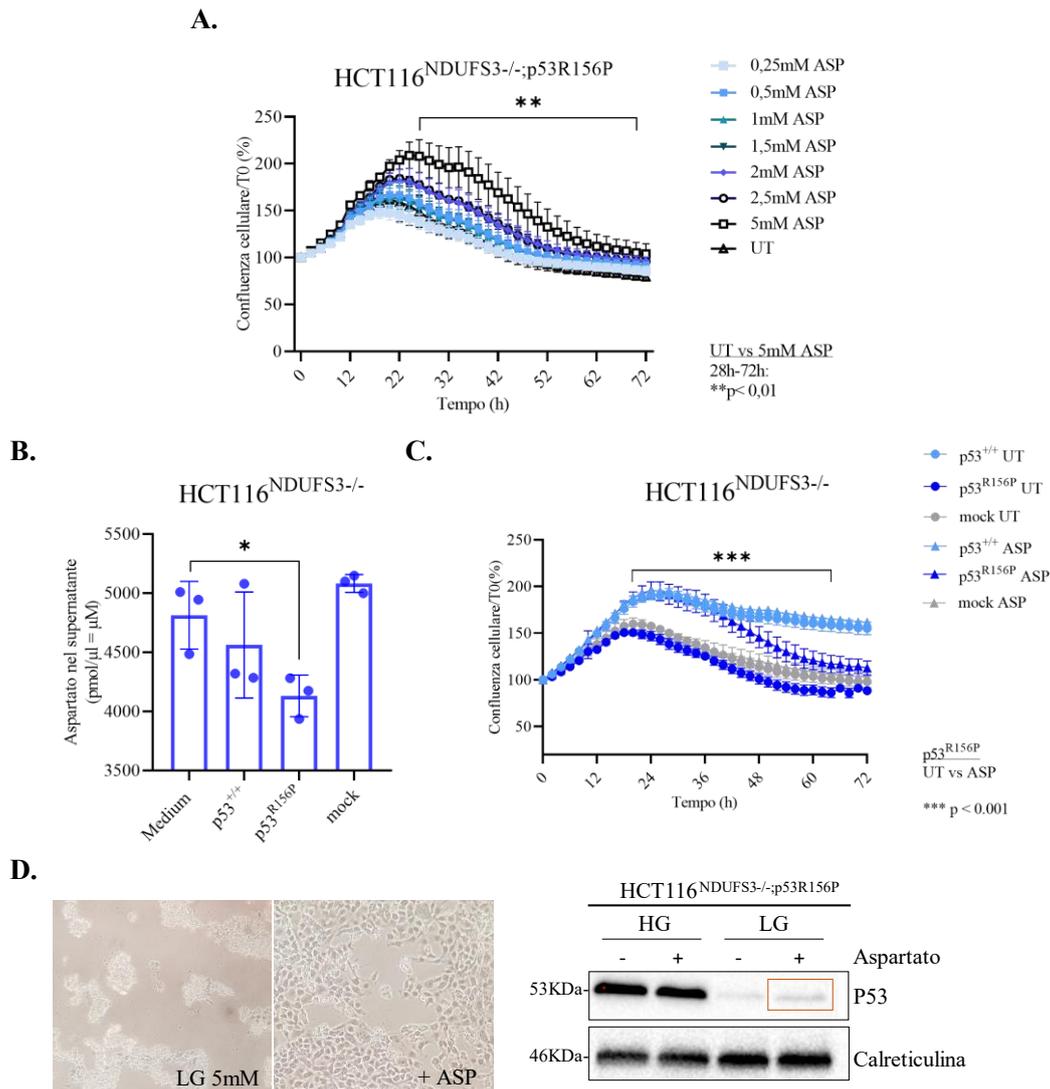


Fig. 4.23: **A.** Saggio di proliferazione in IncuCyte S3 nella linea $HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P}$ coltivata in un terreno in basso glucosio (5mM) addizionando un range di concentrazione di aspartato (0,25-5mM) per 72h. La condizione di basso glucosio è indicata nel grafico come “UT”. La normalizzazione è stata eseguita sul T0 (rappresentato come 100%). I dati sono rappresentati come media \pm SD, $n=1$ (6 replicati tecnici per ogni condizione). L’analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test (** $p<0,01$). **B.** Uptake di aspartato misurato in spettrometria di massa (HPLC) dai surnatanti delle tre linee isogeniche $HCT116^{NDUFS3^{-/-}}$ coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio addizionato con 5mM di aspartato per 24h. I dati sono rappresentati come media \pm SD, $n=3$. L’analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a variabili indipendenti (* $p<0,05$). **C.** Saggio di proliferazione in IncuCyte S3 nelle tre linee $HCT116^{NDUFS3^{-/-}}$ coltivate in un terreno in basso glucosio in presenza o meno di aspartato, addizionato al terreno alla concentrazione di 5mM per 72h. La condizione di basso glucosio è indicata nel grafico come “UT” per ogni linea cellulare. La normalizzazione è stata eseguita sul T0 (rappresentato come 100% nel grafico). I dati sono rappresentati come media \pm SEM, $n=3$. Per l’analisi statistica è stato applicato un T-test multiplo (** $p<0,001$). **D.** Analisi Western Blot dell’espressione di p53 nella linea $HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P}$ in seguito al supplemento di aspartato in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 24h. Sulla sinistra è riportata l’osservazione al MO della linea $HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P}$ in presenza o assenza di aspartato dopo 24h di trattamento.

Come atteso, il supplemento di aspartato conferisce un significativo effetto vantaggioso sulla proliferazione solo nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P}, mentre nessun cambiamento è osservato nelle controparti singeniche HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} ed HCT116^{NDUFS3-/-;mock} (Fig.4.23C), coerente con i dati ottenuti.

La conferma che la linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P} possa superare il collasso metabolico indotto dal deficit del CI e dal basso glucosio con il solo supplemento di aspartato conferirebbe come la disponibilità di tale metabolita sia cruciale per riattivare processi biosintetici. Per cui, possiamo immaginare che il cospicuo pool di aspartato nelle HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P} ripristini, come ipotizzato, la sintesi proteica. Per confermare la nostra ipotesi relativa allo stallo dell'mRNA di p53 mutato sul ribosoma, abbiamo valutato l'espressione della proteina p53 mutata in seguito al supplemento di aspartato. In Fig.4.23D è evidente il vantaggio proliferativo conferito dall'aspartato, ove le cellule assumono una morfologia quasi paragonabile a quella osservata in condizioni di coltura standard (25mM di glucosio). In termini di espressione proteica, però, il supplemento di aspartato garantisce solo un parziale recupero della proteina p53 mutata (Fig.4.23D). Il risultato può mettere in discussione l'ipotesi di partenza, ma un aspetto biologico non va trascurato nell'interpretazione del dato. I dati in spettrometria confermano un elevato ingresso di aspartato nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P}, senza fornire alcuna indicazione relativa al suo destino o alla sua velocità di metabolizzazione. L'esperimento della Fig.4.23D è stato condotto ponendo le HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P}, sia in alto (25mM) che in basso glucosio (5mM), in presenza o assenza di aspartato per 24h, tempo in cui osserviamo il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata. È possibile che un tempo così prolungato non sia idoneo per farci apprezzare differenze tra la condizione di basso glucosio e la condizione di basso glucosio addizionato con aspartato poiché l'effetto sulla sintesi proteica è precoce, visualizzabile a tempi più brevi. Un'altra spiegazione è un limite tecnico, dovuto all'utilizzo di una metodica tradizionale come il WB. È possibile che il supplemento di aspartato sia sufficiente a ripristinare la traduzione, ma quantitativamente non apprezzabile tramite WB. Per questo motivo, sarebbe interessante eseguire un esperimento con aspartato radio-marcato per valutarne in dinamica il destino e comprendere in quale ed in che percentuale arricchisce i processi di sintesi lipidica, proteica o nucleotidica. Dal campione destinato a valutare il contributo sulla sintesi

proteica, si potrebbe eseguire un IP utilizzando l'anticorpo anti-p53 per verificare se l'ingresso di aspartato equivale ad un reale e quantitativo recupero della proteina p53 mutata.

Il set sperimentale conferma la centralità dell'aspartato nel favorire la proliferazione in cellule tumorali, in particolare in condizioni di deficit mitocondriale. Inoltre, *SLC1A3* emerge come un promettente target terapeutico, la cui efficacia può variare in funzione dello stato genetico di *TP53* nei tumori. Ipotizzando di proporre una terapia adiuvante che sinergicamente inibisca il CI e la funzione del trasportatore, abbiamo condotto esperimenti *in vitro*, utilizzando un inibitore di SLC1A3, TFB-TBOA.

TFB-TBOA è un inibitore competitivo. Compete con il substrato per legarsi al sito attivo dell'enzima. L'effetto è quello di diminuire la concentrazione di enzima libero disponibile a reagire: diminuisce l'affinità dell'enzima al substrato, ma non varia la velocità massima che può essere raggiunta. TFB-TBOA è capace di inibire i due trasportatori SLC1A2 ed SLC1A3 ed è un inibitore reversibile. È un inibitore con pochissimi effetti off-target, indice di elevata specificità. L'unico limite sono le poche nozioni in letteratura sull'utilizzo del farmaco nel cancro. Infatti, TFB-TBOA ed i suoi derivati sono adatti per studiare il ruolo dei trasportatori SLC eccitatori nella regolazione della neurotrasmissione glutamatergica, nel comportamento animale e nella patogenesi dei disordini neurologici (Fu et al. 2017). Il range di concentrazione suggerito in letteratura è compreso tra i 10-50uM, sebbene tutti gli studi siano stati condotti su astrociti o porzioni dell'ippocampo isolate e non in cellule tumorali (Martinez et al. 2020; Shimamoto et al. 2004). Nonostante tale limite, come prima indicazione della sua efficacia, è stato valutato l'effetto di TFB-TBOA sulla crescita fino a 72h testando 3 diverse concentrazioni (10-20-25uM), sia in assenza che in presenza di aspartato, solo nella linea HCT116^{NDUFS3-/-:p53R156P}, unica a risentire dell'effetto significativamente vantaggioso del supplemento di aspartato (vedi Fig.4.23C). Come è possibile osservare in Fig.4.24A-B, nessun effetto di inibizione della crescita si osserva in seguito al trattamento con TFB-TBOA in presenza di aspartato (TFB-TBOA + ASP), ad entrambe le concentrazioni di inibitore testate (10-20uM), rispetto alla condizione (ASP). Inoltre, nessuna differenza significativa si osserva tra la condizione UT, che equivale ad un trattamento in basso glucosio, e la condizione TFB-TBOA (10-20uM), suggerendo che

l'inibitore non esercita un effetto citotossico sulla crescita alle concentrazioni testate. Tuttavia, il trattamento con TFB-TBOA alla concentrazione di 25 μ M, in presenza di aspartato (25 μ M TFB-TBOA + ASP), annulla notevolmente l'effetto dovuto al supplemento (ASP) (Fig.4.24C).

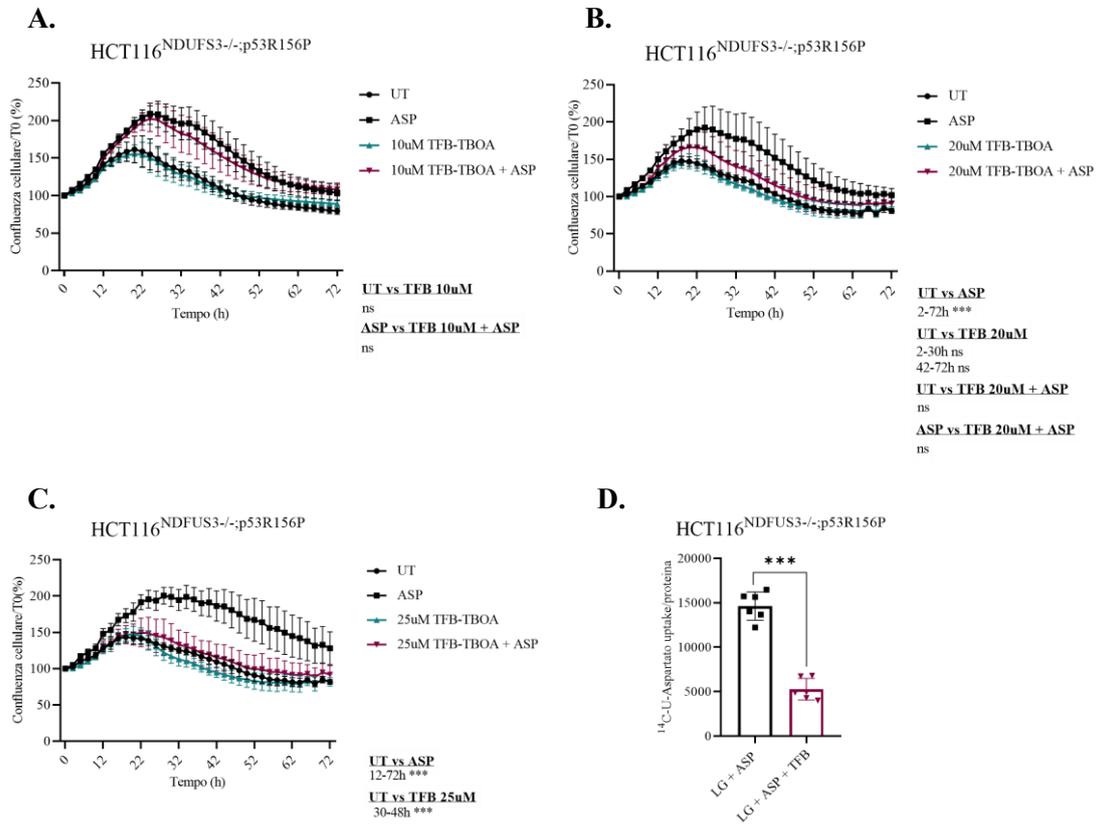


Fig.4.24: A. Saggio di proliferazione in IncuCyte S3 nella linea HCT116^{NDUF53-/-;p53R156P} coltivata in 4 diverse condizioni (UT=LG 5mM), ASP= LG 5mM + ASP 5mM, TFB-BOA= LG 5mM + 10 μ M TFB-TBOA + ASP= LG 5mM + ASP 5mM + TFB-TBOA 10 μ M) per 72h. La condizione di basso glucosio è indicata nel grafico come "UT". La normalizzazione è stata eseguita sul T0 (che corrisponde al 100%). I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=1, 6 replicati tecnici per condizione). **B e C.** Il saggio di proliferazione in IncuCyte S3 è stato eseguito come mostrato in figura A, cambiando la concentrazione di TFB-TBOA, 20 μ M e 25 μ M (n=2), rispettivamente. Per l'analisi statistica è stato applicato un T-test multiplo (***)p<0,001). **D.** Uptake di aspartato radio-marcato in ¹⁴C misurato nella linea HCT116^{NDUF53-/-;p53R156P} coltivata in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 1h ed esposta ad un "pulse" di aspartato radiomarcato per 15min. La normalizzazione è stata eseguita sul contenuto proteico globale. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=3, 2 replicati tecnici per ogni n biologico. Per l'analisi statistica è stato utilizzato un test ANOVA unidirezionale (***)p<0,001).

