

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI

Ciclo 35

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A1 - GENETICA MEDICA

Settore Scientifico disciplinare: MED/03 - GENETICA MEDICA

Specificità, efficacia e risposte adattative mediate da mutazioni dell'oncosoppressore *TP53* degli inibitori del Complesso I mitocondriale nella terapia oncologica personalizzata: dai meccanismi molecolari allo sviluppo di modelli preclinici avanzati

Presentata da: Dott.ssa Maria Iorio

Coordinatore Dottorato

Prof. Fabio Piscaglia

Relatore

Prof. Giuseppe Gasparre

Esame finale anno 2023

INDICE

1. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUZIONE.....	4
2.1 <i>La riprogrammazione del metabolismo energetico delle cellule tumorali</i>	4
2.2 <i>Il ruolo del Complesso I (CI) mitocondriale nella progressione tumorale</i>	10
2.3 <i>Gli inibitori del CI come una potenziale terapia anti-tumorale</i>	15
2.4 <i>Il ruolo dell'oncosoppressore p53 nell'adattamento metabolico in condizioni di deficit della catena di trasporto degli elettroni</i>	22
3. SCOPO.....	26
4. MATERIALI E METODI.....	27
4.1 <i>Colture cellulari</i>	27
4.2 <i>Condizioni di coltura</i>	29
4.3 <i>Trattamenti</i>	29
4.4 <i>Saggio di proliferazione con IncuCyte S3</i>	30
4.5 <i>Saggio di apoptosi</i>	33
4.6 <i>Trasduzione</i>	33
4.7 <i>Estrazione dell'RNA</i>	38
4.8 <i>Retrotrascrizione</i>	38
4.9 <i>qRT-PCR</i>	39
4.10 <i>Estrazione del DNA</i>	41
4.11 <i>Sequenziamento Sanger</i>	42
4.12 <i>Estrazione delle proteine e sistema di elettroforesi capillare (WES)</i>	43
4.13 <i>SDS page e Western Blot</i>	44
4.14 <i>Analisi densitometrica Western Blot</i>	45
4.15 <i>Analisi in silico per l'identificazione di elementi responsivi (RE)</i>	46
4.16 <i>Saggio di luciferasi</i>	46
4.17 <i>Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)</i>	47
4.18 <i>Micro-respirometria</i>	48
4.19 <i>Preparazione delle frazioni arricchite di mitocondri</i>	49
4.20 <i>Misurazione delle attività dei complessi mitocondriali</i>	49
4.21 <i>Dosaggio del consumo di glucosio</i>	50
4.23 <i>Gasromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)</i>	50
4.24 <i>Saggio radioattivo con aspartato radio marcato</i>	51
4.25 <i>Saggio radioattivo con aspartato radio marcato</i>	51
4.26 <i>Analisi statistiche</i>	52

4.27	<i>Crescita tumorale in modelli xenograft</i>	53
4.28	<i>Colture tridimensionali (3D) ex-vivo</i>	54
4.29	<i>Immunoistochimica ed immunofluorescenza</i>	56
5.	RISULTATI E DISCUSSIONE	57
5.1	<i>EVP 4593 e BAY 87-2243 sono inibitori della respirazione mitocondriale più potenti della metformina</i>	58
5.2	<i>Modelli tumorali NDUFS3 nulli rivelano l'effetto antiproliferativo di EVP 4593 e BAY 87-2243 specifico per il CI</i>	66
5.3	<i>Gli effetti antiproliferativi dipendenti dall'inibizione del CI non sono associati all'apoptosi</i>	70
5.4	<i>EVP 4593 esercita un effetto antiproliferativo in vivo paragonabile a quello della metformina</i> .	75
5.5	<i>P53 influenza l'effetto degli inibitori del CI</i>	80
5.6	<i>Disfunzioni del CI inducono un blocco della sintesi proteica nelle linee cellulari p53 mutate e nulle</i>	87
5.7	<i>Modelli singenici ricapitolano una diversa sensibilità all'inibizione del CI dipendentemente dallo stato genetico di TP53</i>	95
5.8	<i>Il ruolo di mTORC1 nella sintesi proteica</i>	97
5.9	<i>P53 wild-type supera l'auxotrofia da aspartato indotta dal danno funzionale del CI</i>	101
5.10	<i>P53 wild type sostiene la fosforilazione ossidativa in presenza di disfunzioni del CI</i>	108
5.11	<i>Colture 3D ex vivo di SF-HGSOC in perfusione ricapitolano il fenotipo tumorale</i>	120
5.12	<i>Colture 3D ex vivo di SF-HGSOC in perfusione come valido modello preclinico per lo studio degli inibitori del CI</i>	133
6.	CONCLUSIONI	140
7.	BIBLIOGRAFIA	143