Inoltre, l'inibitore, in assenza di aspartato, (25 μ M TFB-TBOA) sembra esercitare un significativo effetto citotossico sulla proliferazione rispetto alla condizione di basso glucosio (UT) unicamente tra le 30-48h, che non si osserva quando le cellule sono trattate

con l'inibitore in presenza di aspartato (Fig.4.25C). Una spiegazione plausibile per giustificare l'anomalo risultato è intrinseca al meccanismo di azione competitivo di TFB-TBOA, per cui la presenza di aspartato potrebbe abbassarne leggermente la potenza farmacologica.

Infine, per validare l'efficacia funzionale dell'inibitore TFB-TBOA, abbiamo misurato i livelli di aspartato in ingresso, radio-marcando l'aspartato sul carbonio 14 (¹⁴C), sia in presenza che in assenza dell'inibitore (Fig.4.24D). TFB-TBOA inibisce significativamente l'uptake di aspartato esogeno, confermando la potenza e la specificità del composto in commercio.

Dai dati ottenuti concludiamo che lo stato genetico di *TP53* può influenzare diversamente la sensibilità delle cellule tumorali al collasso metabolico. Inoltre, l'incremento di espressione di *SLC1A3* dipendente da p53 potrebbe contrastare l'auxotrofia da aspartato tipica dei tumori *CI^{-/-}*, fornendo un promettente target per le terapie anticancro. Per cui, al termine di questo progetto di ricerca, seppur non proponendo una vera terapia adiuvante, vogliamo sottolineare l'importanza di proporre nuovi approcci terapeutici che sinergicamente mirino all'inibizione del CI e del trasportatore SLC1A3 al fine di accelerare il collasso metabolico ed eradicare il tumore. L'unico ostacolo, come anticipato, è l'effetto neurotossico che esercita TFB-TBOA, che ne limiterebbe l'utilizzo *in vivo*. Per cui, un secondo obiettivo trasversale dello studio è stimolare la sintesi di nuovi composti, mitigandone gli effetti neurotossici. Per esempio, potrebbe essere interessante la sintesi di derivati del TFB-TBOA capaci di non attraversare la barriera ematoencefalica, o l'utilizzo di approcci genetici come il silenziamento mediante RNAi o anche la creazione di sistemi "drug delivery" capaci di esplicare la loro funzione inibitoria in maniera tessuto/organo specifica, riducendo gli effetti off-target.

4.5 Investigare come *TP53* può influenzare la risposta all'ER stress

Il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata osservato nelle linee 143B^{NDUFS3-/-} in basso glucosio può dipendere da un blocco della sintesi proteica globale (vedi Fig.4.17A), esacerbato presumibilmente dall'auxotrofia da aspartato. Infatti, il deficit generale dell'ETC e/o la deprivazione di nutrienti, in particolare di amminoacidi, potrebbero attivare delle cascate di segnalazione che conducono a un rallentamento della traduzione (vedi Fig.4.16). In queste circostanze, un ruolo cruciale è svolto dal reticolo endoplasmatico (ER), un organello citoplasmatico membranoso coinvolto nei pathway secretori intracellulari. Il ER coordina il corretto ripiegamento di gran parte delle proteine intracellulari, rappresenta un'essenziale riserva fisiologica di calcio e lipidi ed infine contribuisce al metabolismo del glucosio. Per tali ragioni, l'ER è determinante nel regolare l'omeostasi intracellulare grazie alla sua capacità di percepire qualsiasi perturbazione intrinseca ed estrinseca (microambiente, temperatura, ROS, ecc.). Tali fluttuazioni instaurano una condizione di stress, nota come ER-stress, frequente in patologie neurodegenerative, cancro e diabete. In risposta all'ER-stress precoce, le cellule innescano vie di segnalazione adattative mirate a fronteggiare lo stress, che nell'insieme costituiscono UPR, attenuando la sintesi proteica, eliminando le proteine non correttamente ripiegate ed incrementando la capacità dell'ER di ripiegare le proteine; in risposta ad uno stress cronico e persistente, invece, si assiste ad una riprogrammazione della segnalazione verso l'attivazione di meccanismi di morte cellulare, tra cui apoptosi e necrosi/necroptosi (Almanza et al. 2019). Anche la disfunzione mitocondriale indotta da un danno genetico o da un'inibizione farmacologica (Cortopassi et al. 2006; Silva et al. 2009) e/o la deprivazione di nutrienti attivano l'UPR.

La carenza di glucosio, per esempio, può compromettere la N-glicosilazione delle proteine, causando l'accumulo di proteine non correttamente ripiegate ed immature a livello del ER (Zeviani and Carelli 2007)(Park et al. 2004). Per cui è plausibile che il blocco della sintesi proteica osservato nella linea 143B^{NDUFS3-/-} in basso glucosio sia conseguente all'attivazione dell'UPR. Recentemente, si è anche osservato in cellule di mammifero che varie forme di disfunzione mitocondriale, come difetti nell'OXPPOS, accumulo di ROS e di proteine non correttamente ripiegate nel mitocondrio, possono attivare un UPR interno al mitocondrio, chiamato UPR^{mt}, il quale segnala in maniera

retrograda al nucleo di indurre un'espressione genica mito-protettiva al fine di ripristinare l'omeostasi (Kenny and Germain 2017). L'interesse crescente per questa nuova forma di UPR, non associata allo stress del ER, nasce da evidenze che confermano una sua attivazione nel cancro, elevandolo come un promettente target terapeutico (Inigo, Kumar, and Chandra 2021).

L'UPR è controllato da tre sensori localizzati sulla membrana dell'ER: **IRE1** (enzima 1 richiedente inositolo), **PERK** (tirosin-chinasi attivata da RNA) ed **ATF6** (fattore di trascrizione attivante 6) e possiedono tutti un dominio luminale ed un dominio citoplasmatico (Fig.4.25A). In condizioni fisiologiche ed in assenza di stress, il dominio luminale dei tre sensori è mantenuto in uno stato inattivo grazie al legame della chaperone GRP78 (anche nota come BiP); l'accumulo di proteine mal ripiegate nel lume dell'ER, invece, induce la dissociazione di GRP78 dal dominio luminale dei tre sensori, attivando la cascata di segnalazione a valle (Fig.4.25B).

La dissociazione di GRP78 (BiP) dal dominio luminale di IRE1, ne induce una oligomerizzazione ed auto-fosforilazione che attivano il suo dominio citoplasmatico, il quale possiede sia un'attività enzimatica che RNAasica (Fig.4.25A). Recentemente, però, è stato proposto un nuovo modello di attivazione dell'UPR che prevede il legame diretto delle proteine non correttamente ripiegate al dominio luminale dei tre sensori, dimostrando che la dissociazione di GRP78 non è il determinante principale dell'induzione dell'UPR (Gardner and Walter 2011).

L'attività RNAasica di IRE1 agisce sull'mRNA del gene umano *XBPI*, causandone uno splicing alternativo di 26nt in corrispondenza di un introne, generando un'isoforma di splicing, chiamata sXBPI. La forma spliced, sXBPI, è un fattore di trascrizione con un dominio "leucine zipper", capace di traslocare nel nucleo e promuovere l'espressione di un pannello di geni coinvolti nell'UPR. La forma unspliced (uXBPI), invece, non possiede tale attività trascrizionale. L'incremento del rapporto sXBPI/uXBPI riflette l'attivazione della via di segnalazione IRE1 (Fig.4.25A). Dunque, nelle linee di osteosarcoma 143B^{NDUFS3^{-/-}} si è misurato il rapporto sXBPI/uXBPI tramite qRT-PCR, sia in alto che in basso glucosio per 48h (Fig.4.26A), tempo (LG 48h) in cui si osserva l'abbattimento della sintesi proteica globale (vedi Fig.4.17A).

Come atteso, l'attivazione significativa della segnalazione di IRE1 nella linea $143B^{NDUFS3-/-}$ in basso glucosio suggerirebbe un possibile coinvolgimento dell'UPR nell'indurre il blocco della sintesi proteica, come ipotizzato. Nessuna attivazione, invece, si osserva nella linea $143B^{NDUFS3+/+}$, anche in basso glucosio, sebbene studi in letteratura affermino che elevati livelli di sXBP1 si rilevino, particolarmente, in carenza di glucosio (Spiotto et al. 2010). In aggiunta, l'inattivazione di IRE1 nei modelli di osteosarcoma CI competenti suggerirebbe che il deficit del CI rappresenti una condizione di stress meno tollerata rispetto al basso glucosio.

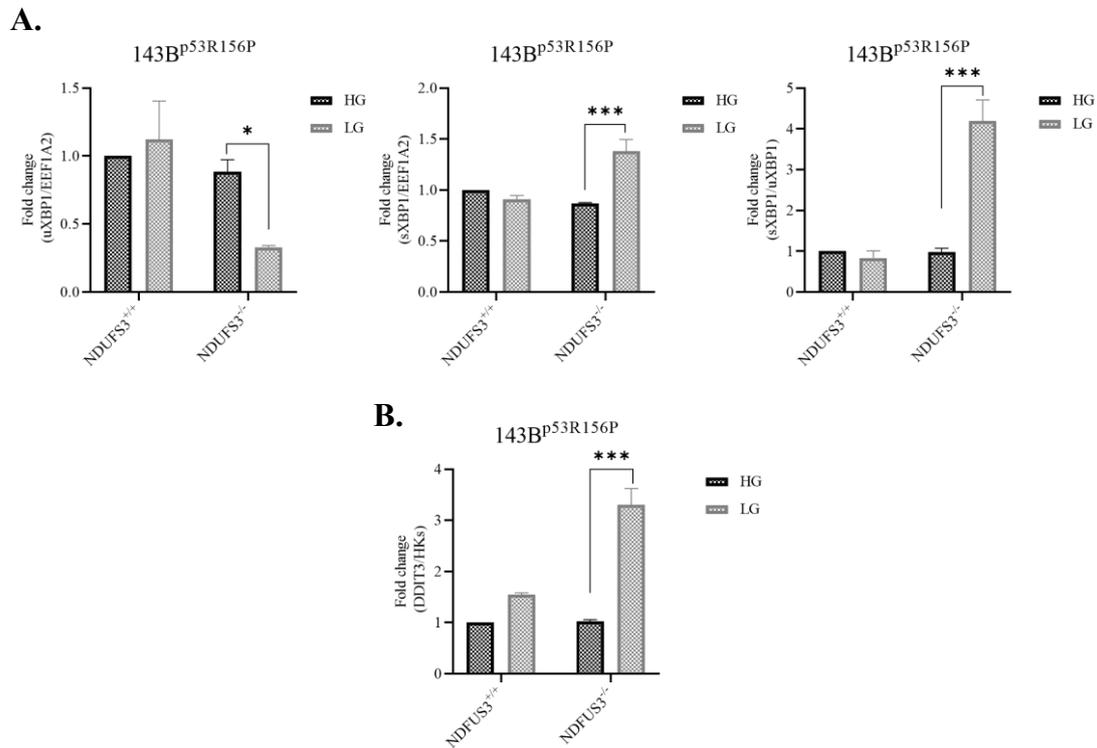


Fig.4.26: A. Misurazione dei livelli di espressione dei trascritti uXBP1 e sXBP1 tramite qRT-PCR nelle linee di osteosarcoma $143B^{NDUFS3+/+}$ e $143B^{NDUFS3-/-}$ coltivate in un terreno alla concentrazione di 25mM e 5mM di glucosio, rispettivamente, per 48h. Il rapporto sXBP1/uXBP1 è calcolato dopo aver eseguito la normalizzazione dei rispettivi trascritti su EIF2A2. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=2. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test multiplo (*p<0,05, ***p<0,001). **B.** Misurazione dei livelli di espressione di DDIT3 tramite qRT-PCR nelle linee di osteosarcoma $143B^{NDUFS3+/+}$ e $143B^{NDUFS3-/-}$ coltivate in un terreno alla concentrazione di 25mM e 5mM di glucosio, rispettivamente, per 48h. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=2. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test multiplo (**p<0,001).

Nelle stesse linee cellulari e nelle medesime condizioni di coltura, l'attivazione dell'UPR è anche confermata dal robusto incremento di espressione di *DDIT3* tramite

qRT-PCR, noto anche come CHOP, il quale è tra i regolatori principali dell'UPR (Fig.4.26B). Tali dati confermerebbero che la disfunzione mitocondriale, possibilmente accentuata dalla crescita in basso glucosio, instauri una attivazione dell'UPR, la quale potrebbe in parte contribuire al blocco della sintesi proteica globale osservato nella linea 143B^{NDUFS3-/-;p53R156P} in LG 48h (vedi Fig.4.17A).

Il deficit cronico sul CI associato ad una crescita in basso glucosio per 48h, che equivale a totale assenza di nutrienti, però, instaura una crisi metabolica che difficilmente può essere associata ad un'attivazione dell'UPR in funzione citoprotettiva. È noto, infatti, che l'attivazione di IRE1 promuove in maniera indiretta l'apoptosi, interagendo con il fattore TRAF2 ed attivando la cascata delle JNK (X. Zhu et al. 2014), la cui fosforilazione regola vari membri della famiglia BCL2 (X. Deng et al. 2001).

Anche l'incremento significativo dell'espressione di *DDIT3* osservato nella linea 143B^{NDUFS3-/-;p53R156P} in condizioni di basso glucosio, per 48h (Fig.4.26B), suggerirebbe un'attivazione dell'UPR associata a meccanismi di morte cellulare. *DDIT3*, infatti, induce l'espressione della proteina pro-apoptotica *BIM* e reprime l'espressione di *BCL2*, fattore anti-apoptotico (Puthalakath et al. 2007). A monte, l'incremento del rapporto *sXBP1/ uXBP1* e, a valle, l'aumento di espressione di *DDIT3* suggerirebbero una regolazione di *DDIT3* mediata da *sXBP1*, ma poco è documentato in letteratura relativamente a questa possibile interazione. *DDIT3*, però, è un noto target diretto di ATF4, fattore di trascrizione 4 attivato, coinvolto nella risposta UPR mediata da PERK. La dissociazione di GRP78 dal dominio luminale di PERK, induce la sua oligomerizzazione, auto-fosforilazione ed attivazione (vedi Fig.4.25A). Una volta attivato, PERK fosforila il fattore eIF2 α sul residuo di Ser51 causando un blocco della sintesi proteica, essendo regolatore di uno dei primi step di inizio della traduzione (Harding, Zhang, and Ron 1999). L'attivazione dell'UPR se da un lato conduce ad un'attenuazione della sintesi proteica globale, dall'altro stimola la traduzione preferenziale di un gruppo di mRNA, che possiedono delle ORF piccole (uORFs) in corrispondenza del 5'UTR (Harding et al. 2000), poco efficientemente tradotte in assenza di ER-stress, tra cui ATF4 (Fig.4.27A). In assenza di stress, il complesso ternario, costituito dal tRNA iniziatore-GTP e dai fattori di inizio della traduzione (eIF2), scansiona velocemente il trascritto di ATF4 a partire dall'uORF1 e a seguire l'uORF2, la

quale si sovrappone al codone di inizio di ATF4, bloccandone la traduzione; in presenza di ER-stress, invece, la fosforilazione del fattore eIF2 α , mediata da PERK, inibisce la formazione del complesso ternario, permettendo al ribosoma di scansionare lentamente il trascritto di ATF4 con un inizio della traduzione a partire dal codone corretto (Fig.4.27A).

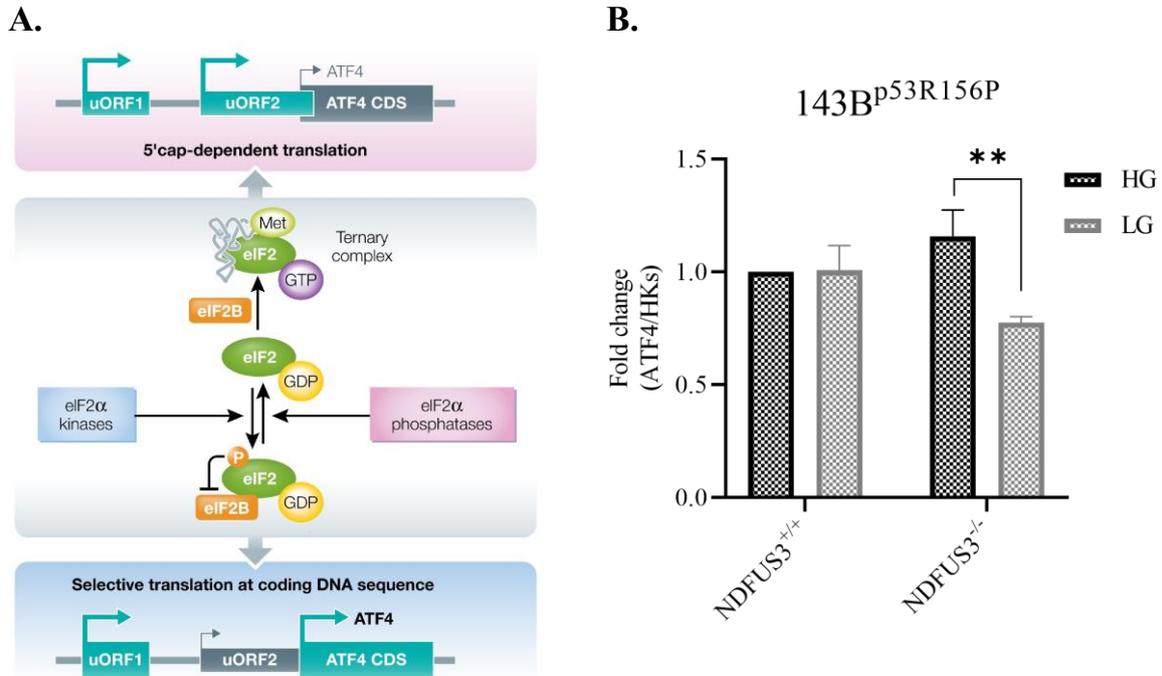


Fig.4.27: **A.** Modello di regolazione traduzionale di ATF4 mediato dal complesso ternario (Pakos-Zebrucka et al. 2016). **B.** Misurazione dei livelli di espressione di ATF4 tramite qRT-PCR nelle linee di osteosarcoma 143B^{NDUFS3+/+} e 143B^{NDUFS3-/-} coltivate in un terreno alla concentrazione di 25mM e 5mM di glucosio, rispettivamente, per 48h. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=2. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test multiplo (**p<0,01).

Come per la via di segnalazione di IRE1, in presenza di uno stress acuto, ATF4 regola l'espressione di geni coinvolti nel trasporto di amminoacidi, nel metabolismo e nel bilancio redox al fine di ripristinare l'omeostasi (Harding et al. 2003; Quirós et al. 2017). Se la perturbazione persiste, però, ATF4 modifica il pannello di espressione genica in direzione apoptotica grazie alla regolazione di *DDIT3* o del *mi-RNA29a* (Nolan et al. 2016). Alla luce di ciò, ci siamo chiesti se l'incremento di espressione di *DDIT3*, osservato nella linea 143B^{NDUFS3-/-;p53R156P} in basso glucosio, fosse associata ad un'attivazione di ATF4. Per cui, nelle linee di osteosarcoma 143B^{p53R156P}, sia NDUFS3^{-/-} ed NDUFS3^{+/+}, si è valutata l'espressione di ATF4 tramite qRT-PCR, sia in alto che in basso glucosio per 48h. Contrariamente a quanto atteso, nella linea 143B^{NDUFS3-/-;p53R156P}, coltivata in basso glucosio per 48h, si osserva una riduzione significativa dell'espressione

di ATF4, rispetto alla condizione di coltura standard (Fig.4.27B). La sola misurazione dei livelli del trascritto di ATF4, però, non è sufficiente a escludere una possibile correlazione tra ATF4-DDIT3, non avendo valutato i livelli di espressione proteica di ATF4 in queste linee. Infatti, come schematizzato in Fig.4.27A, è necessario considerare la cinetica di attivazione di ATF4 che segue un andamento opposto al processo di sintesi proteica generale (Marasco, Roussel, and Thakor 2022).

In un lavoro del 2014 dimostravano che il trattamento acuto con mixotiazolo, inibitore del Complesso III mitocondriale (CIII), induceva ATF4 ed i geni da esso regolati al fine ripristinare l'omeostasi; in seguito, ad un trattamento prolungato con mixotiazolo, invece, si osservava una soppressione di ATF4 dovuto all'attivazione di p53. Tale soppressione era causata da una riduzione della biosintesi *de novo* delle pirimidine a seguito del trattamento esteso con l'inibitore del CIII che attiva p53, antagonizzando con la funzione di ATF4. Lo stesso esperimento era stato eseguito utilizzando un inibitore del CI, pieridicina, sia a tempi precoci che prolungati, ma nessuna attivazione di p53 e soppressione di ATF4 erano osservati. Sebbene concludano che una disfunzione generale dell'ETC conduca generalmente all'innescamento di vie metaboliche adattative mediate da ATF4, le quali possono essere abrogate dall'attivazione di p53, non vi è alcun dato che dimostri che p53 regola negativamente l'espressione di ATF4 (Evstafieva et al. 2014). Ad oggi, infatti, la correlazione tra p53 e l'ER stress rimane una questione aperta e poco chiara.

Per investigare se e come lo stato di p53 possa influenzare la risposta all'UPR, ho approfondito lo studio durante il mio periodo all'estero presso l'Istituto di Investigazione Biomedica Bellvitge (IDIBELL), con sede a Barcellona, sotto la supervisione della Dott.ssa Cristina Munoz Pinedo. Basandoci sui dati ottenuti, abbiamo esaminato la possibile attivazione dell'UPR nei modelli isogenici HCT116^{NDUFS3-/-} (p53^{+/+}, p53^{R156P} e mock) misurando l'attivazione di PERK, con particolare attenzione sull'induzione di ATF4. Per riprodurre una condizione di stress acuto e cronico, le tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-} sono state coltivate sia in un terreno di coltura standard (HG) che in basso glucosio (LG) a due differenti tempi, 3h e 18h, rispettivamente. Dopo 3h di trattamento in basso glucosio non si osservano differenze in proliferazione tra le tre linee isogeniche HCT116^{NSDUF3-/-} (vedi Fig.4.19A), selezionando 3h come una condizione di

stress precoce; al contrario, invece, una riduzione significativa della crescita si osserva già a partire dalle 18h nelle linee HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156P} e HCT116^{NDUFS3-/-;mock} rispetto alla controparte singenica HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+}, selezionando 18h come una condizione di stress persistente, che possibilmente commissiona la cellula a meccanismi di morte cellulare (vedi Fig.4.19A).

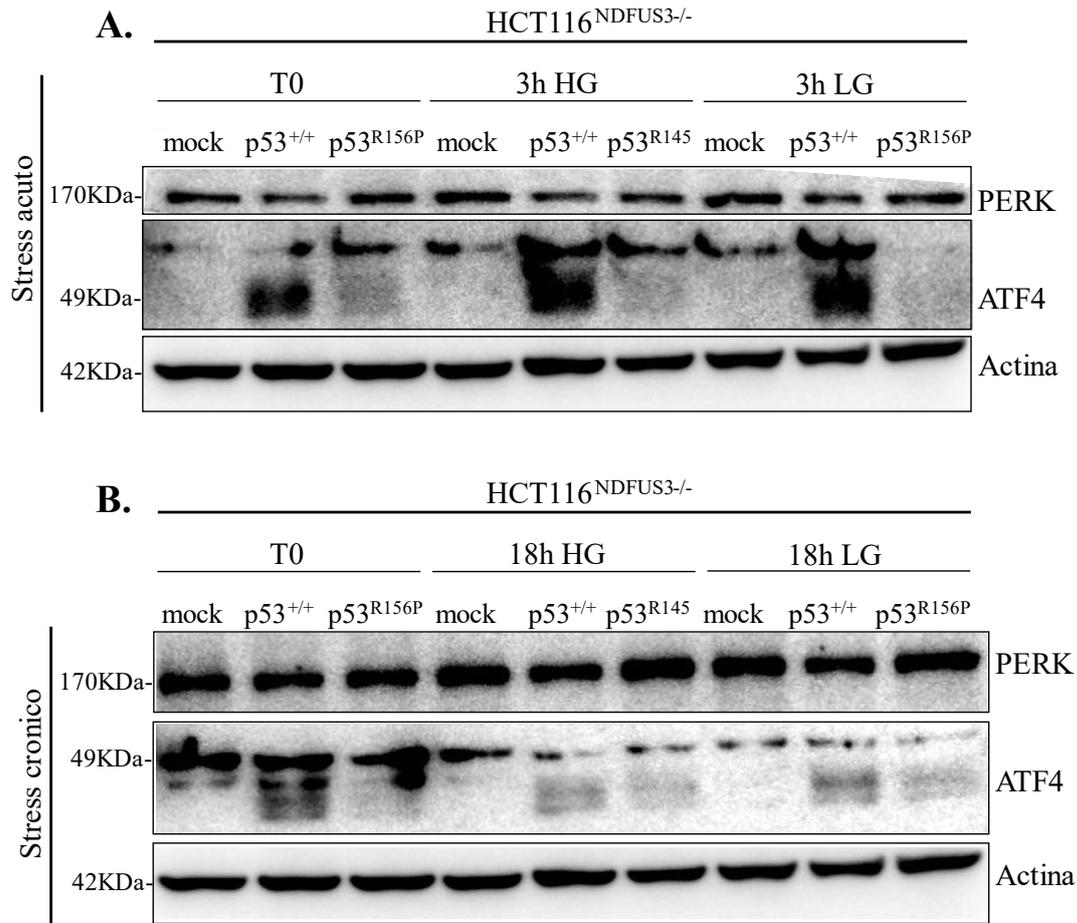


Fig.4.28: A-B. Analisi Western Blot della segnalazione PERK/ATF4 coinvolta nella risposta all'ER-stress nelle tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-} coltivate in un terreno alla concentrazione di 25 e 5mM di glucosio a due diversi tempi (3h e 18h), n=2.

Come è possibile osservare dall'analisi Western Blot (Fig.4.28A), una forte induzione di ATF4 è visibile unicamente nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+} già a partire dalle 3h, indipendentemente dalla concentrazione di glucosio nel terreno, suggerendo un ruolo citoprotettivo da essa svolto, che, in parte, potrebbe spiegare la loro peculiare resistenza al collasso metabolico. ATF4, infatti, è tra gli effettori principali dell'UPR,

regolando a livello trascrizionale geni coinvolti nell'adattamento allo stress. In particolare, in carenza da amminoacidi, ATF4 promuove l'espressione di numerosi geni coinvolti nell'autofagia, tra cui *Atg3*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg10*, *Atg12*, *Atg16* ecc. (B'Chir et al. 2013). Infatti, un'intensa stimolazione del flusso autofagico fornisce un pool di amminoacidi liberi essenziale per promuovere i processi biosintetici e favorire la crescita cellulare (Lum et al. 2005).

In un lavoro del 2018, dimostrano che le linee HCT116, deficitarie del macchinario autofagico a causa del knock-out per i geni *Atg3* ed *Atg7*, resistono alla carenza di glutammina grazie all'espressione di ATF4 che, a sua volta, induce l'espressione di alcuni trasportatori appartenenti alla famiglia SCL, tra cui *SLC6A9*, *SLC7A5*, *SLC7A1* ecc, favorendo l'uptake esogeno di amminoacidi (N. Zhang et al. 2018). In aggiunta, ATF4 supporta la biosintesi di asparagina, favorendo l'espressione di *ASNS*, e di serina, regolando l'espressione dei geni *PSPH*, *PSAT1*, *PHGDH* (N. Zhang et al. 2018). Per cui l'induzione precoce di ATF4 osservata nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} potrebbe compensare la carenza di amminoacidi o stimolare l'autofagia come meccanismo di sopravvivenza. Inoltre, la forte induzione di ATF4 osservata al T0, principalmente nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}}, suggerirebbe che le cellule si siano adattate al deficit genetico indotto sul CI.

In realtà, l'esposizione ad uno stress prolungato, induce una lieve attivazione di ATF4 anche nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P} in presenza di una concentrazione di glucosio pari sia a 25 che 5mM (Fig.4.28B). Come anticipato, però, un'attivazione dell'UPR prolungata può indurre meccanismi di morte cellulare mediante l'asse eIF2 α /ATF4, sottolineando un ruolo duale svolto da ATF4 nell'UPR (Nolan et al. 2016). Infatti, in condizioni di deprivazione da glucosio, ATF4 partecipa all'induzione dell'apoptosi nelle linee HEK293 (Shin et al. 2015).

La regolazione positiva di ATF4 sull'apoptosi è indiretta grazie all'espressione di *DDIT3*, tra i primi target di ATF4. *DDIT3* regola l'espressione di fattori pro-apoptotici, tra cui *BIM* (Puthalakath et al. 2007) e l'interazione con ATF4 incrementa l'espressione di altri geni pro-apoptotici tra cui *TRAIL-R1/DR4* e *TRAIL-R2/DR5* che promuovono una apoptosi estrinseca in condizioni di deprivazione di glucosio persistente (Iurlaro et

al. 2017), (Fig.4.29). Dunque, il coinvolgimento di ATF4 nei meccanismi di morte cellulare in presenza di uno stress cronico, suggerirebbe che l'induzione di ATF4 osservata nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53R156} in basso glucosio a 18h sia in direzione pro-apoptotica. Non si osserva, invece, un'attivazione di ATF4 nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;mock}, suggerendo una possibile correlazione tra lo stato genetico di p53 e l'induzione di ATF4. Infine, analizzando la Fig.4.28A-B, l'attivazione di ATF4 non sembra dipendere da PERK, attivato tramite fosforilazione. La modifica post-traduzionale rallenta la separazione di PERK lungo il gel di acrilammide, la cui attivazione è riconoscibile dalla presenza di una banda a più alto peso molecolare in WB tradizionale. A riguardo, è noto in letteratura che PERK non è l'unica chinasi capace di fosforilare il fattore eIF2 α , contribuendo all'induzione di ATF4.