1. ABSTRACT

L'inibizione del complesso respiratorio I (CI) è una strategia antitumorale emergente, sebbene la specificità e l'efficacia di nuovi farmaci restino poco investigate. La generazione di modelli cellulari tumorali nulli per il CI rivela la specificità di EVP 4593 e BAY 872243 nell'indurre gli effetti antiproliferativi non associati all'apoptosi, selettivamente via CI, riducendo eventuali effetti collaterali. Studi preliminari *in vivo* evidenziano un rallentamento della crescita tumorale negli animali trattati con EVP 4593, il quale emerge come l'inibitore più potente.

Per il suo ruolo nella riprogrammazione metabolica, e la sua elevata frequenza di mutazioni nelle neoplasie umane, sono stati investigati i potenziali meccanismi di adattamento alla terapia anti-CI sulla base dello stato mutazionale di *TP53*. L'auxotrofia da aspartato, un hallmark metabolico delle cellule tumorali con un danno al CI, causa un blocco della sintesi proteica mTORC1-dipendente nelle linee cellulari con una *p53* mutata o nulla, inducendo un collasso metabolico. Viceversa, l'attivazione del sensore energetico AMPK promuove un recupero parziale della sintesi di aspartato in linee cellulari con la forma wild type di *P53*, che è in grado di sostenere una migliore anaplerosi attraverso *SCO2*, fattore di assemblaggio del complesso respiratorio IV.

Al fine di traslare questi risultati in un modello preclinico, si è ottimizzato l'ottenimento di colture di tumori umani espianati tramite il bioreattore U-CUP. Il modello scelto è stato quello di carcinoma sieroso ad alto grado dell'ovaio (HGSOC), a partire da tessuto congelato, per l'elevata frequenza di mutazioni driver in *TP53*. I tessuti congelati preservano l'eterogeneità delle componenti cellulari del tessuto di origine e sono caratterizzati da cellule in attiva proliferazione senza attivazione di apoptosi. Dati preliminari mostrano un trend di riduzione dell'area tumorale nei tessuti trattati con EVP 4593 e supportano l'utilizzo del modello preclinico nello studio di nuovi inibitori del CI sfruttando materiale primario di pazienti oncologici.

2. INTRODUZIONE

2.1 La riprogrammazione del metabolismo energetico delle cellule tumorali

Il cancro è una patologia multifattoriale ed eterogenea costituita da una massa anomala di cellule in proliferazione incontrollata che causa lo sbilanciamento dell'omeostasi tissutale. Nonostante la pluralità degli eventi genetici che concorrono all'oncogenesi, un gruppo di sei segni distintivi, a cui spesso ci si riferisce con il termine inglese "hallmarks" [1] accomuna le cellule tumorali nello sviluppo multifasico del fenotipo tumorale definito come maligno. Questi costituiscono un principio organizzativo per razionalizzare le complessità della malattia neoplastica ed includono: la presenza di elevati segnali di proliferazione, l'evasione dai controlli negativi della crescita, la resistenza all'apoptosi, l'elusione dei meccanismi di senescenza, l'induzione di neoangiogenesi, e l'attivazione dei processi di invasione e metastasi. L'acquisizione di queste caratteristiche è contrassegnata da una causa comune ovvero l'instabilità del genoma cellulare, la quale, a sua volta, porta ad una eterogeneità genica. Specificamente, infatti, la fase di progressione neoplastica, preceduta dalle fasi di iniziazione e promozione, è scatenata da meccanismi molecolari tra cui l'accumulo di mutazioni che comportano l'attivazione di oncogeni e la perdita di funzione di soppressori tumorali. Si noti inoltre, che un gruppo di cellule della stessa massa tumorale può subire diverse mutazioni e quindi acquisire fenotipi diversi. In questo modo si instaura l'eterogeneità cellulare caratteristica del fenotipo maligno.