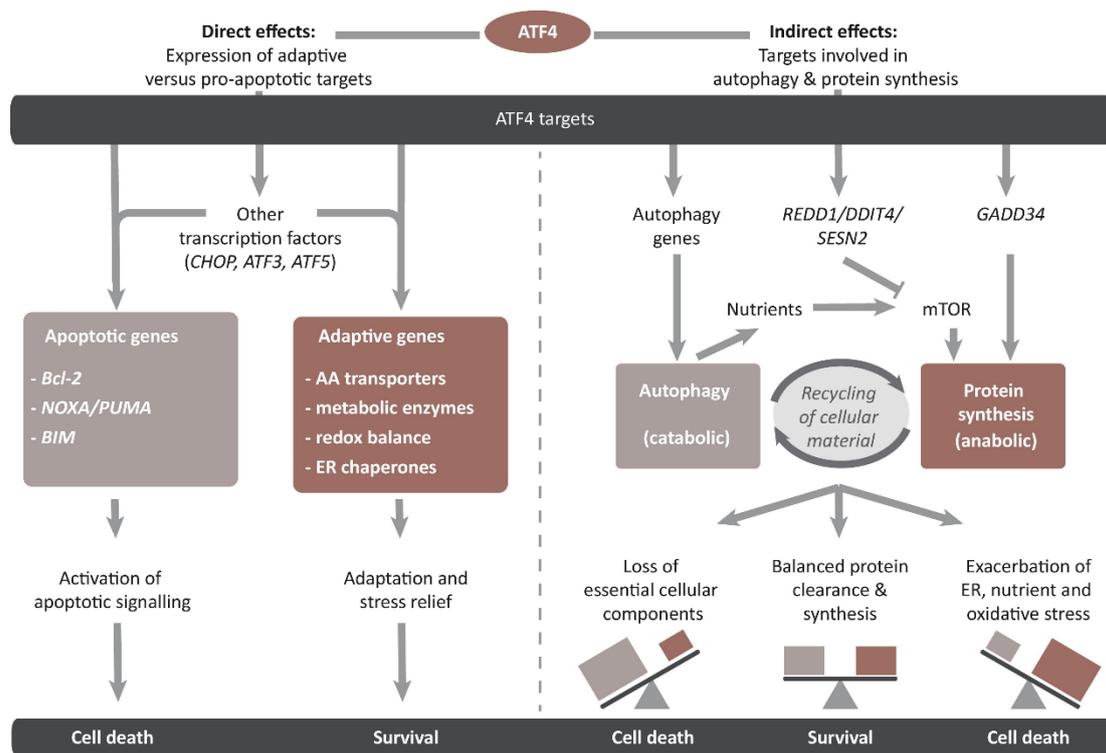


Fig.4.29: Illustrazione schematica degli effetti diretti ed indiretti sul destino cellulare mediati da ATF4 (Wortel et al. 2017).

In condizioni di deprivazione da amminoacidi o nutrienti, la fosforilazione di eIF2 α nel residuo di Ser51 può essere mediata da un'altra importante chinasi, chiamata

GCN2 (Ye et al. 2010). Due rilevanti eventi molecolari susseguono l'auxotrofia da amminoacidi, ovvero un accumulo di tRNA scarichi ed uno stallo ribosomiale, condizioni che sembrano influenzare l'attivazione di GCN2 e che ipotizziamo realizzarsi nei nostri modelli con un deficit indotto sul CI. In un lavoro del 2019, Inglis e colleghi propongono un nuovo modello di attivazione di GCN2. In condizioni fisiologiche, GCN2 interagisce con un complesso di proteine ribosomiali, chiamato P-STALK, localizzato a livello della subunità 60S del ribosoma, mantenendosi in uno stato inattivo. In carenza di amminoacidi, invece, l'interazione di GCN2 sia con i tRNA scarichi che con le componenti del P-STALK, induce un cambiamento conformazionale che attiva GCN2, avvicinandola in prossimità di eIF2 α , fosforilandola ed attivando la risposta allo stress integrato (ISR), che vede come primo effetto l'induzione di ATF4 (Inglis et al. 2019) (Fig.4.30). Tale dato suggerirebbe che l'attivazione di ATF4 (vedi 4.28A-B) pu \ddot{o} dipendere da GCN2, aspetto che ci riserviamo di investigare.

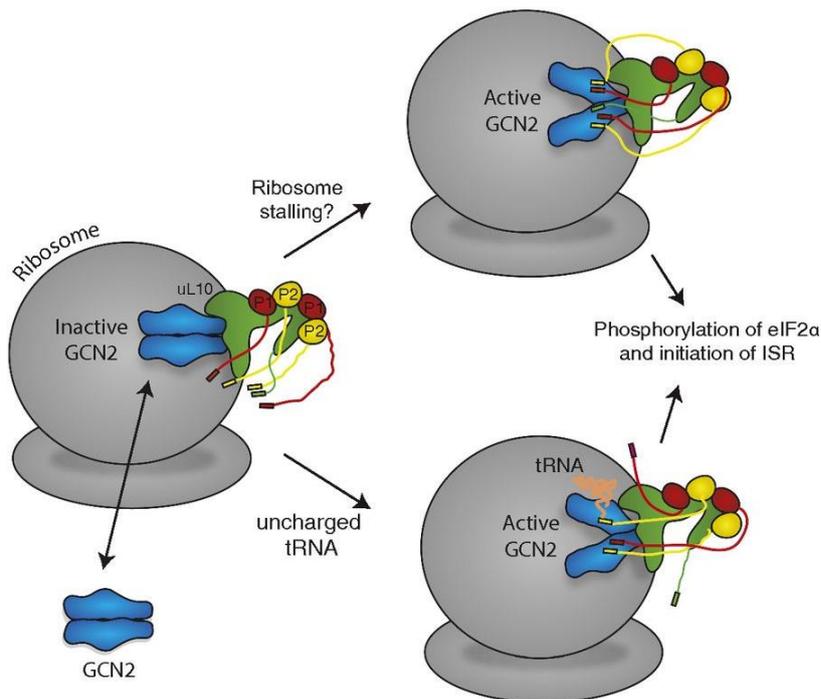


Fig.4.30: Illustrazione schematica del modello di attivazione di GCN2 (Inglis et al. 2019).

Indipendentemente da chi regola a monte ATF4, il nostro obiettivo è stato comprendere se esista una correlazione tra l'induzione di ATF4 e lo stato di p53. Nei modelli isogenici, all'auxotrofia da aspartato, causata dal deficit genetico sul CI, segue

anche l'auxotrofia da asparagina, metabolita essenziale per la proliferazione (Krall et al. 2016). In queste circostanze, però, la deplezione di asparagina potrebbe essere compensata dall'induzione precoce di ATF4, osservata nella linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+}, la quale potrebbe condurre ad un aumento dei livelli di espressione del noto target *ASNS* come meccanismo adattativo. Il gene *ASNS* codifica per l'enzima asparagina sintetasi, convertendo aspartato e glutammina in asparagina e glutammato. Ciò presupporrebbe che, seppur in presenza di un deficit sul CI, i livelli di aspartato intracellulari nella linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} siano maggiori rispetto alle controparti singeniche HCT116^{NDUFS3-/-; p53R156} e HCT116^{NDUFS3-/-; mock}. Infatti, sebbene l'incremento di espressione di SLC1A3 non sembri la strategia adottata dalla linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} (vedi Fig.4.22B) per compensare l'auxotrofia da aspartato, la loro maggiore resistenza al collasso metabolico (vedi Fig.4.19A) potrebbe dipendere o dall'innescio di altre vie metaboliche adattative o dalla possibilità di sostenere sintesi *de novo* di aspartato a partire dall'ossalacetato, grazie ad un metabolismo pro-ossidativo p53 dipendente (Matoba et al. 2006).

Per valutare ciò, sono stati misurati i livelli di aspartato intracellulare tra le tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-} in basso glucosio. I livelli di aspartato nella linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} non risultano significativamente più alti rispetto alle controparti singeniche HCT116^{NDUFS3-/-; p53R156P} e HCT116^{NDUFS3-/-; mock} (Fig.4.31A). Nell'interpretazione di tale risultato negativo, non possiamo trascurare la cinetica dei flussi intracellulari, ove ogni metabolita/amminoacido viene rapidamente processato ed indirizzato a specifiche vie biosintetiche. Per rispondere al quesito biologico, si potrebbero misurare i livelli di aspartato in dinamico e seguirne il destino intracellulare, in particolare nella linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+}, la quale dovrebbe velocemente metabolizzarlo per sostenere tutti i processi biosintetici e rallentare il collasso metabolico, aspetto che ci proponiamo di investigare.

Supponendo che sia questa la ragione del dato negativo, abbiamo misurato i livelli di asparagina intracellulare in carenza di glucosio, come parametro indiretto per supportare la nostra ipotesi. Di fatti, i livelli di asparagina sono significativamente più alti nella linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} rispetto alle controparti singeniche (Fig.4.31B).

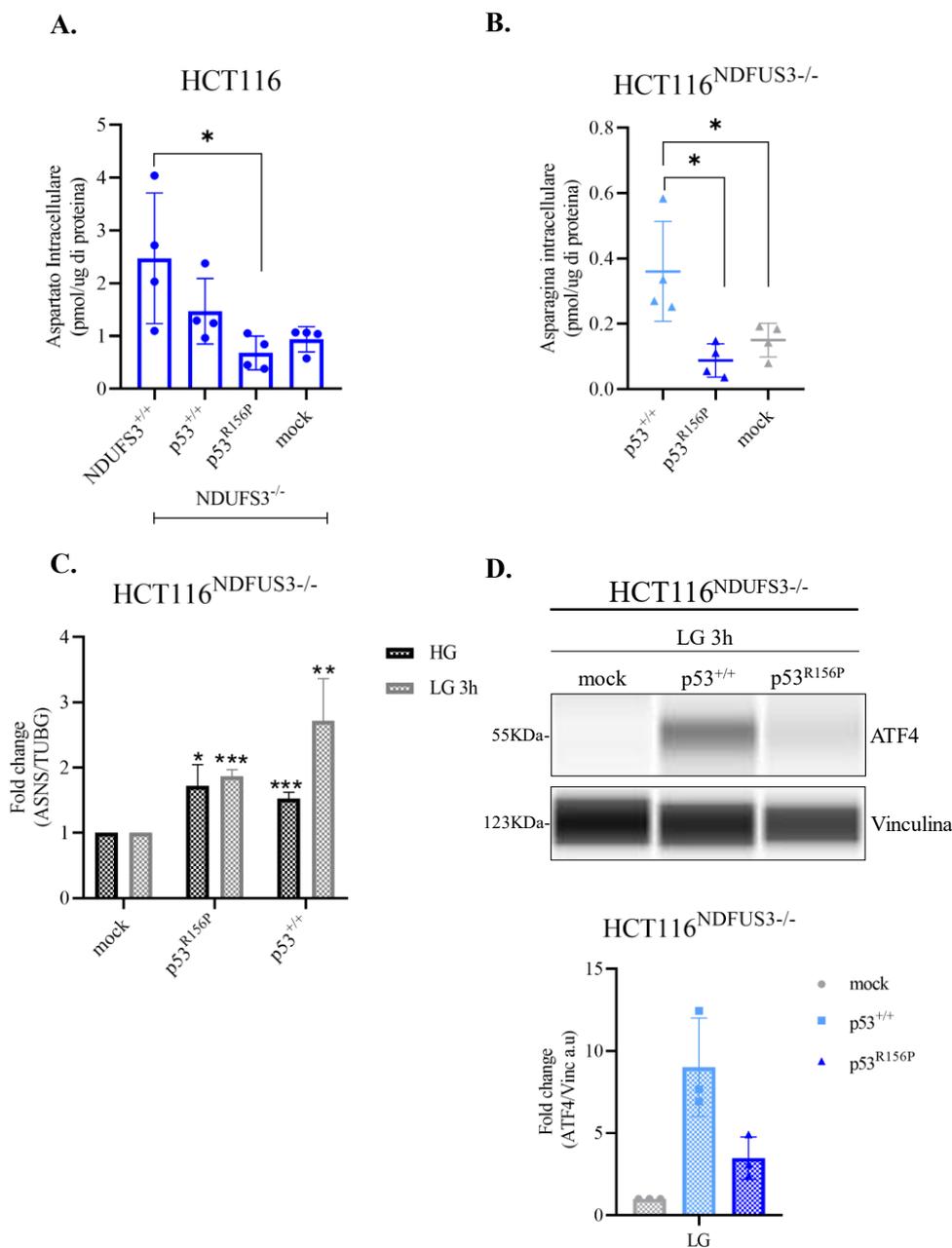


Fig.4.31: **A.** Misura dei livelli aspartato intracellulare in spettrometria di massa (HPLC) nella linea isogenica HCT116^{NDUFS3^{+/+};p53^{R156P}} (che rappresenta il controllo CI-competente) e nelle tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}} coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 30 min. I dati sono rappresentati come media \pm SD [NDUFS3^{+/+} (n=4) e NDUFS3^{-/-} (n=4) per tutte e tre le linee]. La normalizzazione è stata eseguita sul contenuto proteico totale (pmol/ μ g). L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (*p<0,05). **B.** Misura dei livelli asparagina intracellulare in spettrometria di massa (HPLC) nelle tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}} coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 30 min. I dati sono rappresentati come media \pm SD [NDUFS3^{-/-} (n=4) per tutte e tre le linee]. La normalizzazione è stata eseguita sul contenuto proteico totale (pmol/ μ g). L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (*p<0,05). **C.** Valutazione dei livelli di espressione di ASNS nelle tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}} coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 3h. I dati sono rappresentati come media

$\pm SD$, $n=1$ (in triplicato tecnico per ciascuna condizione). L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). **D.** Valutazione dei livelli di espressione proteica di ATF4 sfruttando il sistema di elettroforesi capillare (WES) nelle tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}} coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 3h. I valori densitometrici per ogni singola proteina sono stati ottenuti in automatico dallo strumento WES. I dati sono rappresentati come media $\pm SD$, $n=3$.

Per avvalorare la nostra ipotesi, abbiamo misurato l'effetto del basso glucosio sull'espressione di ASNS tramite qRT-PCR nelle tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}} (Fig.4.32C), scegliendo il tempo (3h) ove osserviamo la forte induzione di ATF4 nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} (Fig.4.31D). L'analisi qRT-PCR mostra un incremento di espressione significativo di ASNS sia nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} che HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{R156P}} già a partire dal T0.

Questo risultato confermerebbe il dato in proteina (vedi Fig.4.28A-B) per la linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}}, ma non per la controparte singenica p53^{R156P} in cui osserviamo solo una lieve induzione di ATF4 in proteina al T0 (vedi Fig.4.28A-B). Un aumento di espressione significativo di ASNS si osserva anche dopo il trattamento acuto in basso glucosio per 3h sia nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} che HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{R156P}} rispetto alla controparte singenica HCT116^{NDUFS3^{-/-}; mock}, che rappresenta il controllo dell'esperimento.

Il dato ottenuto suggerirebbe che l'induzione di ATF4 osservata in presenza di uno stress acuto (Fig.4.31D) sia citoprotettiva nella linea p53^{+/+}, promuovendo l'espressione di ASNS.

L'incremento di espressione di ASNS, però, anche nel mutante p.R156P, non correla con una forte induzione di ATF4 in basso glucosio, confermando gli studi in letteratura che affermano una regolazione traduzionale complessa di ATF4 (Marasco, Roussel, and Thakor 2022). In conclusione, i dati ottenuti andrebbero a confermare che l'attivazione dell'asse ATF4-ASNS potrebbe essere una delle strategie adattative attraverso cui la linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} rallenta il collasso metabolico indotto dal deficit del CI e dal basso glucosio.

Gene: ATF4 ENSG00000128272

```
39913320 AAGATGACAGTATTTTTCTTTACATGCTTGGTTATGACTTTTAAAGTTTTATTTAAATAA 39913379
39913380 ATGTTGAAGCTCAAGTTTAAAGAAGCGTTGCAGAGGCCACGGTCTCCTGGGTCCCGGCC 39913439
39913440 ACCTGTCCATATTCCACATTTGCTGACTGTGCTCCCTGCACCTCCACTCAAGTTGAGAGTT 39913499
39913500 CAAATAGTCTTGAAGGGGAATCAGCTTCAGGATGGAAGGACCCAGGAGAGGCCCGAGGT 39913559
39913560 GGGAGGGTTCTGTAATAACAGACTACTGCGAGTGTCCAGAGCTCTCTGCCATGATACTTC 39913619
39913620 CTTGGGACTGACTTGGCTGAGAACGTGTTCTGTCCAGAGGATTTGTTAGAACTCTGCCCTT 39913679
39913680 TTGTCTGAAACTCAAGGCCAAGGAGAATGATAGGAGACTTAGGACAGAGCTGACCCCTTGC 39913739
39913740 ACCAGGCTGGGAGGCTGCAGCCCTTTTAGATGCCACTTACTGTAAGTGCCAGAATACCA 39913799
39913800 GAGAGTGGGTCCATGGTCAAATGCACAGTAGGTGTTTACCTTTACATTTGGATCACCT 39913859
39913860 TGTAGTCTTTAAATTCCTGGTCCCTGAGGCCAAGTCCACAACCTTGCCTTCTAGTCACTTG 39913919
39913920 CCTGCCCGCAGTGGTGGTGGATGTGTTAGCTGGTAGATTGGAATCAGTCACCACTCTTT 39913979
39913980 CTGTACTGTCTTGGTTAGCTCTATATAAGTAGGGGAGCTTAGCCCTGAGGCCAGAGAC 39914039
39914040 CTGCTGTCTTTTTCTCCTTGGGGAGGAAATAAACTGCGGAATACAATGTCCTTCCAT 39914099
39914100 AGCATGGGAAGAAAGAAATAAACATCTCCTTTCCAACAGCTGTGACTTGTGTGTCGTA 39914159
39914160 TAGAACATTTTCTGTGGGAGTGGTACTGGGTCTCCATTTTCAGCTAGGGGAACCTTTGA 39914219
39914220 AGTGTGAGTGTCTCTATAAAGAATGGATGGGACAGGCTGCCATGGGAGTCATTC 39914279
39914280 TTTTATGACCTTTTCAGTGTCAAATTTGGGCAGTGTACTTTAATACTCAACCATTTGC 39914339
39914340 ACAGTCATCTGTCCAGGAGTACTGTCTATAGCAAAGGAGAACACGCTCCTGTGGGTCCCT 39914399
39914400 AGTTCTGCCTTTGGAAGACATGGCTAATGGCTCAGGTATTCTTACTGCCTTTGCATGGAA 39914459 fi
```

Fig.4.32: Mappatura della RE-p53 identificata sul promotore del gene ATF4 usando il tool p53 FamTaG v.1.

Le differenze nell'induzione di ATF4 in funzione dello stato di p53 suggerirebbero una possibile regolazione diretta di p53 su ATF4. Pertanto, sfruttando il tool p53 FamTaG v.1 siamo riusciti a predire un elemento responsivo di p53 (p53-RE) sul promotore di ATF4, supportando l'ipotesi per cui p53 può regolare *ATF4* a livello trascrizionale. La RE identificata è localizzata sul cromosoma 22 a monte del gene ATF4, posizione 39913872-39913908 (Fig.4.32). L'identificazione di una p53-RE sul promotore di *ATF4* suggerirebbe che possa essere un target diretto di p53. Sebbene siano necessari ulteriori esperimenti per consolidare la nostra ipotesi, i risultati ottenuti dimostrerebbero, per la prima volta, una regolazione diretta p53-ATF4, sottolineando un importante ruolo svolto da p53 nel mediare la risposta all'ER-stress.

In un recente lavoro, dimostrano come l'inibizione farmacologica acuta sul CI, inneschi delle risposte adattive mediante l'attivazione di ATF4 e l'inibizione della via di segnalazione di mTORC1 per garantire la sopravvivenza e la crescita, che però il solo supplemento di asparagina è capace di ripristinare (Krall et al. 2021).

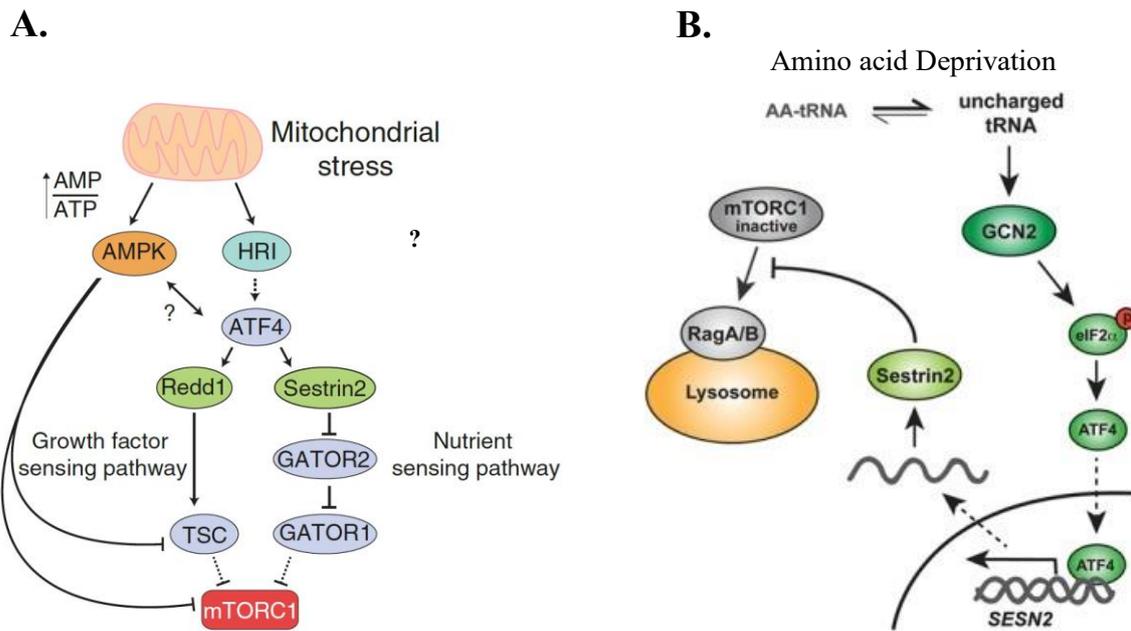


Fig.4.33: **A.** Modello di inibizione di mTORC1 in seguito ad un deficit mitocondriale (Condon et al. 2021). **B.** Modello di inibizione di mTORC1 in seguito alla deprivazione da amminoacidi (Ye et al. 2015).

In parallelo, in un recente lavoro dimostrano che una disfunzione mitocondriale precoce, che causa uno sbilanciamento del rapporto AMP/ATP, può indurre l'attivazione di due note chinasi, AMPK e HR1. HR1 attiva ATF4, il quale regola direttamente *Sestrin 2* e *Redd1*, conducendo a valle all'inibizione di mTORC1 (Condon et al. 2021) (Fig.4.33A). Infatti, la sestrina 2 è un regolatore negativo di due cruciali attivatori di mTORC1, le Rag-GTPasi e RAPTOR. Tuttavia, anche in presenza di uno stress persistente, dovuto alla carenza di amminoacidi, l'asse GCN2-ATF4 può inibire mTORC1, inducendo l'espressione trascrizionale di *Sestrin 2* (Ye et al. 2015) (Fig.4.33B). È chiaro che è essenziale conoscere la tolleranza allo stress, che può variare analizzando linee tumorali diverse, per comprendere al meglio se la complessa interazione tra le vie di segnalazione che coinvolgono ATF4 è citoprotettiva o indirizza verso la morte cellulare. Inoltre, anche p53 regola direttamente *Sestrin 2* (W. Deng et al. 2016), sottolineando una possibile azione sinergizzante sia con l'asse AMPK/ATF4 che GCN2/ATF4 nell'inibire mTORC1.

Insieme i lavori di Condon et al. 2021 Krall et al. 2016 e Ye et al. 2015 uniscono i pezzi di un puzzle incompleto, ma su cui la comunità scientifica sta ponendo grande

interesse. Nell'intento di proporre un modello, potremmo speculare che nei modelli isogenici HCT116^{NDUFS3-/-}, l'attivazione di AMPK, conseguente all'incremento del rapporto AMP/ATP, può fosforilare p53 sul residuo di Ser15 (Jones et al. 2005), attivandola. Una volta attiva, p53 potrebbe promuovere sia l'espressione di ATF4 che di Sestrina 2, ma il fine dipenderà dalla durata e dall'esposizione allo stress. In quest'ottica, la presenza di p53 wild-type potrebbe contribuire all'adattamento metabolico (Fig.4.34). In condizioni di stress cronico, come già discusso, ATF4 riprogramma l'espressione genica verso l'attivazione di meccanismi di morte cellulare, tra cui geni pro-apoptotici. Nel lavoro discusso nel paragrafo 1.1 (Elgendy et al.; 2019), l'associazione ipoglicemia e metformina conduce le cellule tumorali ad un collasso metabolico ed apoptosi grazie alla modulazione della via PP2A-GSK3β-MCL1. La glicogeno sintetasi chinasi 3 beta (GSK3β) regola una cascata apoptotica.

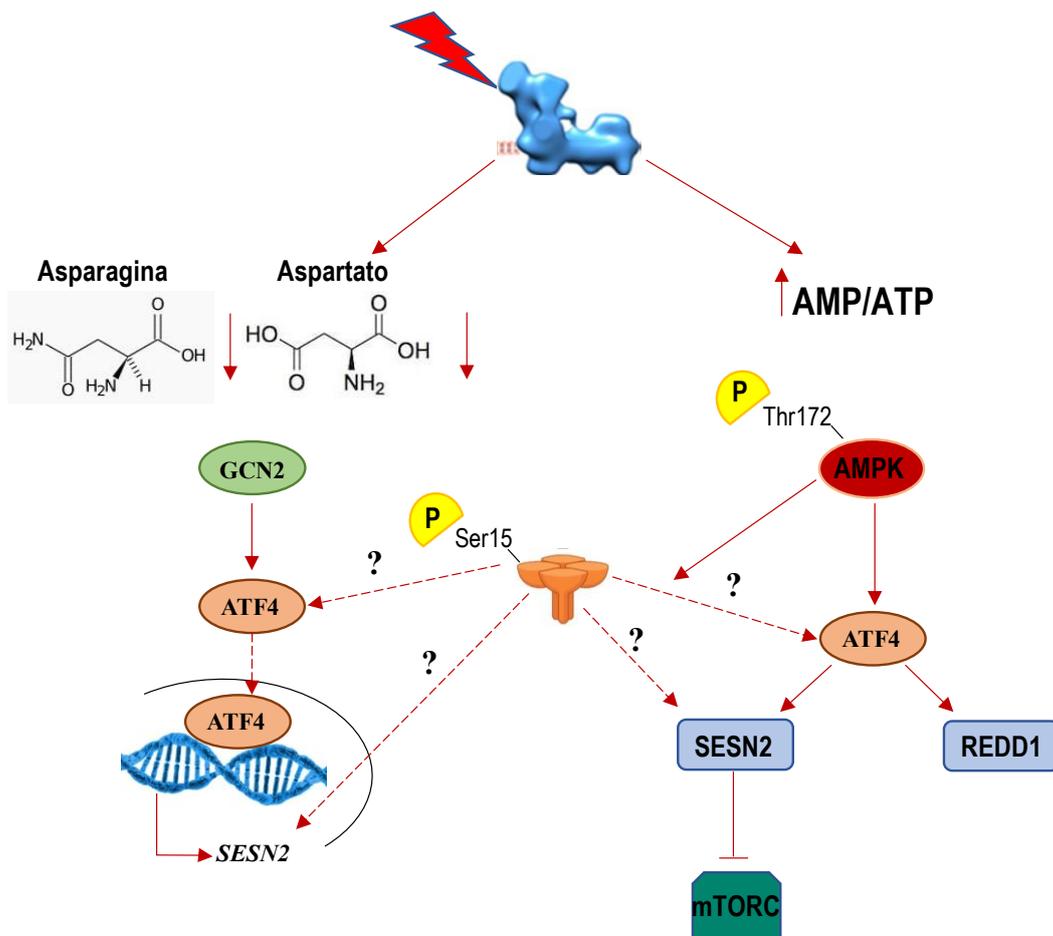


Fig.4.34: Rappresentazione schematica di una delle possibili vie di adattamento mediate da p53 in seguito al deficit del CI.

Tale trattamento sinergico potrebbe mimare le condizioni di stress energetico e nutrizionale (ablazione del CI e basso glucosio) che riproduciamo nei modelli isogenici HCT116^{NDUFS3^{-/-}} *in vitro*. Infatti, come mostrato in Fig.4.35A, una forte attivazione della GSK3 β si osserva nelle linee HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156} e HCT116^{NDUFS3^{-/-};mock} in basso glucosio rispetto alla controparte singenica HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}}, in cui si mantiene in uno stato inattivo. Sebbene nel lavoro di Elgendy il ruolo di p53 non sia sviscerato, GSK3 β potrebbe agire sia da regolatore positivo che negativo di p53 (Watcharasit et al. 2003).

Per comprendere a che tipo di morte cellulare vanno incontro, le tre linee isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}} sono coltivate in un terreno di coltura standard (HG), che rappresenta il controllo interno dell'esperimento, ed in basso glucosio per 24h, condizione in cui osserviamo una significativa inibizione della crescita nelle linee HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156} e HCT116^{NDUFS3^{-/-};mock} ed un lieve rallentamento nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}}. Inoltre, per identificare in maniera indiretta il meccanismo di morte cellulare coinvolto, le medesime linee cellulari sono state trattate in basso glucosio con un noto inibitore delle caspasi, QVD, alla concentrazione di 20uM, ed un inibitore della ferroptosi, Ferrostatina 1, alla concentrazione di 10uM (Fer1), per 24h. Nelle 3 linee cellulari e nelle quattro condizioni di trattamento descritte è stata misurata quantitativamente la morte cellulare sfruttando la colorazione con lo ioduro di propidio (PI) e la lettura tramite FACS. QVD è in grado di inibire tre delle più note vie apoptotiche, caspasi9/3, caspasi 8/10 e caspasi 12, non è tossico ed è altamente specifico; Fer1, invece, è un inibitore potente e selettivo che sopprime la ferroptosi mediata da Erastina.

L'analisi in cito-fluorimetria in Fig.4.35B mostra una tendenza, non significativa, di riduzione della positività al PI nelle linee HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} in seguito al trattamento con QVD, ma nessuna ripristino della vitalità in seguito al trattamento con Fer1. Ciò suggerirebbe, almeno in questa linea cellulare, che l'apoptosi predomini come meccanismo di morte cellulare. Nessuna riduzione della percentuale di positività al PI, invece, è osservata nelle due linee isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156} e HCT116^{NDUFS3^{-/-};mock} dopo trattamento con entrambi gli inibitori, impedendo di identificare un preciso meccanismo di morte cellulare coinvolto.