Nell'ultima decade molti studi hanno suggerito che le cellule tumorali riprogrammano il loro metabolismo per sostenere efficientemente la crescita e la proliferazione [2]. Conseguentemente, la definizione di cellula tumorale basata sui sei "hallmarks" sopracitati è stata ampliata (**Fig.1**) con l'aggiunta della riprogrammazione del metabolismo cellulare [3]. Infatti, la proliferazione incontrollata e cronica che distingue le cellule cancerose non solo richiede una deregolazione del ciclo cellulare, ma necessita anche una rimodulazione del metabolismo energetico allo scopo di sostenere la crescita e la progressione tumorale.

In condizioni fisiologiche il metabolismo energetico della cellula passa attraverso la glicolisi, processo tramite cui il glucosio viene ossidato a piruvato nel citoplasma.

Successivamente, nei mitocondri, le centrali energetiche della cellula, il piruvato viene ossidato ad anidride carbonica tramite il processo di fosforilazione ossidativa (OXPHOS). I due processi, glicolisi ed OXPHOS, realizzati in successione, permettono per ogni molecola di glucosio di generare ben 36 molecole di adenosina trifosfato (ATP), molecola attraverso cui la cellula conserva e scambia l'energia. L'OXPHOS richiede la presenza di ossigeno per poter avvenire. In condizioni anaerobiche, invece, la cellula ossida il glucosio in piruvato e poi in lattato. Questa via di produzione dell'energia è meno efficiente perché per ogni molecola di glucosio vengono generate solo due molecole di ATP a fronte delle 36 prodotte con la glicolisi.

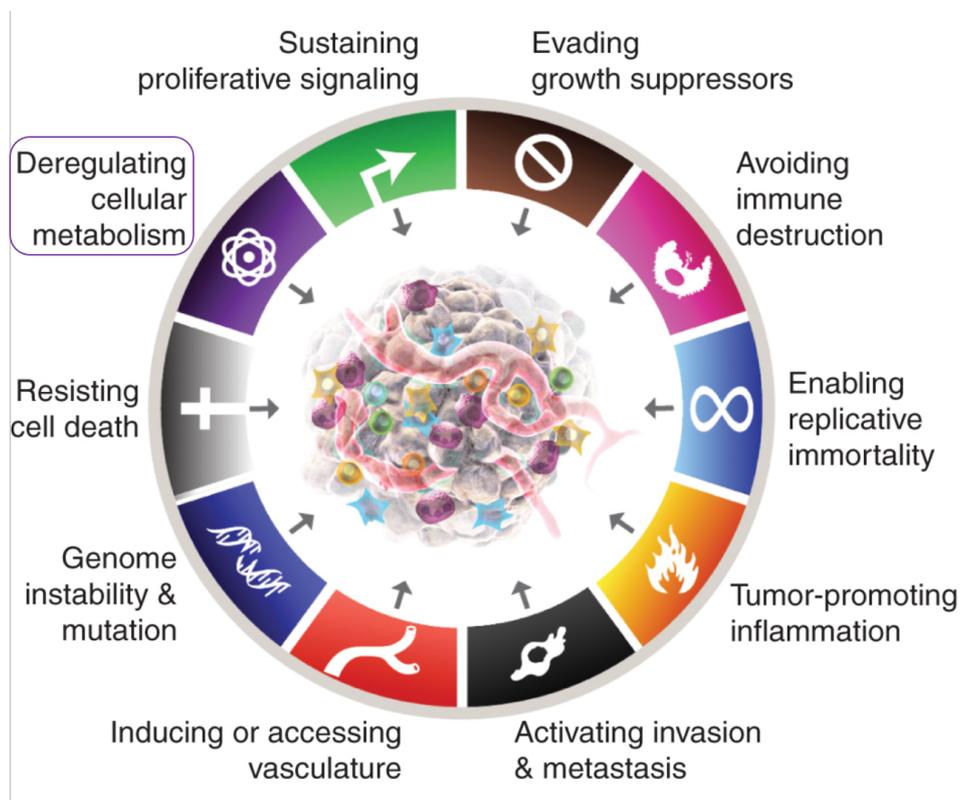


Figura 1 Rappresentazione schematica degli *hallmarks* genetici del cancro definiti da Hanahan e Weinberg nel 2011. Oltre ai sei *hallmarks* proposti nel 2000 [1], sono stati introdotti ulteriori due *hallmarks*: la riprogrammazione del metabolismo cellulare e l'evasione dal sistema immunitario.