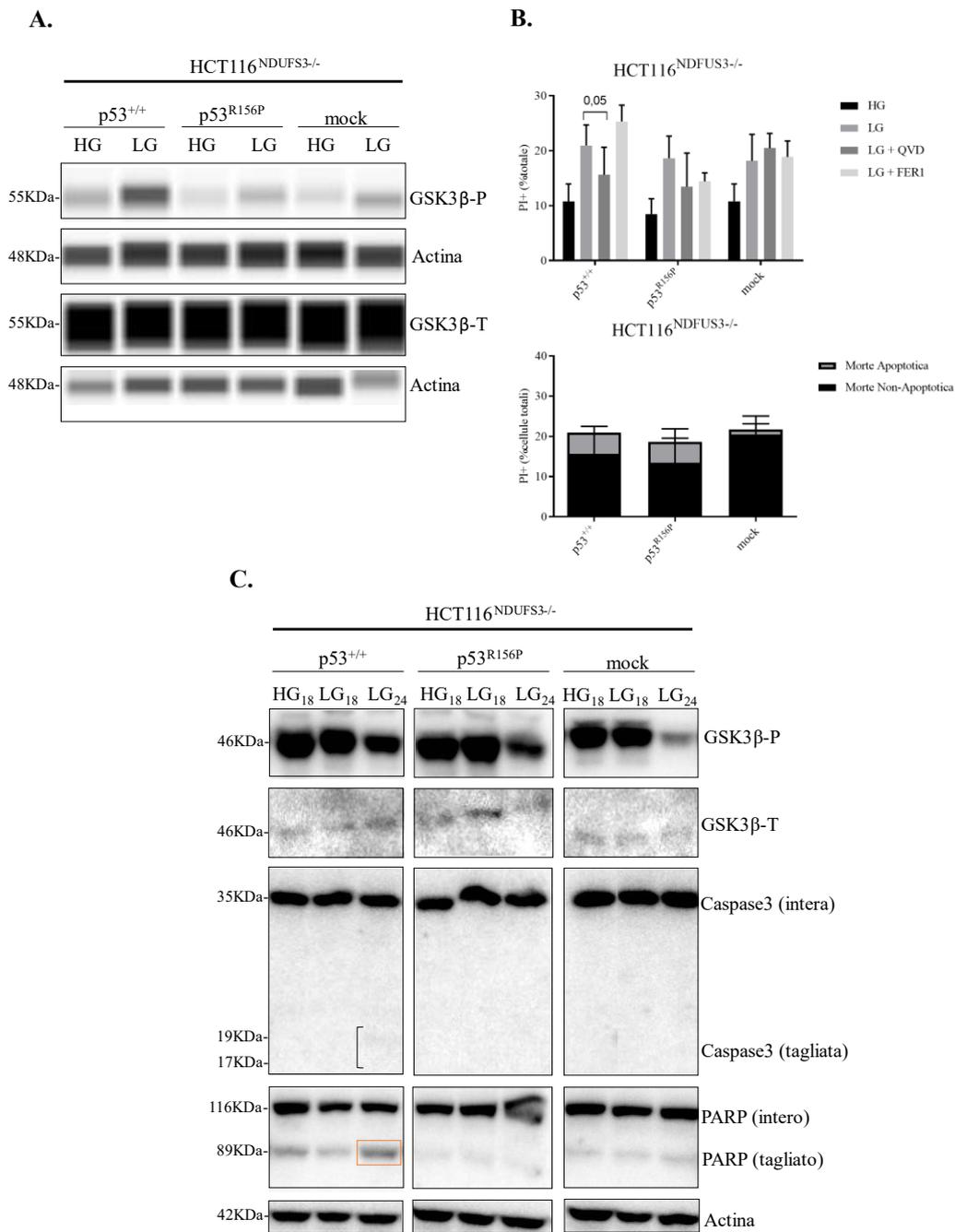


Fig.4.35: **A.** Valutazione dell'attivazione di GSK3 β mediante elettroforesi capillare (WES) nelle tre linee isogeniche HCT116^{NDFUS3-/-} coltivate in un terreno alla concentrazione di 25mM e 5mM di glucosio, rispettivamente, per 24h, n=2. **B.** Nel grafico in alto, le tre linee isogeniche HCT116^{NDFUS3-/-} sono state coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio in presenza dell'inibitore QVD (20 μ M) e Ferostatina1 (10 μ M) per 24h, misurando l'incorporazione con lo ioduro di propidio (PI) in cito fluorimetria (FACS). I dati sono rappresentati come media \pm SD, n=3. Nel grafico in basso, dallo stesso esperimento, è stata estrapolata la percentuale di morte apoptotica e non apoptotica, applicando la seguente formula: [morte apoptotica= % PI+(LG) - %PI+(LG + QVD)]. **C.** Analisi Western Blot della cascata di segnalazione apoptotica nelle tre linee isogeniche HCT116^{NDFUS3-/-} coltivate in un terreno alla concentrazione di 25mM e 5mM di glucosio, n=1.

Per avvalorare il dato ottenuto, in particolare nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+}, abbiamo misurato i livelli di accumulo della forma tagliata della caspasi 3 e del suo noto target PARP, principali marker di attivazione apoptotica, tramite analisi Western Blot.

Come è possibile osservare in Fig.4.35C, si nota un segnale flebile della forma tagliata della caspasi 3 ed un chiaro incremento dei livelli di PARP tagliato unicamente nella linea HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+}. A causa del rapido turnover proteolitico della caspasi 3, riuscire ad apprezzarne un marcato incremento della sua forma tagliata è tecnicamente difficile, in particolare nelle condizioni di stress che si riproducono nei modelli cellulari in esame.

Per cui, seppur non evidente, l'attivazione della caspasi 3 in WB e l'attivazione di PARP suggerirebbero che l'apoptosi sia il tipo di morte cellulare prevalente nelle linee HCT116^{NDUFS3-/-;p53+/+}, ma verosimilmente non GSK3 β mediata.

Inoltre, i dati ottenuti suggerirebbero un ruolo svolto da p53 wild-type nel deliberare anche il destino cellulare, possibilmente, grazie ad una regolazione diretta o indiretta con i due target molecolari identificati in questo studio, ATF4 e GSK3 β .

CONCLUSIONI

Mutazioni nel gene *TP53* sono identificate in circa il 50% dei tumori umani che potrebbero condurre alla perdita della canonica funzione di oncosoppressore e all'acquisto di una nuova funzione pro-oncogenica che promuove la crescita e la sopravvivenza. L'accumulo e la stabilizzazione proteica è una caratteristica delle forme mutate di p53 che conferiscono proprietà tumorigeniche (GOF) durante la progressione tumorale (Freed-Pastor and Prives 2012; Muller and Vousden 2013; Yue et al. 2017). Per tali ragioni, mirare farmacologicamente ai meccanismi che regolano la sua stabilità sta emergendo come un promettente approccio terapeutico (Muller and Vousden 2013). I dati ottenuti in questo studio hanno rivelato un effetto inatteso indotto dall'associazione sinergica del deficit del CI mitocondriale e della carenza di glucosio sull'espressione proteica di p53 mutata, ma non della forma wild-type. Il fenomeno di scomparsa di p53 mutata non dipende né da un blocco trascrizionale, né dall'innescamento di vie di degradazione intracellulare, ma piuttosto da un blocco generale della traduzione causato dall'auxotrofia da aspartato, tipica dei tumori con un deficit del CI (Sullivan et al. 2015). Contrariamente, l'ablazione del CI associata al basso glucosio induce una riduzione parziale della sintesi proteica nelle linee tumorali caratterizzate dalla presenza di una p53 wild-type, evidenziando come lo stato di *TP53* possa influenzare diversamente la sensibilità delle cellule tumorali al collasso metabolico indotto dal deficit del CI e dalla carenza di glucosio. In particolare, l'incremento di espressione di *SLC1A3* mediata da p53 mutata (p.R156P) compensa l'auxotrofia da aspartato indotta dal deficit del CI in presenza di aspartato eseogeno, conferendo un vantaggio proliferativo *in vitro* ed elevandolo come un promettente target terapeutico. L'incremento di espressione di *SLC1A3* potrebbe rappresentare una delle vie adattive che si innescano in seguito al deficit del CI, la cui inibizione abbassa il potenziale tumorigenico, ma non è sufficiente ad eradicare la patologia (Kurelac et al. 2019). Ciò non avviene in un contesto p53 wild-type ove risposte adattative diverse potrebbero innescarsi per compensare il danno sul CI, tra cui l'induzione di ATF4. Traslando tali risultati in clinica, sebbene non si proponga una vera

terapia adiuvante, vogliamo sottolineare l'importanza di proporre nuovi approcci terapeutici che sinergicamente mirino all'inibizione del CI e alle vie metaboliche compensatorie. Inoltre, la diversa sensibilità al collasso metabolico osservata nei modelli cellulari in esame in funzione dello stato genetico di p53 sottolinea l'importanza di esplorare la vulnerabilità caratteristica dei tumori umani, geneticamente e metabolicamente eterogenei, per programmare strategie terapeutiche mirate. La caratterizzazione genetica di *TP53* in un tumore, influenzando diversamente il metabolismo, assumerebbe un significato rilevante in clinica, aiutando a proporre terapie personalizzate in base al metabolismo paziente-specifico.

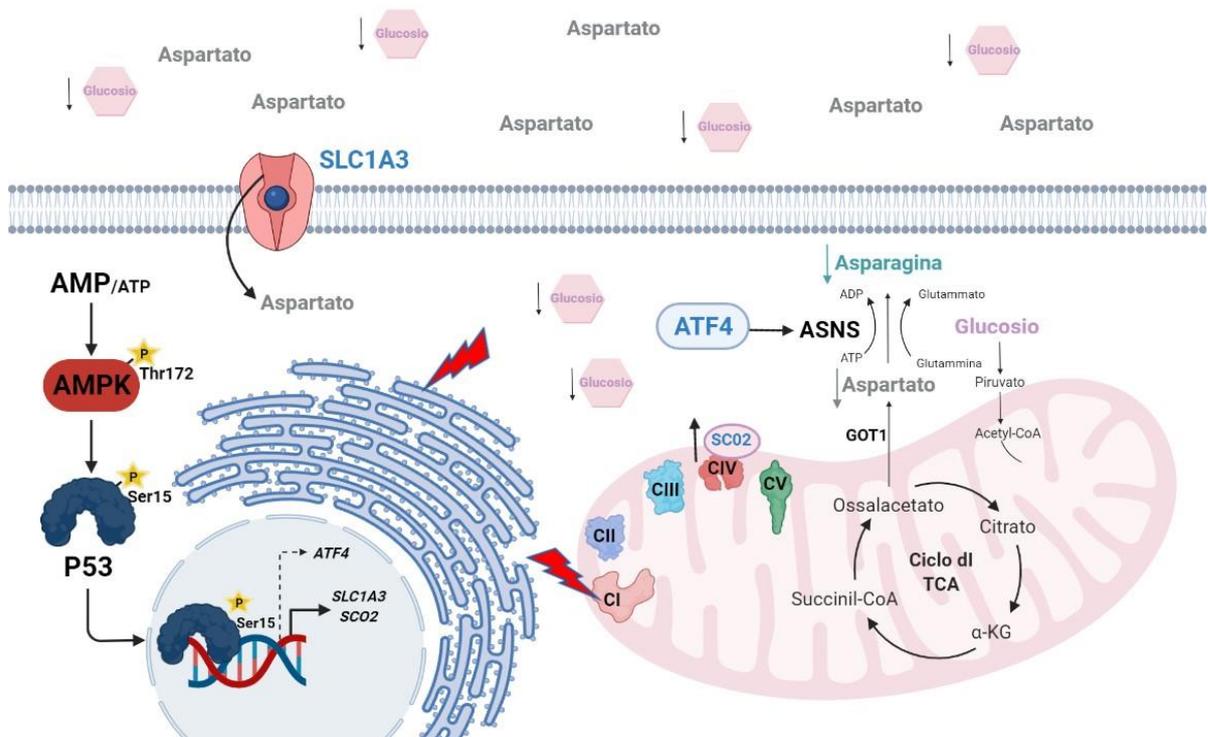


Fig.4.36: Rappresentazione schematica del ruolo svolto da p53 nell'adattamento metabolico in condizioni di deficit del CI mitocondriale

BIBLIOGRAFIA

Achilli, Alessandro et al. 2012. “Rare Primary Mitochondrial DNA Mutations and Probable Synergistic Variants in Leber’s Hereditary Optic Neuropathy.” *PLoS ONE* 7(8).

Alkan, H. Furkan et al. 2018. “Cytosolic Aspartate Availability Determines Cell Survival When Glutamine Is Limiting.” *Cell Metabolism* 28(5).

Allende-Vega, Nerea, and Martin Villalba. 2019. “Metabolic Stress Controls Mutant P53 R248Q Stability in Acute Myeloid Leukemia Cells.” *Scientific Reports* 9(1).

Almanza, Aitor et al. 2019. “Endoplasmic Reticulum Stress Signalling – from Basic Mechanisms to Clinical Applications.” *FEBS Journal* 286(2).

Anderson, S et al. 1981. “Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome.” *Nature* 290(5806): 457–65.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7219534>
<http://www.nature.com/libproxy.ucl.ac.uk/nature/journal/v290/n5806/pdf/290457a0.pdf>.

B’Chir, Wafa et al. 2013. “The EIF2 α /ATF4 Pathway Is Essential for Stress-Induced Autophagy Gene Expression.” *Nucleic Acids Research* 41(16).

Bauer, Daniel E. et al. 2004. “Cytokine Stimulation of Aerobic Glycolysis in Hematopoietic Cells Exceeds Proliferative Demand.” *The FASEB Journal* 18(11).

Bensaad, Karim et al. 2006. “TIGAR, a P53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis.” *Cell* 126(1).

De Berardinis, Ralph J., and Navdeep S. Chandel. 2016. “Fundamentals of Cancer Metabolism.” *Science Advances* 2(5).

Birsoy, Kivanç et al. 2015. “An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis.” *Cell* 162(3).

Bishop, J.M Weinberg, R.A. 1996. “No Title.” *Molecular Oncology*. Scientific American, Inc, New York.

Boroughs, Lindsey K., and Ralph J. Deberardinis. 2015. “Metabolic Pathways Promoting Cancer Cell Survival and Growth.” *Nature Cell Biology* 17(4).

Boulahebel, Houda, Raúl V. Durán, and Eyal Gottlieb. 2009. “Prolyl Hydroxylases as Regulators of Cell Metabolism.” *Biochemical Society Transactions* 37(1).

Brugarolas, James et al. 1995. “Radiation-Induced Cell Cycle Arrest Compromised by P21 Deficiency.” *Nature* 377(6549).

Budanov, Andrei V., and Michael Karin. 2008. “P53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and MTOR Signaling.” *Cell* 134(3).

Bunik, V I, O A Buneeva, and V S Gomazkova. 1990. “Change in Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Cooperative Properties Due to Dihydrolipoate and NADH.” *FEBS letters* 269(1): 252–54.

Cairns, Paul et al. 1997. “Frequent Inactivation of PTEN/MMAC1 in Primary Prostate Cancer.” *Cancer Research* 57(22).

Calabrese, Claudia et al. 2013. “Respiratory Complex I Is Essential to Induce a Warburg Profile in Mitochondria-Defective Tumor Cells.” *Cancer & Metabolism* 1(1): 11. <http://cancerandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-3002-1-11>.

Calles, Antonio et al. 2015. “Immunohistochemical Loss of LKB1 Is a Biomarker for More Aggressive Biology InKRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma.” In *Clinical Cancer Research*,.

Carrara, Marta, Filippo Prischi, Piotr R Nowak, and Maruf MU Ali. 2015. “Crystal Structures Reveal Transient PERK Luminal Domain Tetramerization in Endoplasmic Reticulum Stress Signaling .” *The EMBO Journal* 34(11).

Chan, Andrew T. 2016. “Metformin for Cancer Prevention: A Reason for Optimism.” *The Lancet Oncology* 17(4).

Chen, Zhao et al. 2012. “A Murine Lung Cancer Co-Clinical Trial Identifies Genetic Modifiers of Therapeutic Response.” *Nature* 483(7391).

Cheng, Tzuling et al. 2011. “Pyruvate Carboxylase Is Required for Glutamine-Independent Growth of Tumor Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(21).

Clausen, Lene et al. 2019. “Protein Stability and Degradation in Health and Disease.” In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*.

Condon, Kendall J. et al. 2021. “Genome-Wide CRISPR Screens Reveal Multitiered Mechanisms through Which MTORC1 Senses Mitochondrial Dysfunction.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(4).

Cortopassi, Gino et al. 2006. “Mitochondrial Disease Activates Transcripts of the Unfolded Protein Response and Cell Cycle and Inhibits Vesicular Secretion and Oligodendrocyte-Specific Transcripts.” *Mitochondrion* 6(4).

D’Angelo, Luigi et al. 2021. “NDUFS3 Depletion Permits Complex I Maturation and Reveals TMEM126A/OPA7 as an Assembly Factor Binding the ND4-Module Intermediate.” *Cell Reports* 35(3).

DeBerardinis, Ralph J. et al. 2007. “Beyond Aerobic Glycolysis: Transformed Cells Can Engage in Glutamine Metabolism That Exceeds the Requirement for Protein and Nucleotide Synthesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(49).

DeBerardinis, Ralph J., Nabil Sayed, Dara Ditsworth, and Craig B. Thompson. 2008. “Brick by Brick: Metabolism and Tumor Cell Growth.” *Current Opinion in Genetics and Development* 18(1).

Deng, Wenbo et al. 2016. “P53 Coordinates Decidual Sestrin 2/AMPK/MTORC1 Signaling to Govern Parturition Timing.” *Journal of Clinical Investigation* 126(8).

Deng, Xingming et al. 2001. “Novel Role for JNK as a Stress-Activated Bcl2 Kinase.” *Journal of Biological Chemistry* 276(26).

Deshpande, Amit, Peter Sicinski, and Philip W. Hinds. 2005. “Cyclins and Cdks in Development and Cancer: A Perspective.” *Oncogene* 24(17): 2909–15.

DiMauro, Salvatore, and Eric A. Schon. 2008. "Mitochondrial Disorders in the Nervous System." *Annual Review of Neuroscience* 31(1): 91–123. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094302>.

Dumay, Anne et al. 2013. "Distinct Tumor Protein P53 Mutants in Breast Cancer Subgroups." *International Journal of Cancer* 132(5).

Egler, Rachel A., Sanjay P. Ahuja, and Yousif Matloub. 2016. "L-Asparaginase in the Treatment of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia." *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 7(2).

Elgendy, Mohamed et al. 2019. "Combination of Hypoglycemia and Metformin Impairs Tumor Metabolic Plasticity and Growth by Modulating the PP2A-GSK3 β -MCL-1 Axis." *Cancer Cell* 35(5).

Ensor, Charles Mark, Frederick W. Holtsberg, John S. Bomalaski, and Mike A. Clark. 2002. "Pegylated Arginine Deiminase (ADI-SS PEG20,000 Mw) Inhibits Human Melanomas and Hepatocellular Carcinomas in Vitro and in Vivo." *Cancer Research* 62(19).

Eriksson, Matilda et al. 2017. "Effect of Mutant P53 Proteins on Glycolysis and Mitochondrial Metabolism." *Molecular and Cellular Biology* 37(24).

Evstafieva, A. G. et al. 2014. "A Sustained Deficiency of Mitochondrial Respiratory Complex III Induces an Apoptotic Cell Death through the P53-Mediated Inhibition of pro-Survival Activities of the Activating Transcription Factor 4." *Cell Death and Disease* 5(11).

Faubert, Brandon, Ashley Solmonson, and Ralph J. DeBerardinis. 2020. "Metabolic Reprogramming and Cancer Progression." *Science* 368(6487).

Floyd, Brendan J. et al. 2016. "Mitochondrial Protein Interaction Mapping Identifies Regulators of Respiratory Chain Function." *Molecular Cell* 63(4).

Foggetti, Giorgia et al. 2017. "Gambogic Acid Counteracts Mutant P53 Stability by Inducing Autophagy." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1864(2).

Formosa, Luke E., Marris G. Dibley, David A. Stroud, and Michael T. Ryan. 2018. "Building a Complex Complex: Assembly of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 76.

Foulds, L. 1954. "The Experimental Study of Tumor Progression: A Review." *Cancer Research* 14(5): 327–39.

Freed-Pastor, William A., and Carol Prives. 2012. "Mutant P53: One Name, Many Proteins." *Genes and Development* 26(12).

Fridman, Jordan S., and Scott W. Lowe. 2003. "Control of Apoptosis by P53." *Oncogene* 22(56 REV. ISS. 8).

Fu, Haigen et al. 2017. "Rapid Chemoenzymatic Route to Glutamate Transporter Inhibitor L-TFB-TBOA and Related Amino Acids." *Organic and Biomolecular Chemistry* 15(11).

Galan-Cobo, Ana et al. 2019. "LKB1 and KEAP1/NRF2 Pathways Cooperatively Promote Metabolic Reprogramming with Enhanced Glutamine Dependence InKRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma." *Cancer Research* 79(13).

Gao, Ping et al. 2009. "C-Myc Suppression of MiR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism." *Nature* 458(7239).

Garcia-Bermudez, Javier et al. 2018. "Aspartate Is a Limiting Metabolite for Cancer Cell Proliferation under Hypoxia and in Tumours." *Nature Cell Biology* 20(7).

Gardner, Brooke M., and Peter Walter. 2011. "Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response." *Science* 333(6051).

Garufi, Alessia, Valerio D'Orazi, Jack L. Arbiser, and Gabriella D'Orazi. 2014. "Gentian Violet Induces Wtp53 Transactivation in Cancer Cells." *International Journal of Oncology* 44(4).

Gasparre, Giuseppe et al. 2007. "Disruptive Mitochondrial DNA Mutations in Complex I Subunits Are Markers of Oncocytic Phenotype in Thyroid Tumors."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(21): 9001–6. <http://www.pnas.org/content/104/21/9001.abstract>.

Gasparre, Giuseppe, Giovanni Romeo, Michela Rugolo, and Anna Maria Porcelli. 2011. “Learning from Oncocytic Tumors: Why Choose Inefficient Mitochondria?” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1807(6): 633–42.

Glickman, Michael H., and Aaron Ciechanover. 2002. “The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction.” *Physiological Reviews* 82(2).

Gui, Dan Y. et al. 2016. “Environment Dictates Dependence on Mitochondrial Complex I for NAD⁺ and Aspartate Production and Determines Cancer Cell Sensitivity to Metformin.” *Cell Metabolism* 24(5).

Hackenbrock, Charles R., Brad Chazotte, and Sharmila Shaila Gupte. 1986. “The Random Collision Model and a Critical Assessment of Diffusion and Collision in Mitochondrial Electron Transport.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 18(5).

Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144(5): 646–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hardie, D. Grahame, Fiona A. Ross, and Simon A. Hawley. 2012. “AMPK: A Nutrient and Energy Sensor That Maintains Energy Homeostasis.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(4).

Harding, Heather P. et al. 2000. “Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response.” *Molecular Cell* 5(5).

———. 2003. “An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress.” *Molecular Cell* 11(3).

Harding, Heather P., Yuhong Zhang, and David Ron. 1999. “Protein Translation and Folding Are Coupled by an Endoplasmic- Reticulum-Resident Kinase.” *Nature* 397(6716).

He, Guifen et al. 2014. “AMP-Activated Protein Kinase Induces P53 by Phosphorylating MDMX and Inhibiting Its Activity.” *Molecular and Cellular Biology* 34(2).

Heiden, Matthew G Vander, Lewis C. Cantley, and Craig B. Thompson. 2009. “Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation.” *Science* 324(5930): 1029–33.

Hollander, M. Christine et al. 1999. “Genomic Instability in Gadd45a-Deficient Mice.” *Nature Genetics* 23(2).

Hoppe, Thorsten. 2005. “Multiubiquitylation by E4 Enzymes: ‘One Size’ Doesn’t Fit All.” *Trends in Biochemical Sciences* 30(4).

Hu, Wenwei et al. 2010. “Glutaminase 2, a Novel P53 Target Gene Regulating Energy Metabolism and Antioxidant Function.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16).

Icard, Philippe et al. 2020. “ATP Citrate Lyase: A Central Metabolic Enzyme in Cancer.” *Cancer Letters* 471.

Inglis, Alison J. et al. 2019. “Activation of GCN2 by the Ribosomal P-Stalk.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(11).

Inigo, Joseph R., Rahul Kumar, and Dhyan Chandra. 2021. “Targeting the Mitochondrial Unfolded Protein Response in Cancer: Opportunities and Challenges.” *Trends in Cancer* 7(12).

Iommarini, Luisa et al. 2013. “Complex i Impairment in Mitochondrial Diseases and Cancer: Parallel Roads Leading to Different Outcomes.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45(1): 47–63.

———. 2014. “Different MtDNA Mutations Modify Tumor Progression in Dependence of the Degree of Respiratory Complex I Impairment.” *Human Molecular Genetics* 23(6).

Ishikawa, Kaori et al. 2008. "ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis." *Science (New York, N.Y.)* 320(5876): 661–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388260>.

Iurlaro, Raffaella et al. 2017. "Glucose Deprivation Induces ATF4-Mediated Apoptosis through TRAIL Death Receptors." *Molecular and Cellular Biology* 37(10).

Ji, Hongbin et al. 2007. "LKB1 Modulates Lung Cancer Differentiation and Metastasis." *Nature* 448(7155).

Jones, Russell G. et al. 2005. "AMP-Activated Protein Kinase Induces a P53-Dependent Metabolic Checkpoint." *Molecular Cell* 18(3).

Jones, Russell G., and Craig B. Thompson. 2009. "Tumor Suppressors and Cell Metabolism: A Recipe for Cancer Growth." *Genes and Development* 23(5).

Kabbage, M., and M. B. Dickman. 2008. "The BAG Proteins: A Ubiquitous Family of Chaperone Regulators." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(9).

Kalo, Eyal et al. 2012. "Mutant P53R273H Attenuates the Expression of Phase 2 Detoxifying Enzymes and Promotes the Survival of Cells with High Levels of Reactive Oxygen Species." *Journal of Cell Science* 125(22).

Kanai, Yoshikatsu et al. 2013. "The SLC1 High-Affinity Glutamate and Neutral Amino Acid Transporter Family." *Molecular Aspects of Medicine* 34(2–3).

Karpen, Mary E., Pieter L. De Haseth, and Kenneth E. Neet. 1992. "Differences in the Amino Acid Distributions of 310-helices and A-helices." *Protein Science* 1(10).

Kastenhuber, Edward R., and Scott W. Lowe. 2017. "Putting P53 in Context." *Cell* 170(6).

Kawai, Hidehiko et al. 2003. "DNA Damage-Induced MDMX Degradation Is Mediated by MDM2." *Journal of Biological Chemistry* 278(46).

Keilin, D., and E. F. Hartree. 1947. "Activity of the Cytochrome System in Heart Muscle Preparations." *The Biochemical journal* 41(4).

Kenny, Timothy C., and Doris Germain. 2017. "MtDNA, Metastasis, and the Mitochondrial Unfolded Protein Response (UPRmt)." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5(APR).

Khan, Muhammad Riaz, Shaoxun Xiang, Zhiyin Song, and Mian Wu. 2017. "The P53-inducible Long Noncoding RNA TRINGS Protects Cancer Cells from Necrosis under Glucose Starvation ." *The EMBO Journal* 36(23).

Kim, Jiyeon, and Ralph J. DeBerardinis. 2019. "Mechanisms and Implications of Metabolic Heterogeneity in Cancer." *Cell Metabolism* 30(3).

Kohn, Aimee D., and Randall T. Moon. 2005. "Wnt and Calcium Signaling: β -Catenin-Independent Pathways." *Cell Calcium*.

Kollareddy, Madhusudhan et al. 2015. "Regulation of Nucleotide Metabolism by Mutant P53 Contributes to Its Gain-of-Function Activities." *Nature Communications* 6.

Kondoh, Hiroshi et al. 2005. "Glycolytic Enzymes Can Modulate Cellular Life Span." *Cancer Research* 65(1).

Koppenol, Willem H., Patricia L. Bounds, and Chi V. Dang. 2011. "Otto Warburg's Contributions to Current Concepts of Cancer Metabolism." *Nature Reviews Cancer* 11(5).

Krall, Abigail S. et al. 2016. "Asparagine Promotes Cancer Cell Proliferation through Use as an Amino Acid Exchange Factor." *Nature Communications* 7.

———. 2021. "Asparagine Couples Mitochondrial Respiration to ATF4 Activity and Tumor Growth." *Cell Metabolism* 33(5).

Krall, Abigail S., and Heather R. Christofk. 2015. "Rethinking Glutamine Addiction." *Nature Cell Biology* 17(12).

Kroemer, Guido, Guillermo Mariño, and Beth Levine. 2010. "Autophagy and the Integrated Stress Response." *Molecular Cell* 40(2).

Kruiswijk, Flore, Christiaan F. Labuschagne, and Karen H. Vousden. 2015. "P53 in Survival, Death and Metabolic Health: A Lifeguard with a Licence to Kill." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(7).

Kurelac, Ivana et al. 2019. "Inducing Cancer Indolence by Targeting Mitochondrial Complex I Is Potentiated by Blocking Macrophage-Mediated Adaptive Responses." *Nature Communications* 10(1).

Labuschagne, Christiaan F., Fabio Zani, and Karen H. Vousden. 2018. "Control of Metabolism by P53 – Cancer and Beyond." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1870(1).

Lee, Chi Wai et al. 2012. "AMPK Promotes P53 Acetylation via Phosphorylation and Inactivation of SIRT1 in Liver Cancer Cells." *Cancer Research* 72(17).

Li, Dun et al. 2011. "Functional Inactivation of Endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 Causes Aberrant Stabilization of Mutant P53 in Human Cancer Cells." *Molecular Cancer Research* 9(5).

Liu, Yu et al. 2016. "Deletions Linked to TP53 Loss Drive Cancer through P53-Independent Mechanisms." *Nature* 531(7595).

Lonardo, Enza et al. 2013. "Metformin Targets the Metabolic Achilles Heel of Human Pancreatic Cancer Stem Cells." *PLoS ONE* 8(10).

Lowman, Xazmin H. et al. 2019. "P53 Promotes Cancer Cell Adaptation to Glutamine Deprivation by Upregulating Slc7a3 to Increase Arginine Uptake." *Cell Reports* 26(11).

Lum, Julian J. et al. 2005. "Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis." *Cell* 120(2).

MacKenzie, Elaine D et al. 2007. "Cell-Permeating Alpha-Ketoglutarate Derivatives Alleviate Pseudohypoxia in Succinate Dehydrogenase-Deficient Cells." *Molecular and cellular biology* 27(9): 3282–89.

Maddocks, Oliver D.K. et al. 2013. "Serine Starvation Induces Stress and P53-Dependent Metabolic Remodelling in Cancer Cells." *Nature* 493(7433).

Maddocks, Oliver D.K., and Karen H. Vousden. 2011. “Metabolic Regulation by P53.” *Journal of Molecular Medicine* 89(3).

Marasco, Olivia N.J.M., Marc R. Roussel, and Nehal Thakor. 2022. “Probabilistic Models of UORF-Mediated ATF4 Translation Control.” *Mathematical Biosciences* 343.

Martinez, Diana et al. 2020. “Loss of Excitatory Amino Acid Transporter Restraint Following Chronic Intermittent Hypoxia Contributes to Synaptic Alterations in Nucleus Tractus Solitarii.” *Journal of Neurophysiology* 123(6).