Le cellule tumorali prediligono la glicolisi anche in presenza di ossigeno, realizzando la cosiddetta glicolisi aerobica o effetto Warburg, dal nome del suo scopritore [4]. 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'innescò di processi biosintetici quali il ribosio per la sintesi dei nucleotidi, il glicerolo ed il citrato per la sintesi lipidica, amminoacidi non essenziali, ed il pool di NADPH; quest'ultimo è ottenuto tramite lo shunt del pentoso fosfato [5,6]. Infine, l'elevata produzione di lattato genera un microambiente acido favorevole alle cellule con fenotipi resistenti agli ambienti acidi. Questo offre un enorme vantaggio di crescita e intensifica la natura invasiva e metastatica delle cellule tumorali, a differenza delle altre cellule che non sosterrebbero la presenza ingente di lattato [7]. Otto Warburg postulò alla base della dipendenza glicolitica di una cellula cancerosa, una disfunzione mitocondriale [5,8]. Successivamente, è stata descritta una teoria sulla "plasticità metabolica" delle cellule tumorali, in cui le cellule hanno ancora un macchinario OXPHOS completamente funzionale e possono passare dall'OXPHOS alla glicolisi aerobica, o addirittura affidarsi ad entrambe le vie metaboliche contemporaneamente [9]. Ciò conferisce loro la capacità di adattarsi a vari microambienti, favorendone anche la chemio resistenza. Con l'introduzione del concetto di plasticità, rafforzato anche da studi successivi in cui è stato dimostrato che molti tumori altamente proliferanti non presentano mitocondri danneggiati [10], questo aspetto dell'ipotesi di Warburg è stato messo in discussione.

I mitocondri, organelli chiave nei processi bioenergetici e biosintetici cellulari, regolano diversi meccanismi molecolari coinvolti nella proliferazione e nella morte cellulare. Di fatto, i mitocondri rappresentano il centro nevralgico per la produzione di energia, essendo il sito della OXPHOS e del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) (**Fig.2**), e contribuiscono attivamente alla biosintesi delle macromolecole, alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e all'omeostasi del Ca^{2+} , assumendo così una posizione centrale nelle cascate di segnalazione e nell'equilibrio tra sopravvivenza e morte cellulare. La funzionalità mitocondriale è conservata anche in contesti patologici come la tumorigenesi, durante la quale i cambiamenti bioenergetici e la riprogrammazione metabolica conferiscono una flessibilità tale per cui è favorita la sopravvivenza delle cellule tumorali in un microambiente ostile.

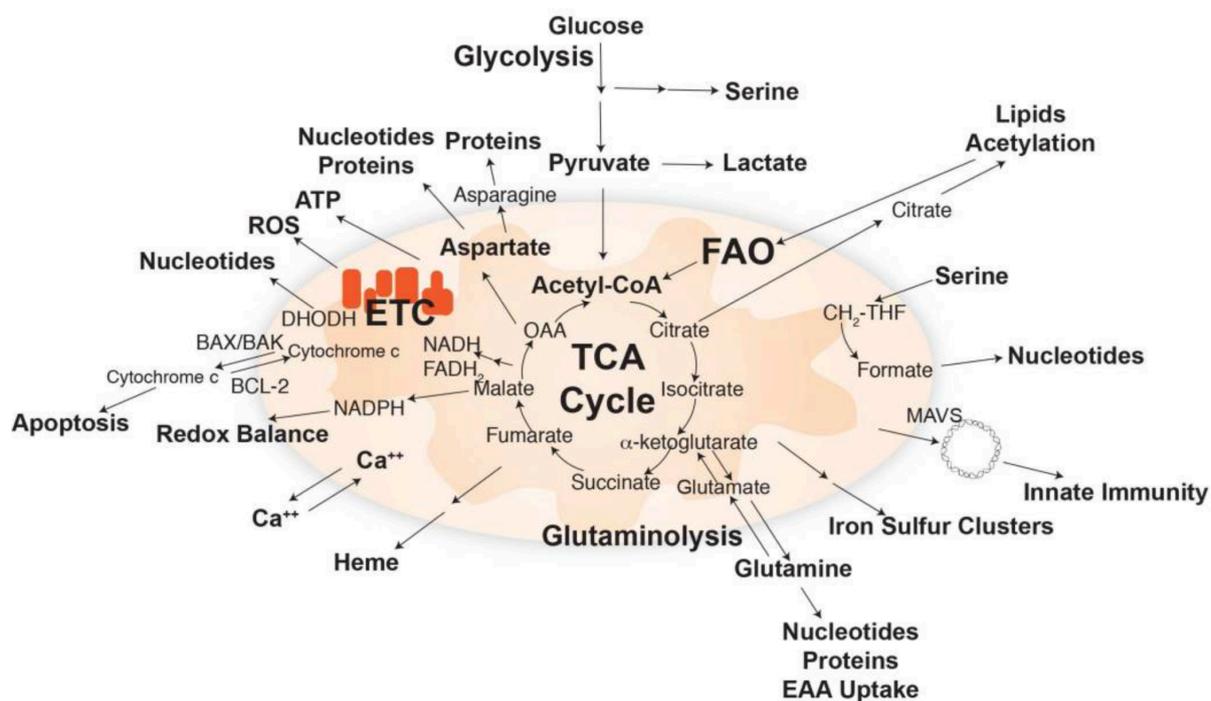


Figura 2 I mitocondri come centri biosintetici e di segnalazione. Il ciclo TCA utilizza substrati provenienti dalla glicolisi, dall'ossidazione degli acidi grassi e dal catabolismo degli aminoacidi per generare blocchi di costruzione ed elettroni ad alta energia (NADH e FADH₂) per alimentare la catena di trasporto degli elettroni (ETC). Nella figura sono indicati i principali prodotti biosintetici prodotti dai mitocondri e le vie di segnalazione regolate dalla funzione mitocondriale [11].

Smolkova et al. [12] hanno tracciato un modello che correla i cambiamenti metabolici durante lo sviluppo del tumore all'attivazione di una serie di geni. La prima fase dello sviluppo del tumore prevede l'attivazione di oncogeni che promuovono un fenotipo Warburg, parzialmente glicolitico. L'ipossia, causata dall'aumento della proliferazione cellulare e da un'angiogenesi non controllata, avvierebbe la seconda ondata di riprogrammazione metabolica che potenzia la glicolisi, portando a un fenotipo Warburg classico e alla soppressione quasi completa dell'OXPPOS. L'esacerbazione dello squilibrio tra l'elevato fabbisogno energetico e la carenza di nutrienti avvia la terza ondata di espressione genica per sostenere la sopravvivenza delle cellule tumorali attraverso la glutaminolisi. In questo processo, l' α -chetoglutarato (α -KG) derivato dalla glutammina può entrare nel ciclo del TCA con il ripristino dell'OXPPOS oppure essere substrato per la carbosilazione riduttiva. Entrambe le modalità di glutaminolisi possono funzionare contemporaneamente e fornire piruvato, lattato e NADPH. La glutaminolisi, in combinazione con un ciclo di Krebs parzialmente troncato nella sua direzione

canonica che coinvolge la succinato deidrogenasi, può consentire un ripristino parziale dell'OXPHOS. Infine, i segnali retrogradi provenienti dai mitocondri rivitalizzati, innescano la quarta ondata di riprogrammazione genica che può regolare la biogenesi e la degradazione mitocondriale.

Queste ondate di riprogrammazione (**Fig.3**) danno forma al fenotipo metabolico del cancro, la cui flessibilità metabolica consente alle cellule tumorali di adattarsi al microambiente in rapida evoluzione e di utilizzare in modo ottimale i substrati metabolici disponibili.