Matoba, Satoaki et al. 2006. “P53 Regulates Mitochondrial Respiration.” *Science* 312(5780).

Mauthe, Mario et al. 2018. “Chloroquine Inhibits Autophagic Flux by Decreasing Autophagosome-Lysosome Fusion.” *Autophagy* 14(8).

Mauvezin, Caroline, and Thomas P. Neufeld. 2015. “Bafilomycin A1 Disrupts Autophagic Flux by Inhibiting Both V-ATPase-Dependent Acidification and Ca-P60A/SERCA-Dependent Autophagosome-Lysosome Fusion.” *Autophagy* 11(8).

Maxwell, Patrick H., Christopher W. Pugh, and Peter J. Ratcliffe. 2001. “Activation of the HIF Pathway in Cancer.” *Current Opinion in Genetics and Development* 11(3): 293–99.

Mckenzie, Matthew, and Michael T. Ryan. 2010. “Assembly Factors of Human Mitochondrial Complex I and Their Defects in Disease.” *IUBMB Life* 62(7): 497–502.

Merlo, Lauren M.F., John W. Pepper, Brian J. Reid, and Carlo C. Maley. 2006. “Cancer as an Evolutionary and Ecological Process.” *Nature Reviews Cancer* 6(12).

Meulmeester, Erik et al. 2003. “Critical Role for a Central Part of Mdm2 in the Ubiquitylation of P53.” *Molecular and Cellular Biology* 23(14).

Milenkovic, Dusanka, James N. Blaza, Nils Göran Larsson, and Judy Hirst. 2017. “The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex.” *Cell Metabolism* 25(4).

Montoya, Julio, Deanna Ojala, and Giuseppe Attardi. 1981. “Distinctive Features of the 5'-Terminal Sequences of the Human Mitochondrial MRNAs.” *Nature* 290(5806).

Moreno-Sánchez, Rafael, Sara Rodríguez-Enríquez, Alvaro Marín-Hernández, and Emma Saavedra. 2007. “Energy Metabolism in Tumor Cells.” *FEBS Journal* 274(6).

Morita, Masahiro et al. 2015. “MTOR Coordinates Protein Synthesis, Mitochondrial Activity.” *Cell Cycle* 14(4).

Mullen, Andrew R. et al. 2012. “Reductive Carboxylation Supports Growth in Tumour Cells with Defective Mitochondria.” *Nature* 481(7381): 385–88.

Muller, Patricia A.J., and Karen H. Vousden. 2013. “P53 Mutations in Cancer.” *Nature Cell Biology* 15(1).

———. 2014. “Mutant P53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities.” *Cancer Cell* 25(3).

Nadege, Bellance, Lestienne Patrick, and Rossignol Rodrigue. 2009. “Mitochondria: From Bioenergetics to the Metabolic Regulation of Carcinogenesis.” *Frontiers in Bioscience* 14(11).

Nguyen, Thuy Ai, Daniel Menendez, Michael A. Resnick, and Carl W. Anderson. 2014. “Mutant TP53 Posttranslational Modifications: Challenges and Opportunities.” *Human Mutation* 35(6).

Nolan, Katie et al. 2016. “Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Upregulation of MiR-29a Enhances Sensitivity to Neuronal Apoptosis.” *European Journal of Neuroscience* 43(5).

Nowell, P C. 1976. “The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations.” *Science (New York, N.Y.)* 194(4260): 23–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840>.

O’Connell, Brenda C. et al. 2003. “A Large Scale Genetic Analysis of C-Myc-Regulated Gene Expression Patterns.” *Journal of Biological Chemistry* 278(14).

Osthus, Rebecca C. et al. 2000. “Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by C-Myc.” *Journal of Biological Chemistry* 275(29).

Owen, Oliver E., Satish C. Kalhan, and Richard W. Hanson. 2002. "The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function." *Journal of Biological Chemistry* 277(34).

Pakos-Zebrucka, Karolina et al. 2016. "The Integrated Stress Response." *EMBO reports* 17(10): 1374–95.

Pan, Mengwu, and Christine Blattner. 2021. "Regulation of P53 by E3S." *Cancers* 13(4).

Park, Hae Ryong et al. 2004. "Effect on Tumor Cells of Blocking Survival Response to Glucose Deprivation." *Journal of the National Cancer Institute* 96(17).

Peng, Yanhua et al. 2001. "Inhibition of MDM2 by Hsp90 Contributes to Mutant P53 Stabilization." *Journal of Biological Chemistry* 276(44).

Pollard, P. J. et al. 2005. "Accumulation of Krebs Cycle Intermediates and Over-Expression of HIF1 α in Tumours Which Result from Germline FH and SDH Mutations." *Human Molecular Genetics* 14(15): 2231–39.

Porcelli, Anna Maria et al. 2010. "The Genetic and Metabolic Signature of Oncocytic Transformation Implicates HIF1 α Destabilization." *Human Molecular Genetics* 19(6): 1019–32.

Porporato, Paolo E. et al. 2014. "A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis." *Cell Reports* 8(3).

Puthalakath, Hamsa et al. 2007. "ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim." *Cell* 129(7).

Quirós, Pedro M. et al. 2017. "Multi-Omics Analysis Identifies ATF4 as a Key Regulator of the Mitochondrial Stress Response in Mammals." *Journal of Cell Biology* 216(7).

Ray, Paul D., Bo Wen Huang, and Yoshiaki Tsuji. 2012. "Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling." *Cellular Signalling* 24(5).

Roessler, Maxie M. et al. 2010. "Direct Assignment of EPR Spectra to Structurally Defined Iron-Sulfur Clusters in Complex I by Double Electron-Electron Resonance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(5).

Ross, Alison Barbara, Julian David Langer, and Marko Jovanovic. 2021. "Proteome Turnover in the Spotlight: Approaches, Applications, and Perspectives." *Molecular and Cellular Proteomics* 20.

Rossignol, Rodrigue et al. 2003. "Mitochondrial Threshold Effects." *Biochemical Journal* 370(3).

De Rozieres, Sohela, Ruth Maya, Moshe Oren, and Guillermina Lozano. 2000. "The Loss of Mdm2 Induces P53 Mediated Apoptosis." *Oncogene* 19(13).

Samuels, Yardena et al. 2004. "High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers." *Science* 304(5670).

Schägger, Hermann. 2001. "Blue-Native Gels to Isolate Protein Complexes from Mitochondria." *Methods in Cell Biology* (65).

Scherz-Shouval, Ruth et al. 2010. "P53-Dependent Regulation of Autophagy Protein LC3 Supports Cancer Cell Survival under Prolonged Starvation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(43).

Schöckel, Laura et al. 2015. "Targeting Mitochondrial Complex I Using BAY 87-2243 Reduces Melanoma Tumor Growth." *Cancer & metabolism* 3: 11.

Schwartzberg-Bar-Yoseph, Fabiana, Michai Armoni, and Eddy Karnieli. 2004. "The Tumor Suppressor P53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression." *Cancer Research* 64(7).

Selak, Mary A et al. 2005. "Succinate Links TCA Cycle Dysfunction to Oncogenesis by Inhibiting HIF-Alpha Prolyl Hydroxylase." *Cancer cell* 7(1): 77–85.

Semenza, Gregg L. 2003. "Targeting HIF-1 for Cancer Therapy." *Nature Reviews Cancer* 3(10).

Shieh, S Y, M Ikeda, Y Taya, and C Prives. 1997. “DNA Damage-Induced Phosphorylation of P53 Alleviates Inhibition by MDM2.” *Cell* 91(3): 325–34.

Shim, Hyunsuk et al. 1997. “C-Myc Transactivation of LDH-A: Implications for Tumor Metabolism and Growth.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(13).

Shimamoto, Keiko et al. 2004. “Characterization of Novel L-Threo-Beta-Benzyloxyaspartate Derivatives, Potent Blockers of the Glutamate Transporters.” *Molecular pharmacology* 65(4): 1008–15.

Shin, Sung Won et al. 2015. “Overexpression of PGC-1 α Enhances Cell Proliferation and Tumorigenesis of HEK293 Cells through the Upregulation of Sp1 and Acyl-CoA Binding Protein.” *International Journal of Oncology* 46(3).

Shirole, Nitin H. et al. 2016. “TP53 Exon-6 Truncating Mutations Produce Separation of Function Isoforms with pro-Tumorigenic Functions.” *eLife* 5(OCTOBER2016).

Silva, Jillian M., Alice Wong, Valerio Carelli, and Gino A. Cortopassi. 2009. “Inhibition of Mitochondrial Function Induces an Integrated Stress Response in Oligodendroglia.” *Neurobiology of Disease* 34(2).

Smolková, Katarína et al. 2011. “Waves of Gene Regulation Suppress and Then Restore Oxidative Phosphorylation in Cancer Cells.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43(7).

Son, Jaekyoung et al. 2013. “Glutamine Supports Pancreatic Cancer Growth through a KRAS-Regulated Metabolic Pathway.” *Nature* 496(7443).

Spiotto, Michael T. et al. 2010. “Imaging the Unfolded Protein Response in Primary Tumors Reveals Microenvironments with Metabolic Variations That Predict Tumor Growth.” *Cancer Research* 70(1).

Stambolsky, P. et al. 2006. “Regulation of AIF Expression by P53.” *Cell Death and Differentiation* 13(12).

Stine, Zachary E. et al. 2015. "MYC, Metabolism, and Cancer." *Cancer Discovery* 5(10).

Stroud, David A. et al. 2016. "Accessory Subunits Are Integral for Assembly and Function of Human Mitochondrial Complex I." *Nature* 538(7623).

Sullivan, Lucas B. et al. 2015. "Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells." *Cell* 162(3).

Suzuki, Sawako et al. 2010. "Phosphate-Activated Glutaminase (GLS2), a P53-Inducible Regulator of Glutamine Metabolism and Reactive Oxygen Species." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16).

Tajan, Mylène et al. 2018. "A Role for P53 in the Adaptation to Glutamine Starvation through the Expression of SLC1A3." *Cell Metabolism* 28(5).

Topf, Ulrike, Barbara Uszczyńska-Ratajczak, and Agnieszka Chacinska. 2019. "Mitochondrial Stress-Dependent Regulation of Cellular Protein Synthesis." *Journal of Cell Science* 132(8).

Vahsen, Nicola et al. 2004. "AIF Deficiency Compromises Oxidative Phosphorylation." *EMBO Journal* 23(23).

Vinothkumar, Kutti R., Jiapeng Zhu, and Judy Hirst. 2014. "Architecture of Mammalian Respiratory Complex I." *Nature* 515(7525).

Vogt Sionov, Ronit, and Ygal Haupt. 1999. "The Cellular Response to P53: The Decision between Life and Death." *Oncogene* 18(45).

Vousden, Karen H., and Xin Lu. 2002. "Live or Let Die: The Cell's Response to P53." *Nature Reviews Cancer* 2(8).

Vučetić, Milica, Yann Cormerais, Scott K. Parks, and Jacques Pouyssegur. 2017. "The Central Role of Amino Acids in Cancer Redox Homeostasis: Vulnerability Points of the Cancer Redox Code." *Frontiers in Oncology* 7(DEC).

Wallace, D. C., J. Yang, J. Ye, and M. T. Lott. 1986. "Computer Prediction of Peptide Maps: Assignment of Polypeptides to Human and Mouse Mitochondrial DNA Genes by Analysis of Two-Dimensional-Proteolytic Digest Gels." *American Journal of Human Genetics* 38(4).

Wallace, Douglas C. 1993. "Mitochondrial Diseases: Genotype versus Phenotype." *Trends in Genetics* 9(4).

Walter, Peter, and David Ron. 2011. "The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation." *Science* 334(6059).

Watcharasit, Piyajit et al. 2003. "Glycogen Synthase Kinase-3beta (GSK3beta) Binds to and Promotes the Actions of P53." *The Journal of biological chemistry* 278(49).

Wheaton, William W. et al. 2014. "Metformin Inhibits Mitochondrial Complex I of Cancer Cells to Reduce Tumorigenesis." *eLife* 2014(3).

Whitaker-Menezes, Diana et al. 2011. "Hyperactivation of Oxidative Mitochondrial Metabolism in Epithelial Cancer Cells in Situ: Visualizing the Therapeutic Effects of Metformin in Tumor Tissue." *Cell Cycle* 10(23).

Wortel, Inge M.N., Laurens T. van der Meer, Michael S. Kilberg, and Frank N. van Leeuwen. 2017. "Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 28(11).

Wu, X., J. H. Bayle, D. Olson, and A. J. Levine. 1993. "The P53-Mdm-2 Autoregulatory Feedback Loop." *Genes and Development* 7(7 A).

Yang, Leixiang et al. 2019. "Mutant P53 Sequestration of the MDM2 Acidic Domain Inhibits E3 Ligase Activity." *Molecular and Cellular Biology* 39(4).

Ye, Jiangbin et al. 2010. "The GCN2-ATF4 Pathway Is Critical for Tumour Cell Survival and Proliferation in Response to Nutrient Deprivation." *EMBO Journal* 29(12).

———. 2015. "GCN2 Sustains MTORC1 Suppression upon Amino Acid Deprivation by Inducing Sestrin2." *Genes and Development* 29(22).

Ying, Haoqiang et al. 2012. “Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism.” *Cell* 149(3).

Yue, Xuétian et al. 2015. “BAG2 Promotes Tumorigenesis through Enhancing Mutant P53 Protein Levels and Function.” *eLife* 4(AUGUST2015).

———. 2016. “A Novel Mutant P53 Binding Partner BAG5 Stabilizes Mutant P53 and Promotes Mutant P53 GOFs in Tumorigenesis.” *Cell Discovery* 2.

———. 2017. “Mutant P53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy.” *Journal of Molecular Biology* 429(11).

Zeviani, Massimo, and Valerio Carelli. 2007. “Mitochondrial Disorders.” *Current Opinion in Neurology* 20(5): 564–71.

Zhang, C. et al. 2014. “ROCK Has a Crucial Role in Regulating Prostate Tumor Growth through Interaction with C-Myc.” *Oncogene* 33(49).

Zhang, Cen et al. 2013. “Tumour-Associated Mutant P53 Drives the Warburg Effect.” *Nature Communications* 4.

Zhang, Ji et al. 2014. “Asparagine Plays a Critical Role in Regulating Cellular Adaptation to Glutamine Depletion.” *Molecular cell* 56(2): 205–18.

Zhang, Liang et al. 2019. “Metabolic Reprogramming toward Oxidative Phosphorylation Identifies a Therapeutic Target for Mantle Cell Lymphoma.” *Science Translational Medicine* 11(491).

Zhang, Nan et al. 2018. “Autophagy-Deficient Tumor Cells Rely on Extracellular Amino Acids to Survive upon Glutamine Deprivation.” *Autophagy* 14(9).

Zheng, Tongsen et al. 2013. “Spliced MDM2 Isoforms Promote Mutant P53 Accumulation and Gain-of-Function in Tumorigenesis.” *Nature Communications* 4.

Zhu, Ping, and Guohong Li. 2016. “Higher-Order Structure of the 30-Nm Chromatin Fiber Revealed by Cryo-EM.” *IUBMB Life* 68(11).

Zhu, Xu et al. 2014. "Ubiquitination of Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1) by the E3 Ligase CHIP Mediates the IRE1/TRAF2/JNK Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 289(44).

Zu, Xin Lin, and Michael Guppy. 2004. "Cancer Metabolism: Facts, Fantasy, and Fiction." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313(3).