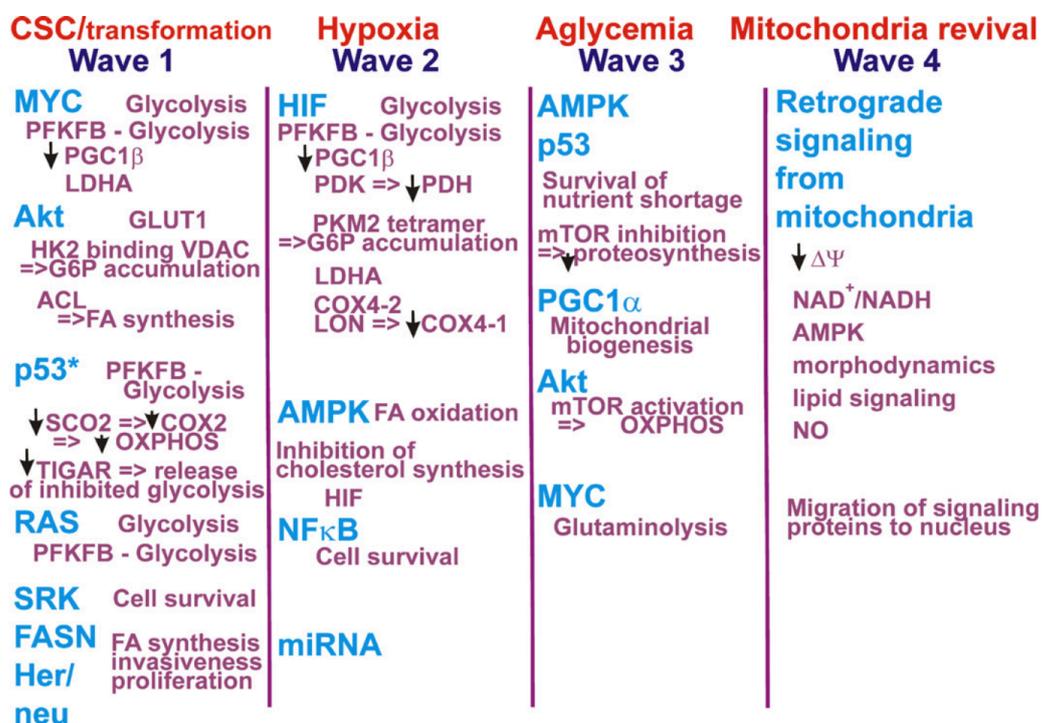


Figura 3 Ondata di espressione genica ipotizzata durante la carcinogenesi [12].

La trasformazione oncogenica o la perdita della funzione di oncosoppressori determina una crescita e una proliferazione incontrollate nelle cellule tumorali. I diversi meccanismi di induzione della malignità hanno in comune l'influenza sulla differenziazione, l'elusione dei *checkpoint* del ciclo cellulare e la resistenza all'apoptosi [6]. L'instabilità genomica si riflette nell'accumulo di nuove mutazioni e causa la perdita dei controlli del ciclo e del metabolismo cellulare [13]. Infatti, l'attivazione di oncogeni e/o l'inattivazione di geni soppressori del tumore portano ad alterazioni nella risposta ai segnali di crescita, con un conseguente aggiramento di fasi critiche di controllo, che

portano all'attivazione di vie stimulate da fattori di crescita. Diverse oncoproteine possono influenzare l'utilizzo dei substrati energetici, portando a cambiamenti metabolici che favoriscono la sopravvivenza delle cellule tumorali, indipendentemente dal controllo della proliferazione cellulare. In alcuni casi, l'oncogenesi determina una dipendenza da un substrato specifico o una sensibilità alla privazione di un substrato specifico. Alcuni esempi di questi regolatori sono il proto-oncogene *Myc*, il fattore di trascrizione hypoxia inducible factor 1 (HIF-1), la via PI3K/Akt/mTOR e l'oncosoppressore p53, tutti noti per essere espressi in modo anomalo o alterato in diversi tipi di cancro [14]. Sia la via di segnalazione *Myc* che quella PI3K/Akt/mTOR sono coinvolte nella crescita e nella proliferazione cellulare, ma hanno effetti specifici sulla glicolisi. Codificato dall'oncogene *Myc*, il fattore di trascrizione c-Myc regola positivamente l'espressione di geni che codificano per proteine coinvolte nella glicolisi, tra cui i trasportatori di glucosio (GLUT) e gli enzimi glicolitici esochinasi 2 (HK2), fosfofruttochinasi (PFK), lattato deidrogenasi A (LDHA) e piruvato deidrogenasi chinasi 1 (PDK1). La via PI3K/Akt/mTOR aumenta l'efficienza degli enzimi glicolitici HK2 e PFK attraverso la segnalazione di Akt [15]. Pertanto, sia la segnalazione di *Myc* che la via PI3K/Akt/mTOR sono iperattivate nelle cellule tumorali. L'oncosoppressore p53 ostacola naturalmente la glicolisi e favorisce l'OXPPOS attraverso la regolazione negativa di GLUT1, GLUT4 e HK2. Essendo il gene maggiormente mutato nei tumori umani, con conseguente perdita di funzione, contribuisce così all'aumento della glicolisi [16].

Tutte le vie e le proteine sopra citate interagiscono con il fattore di trascrizione HIF-1 α , sensibile alle oscillazioni di ossigeno intracellulari [9]. Alcuni esempi includono l'attivazione della subunità regolatoria HIF-1 α da parte di Akt e mTOR [17], l'inibizione di *Myc* da parte di HIF-1 α in condizioni di ipossia, con una successiva cooperazione tra le due molecole per promuovere la crescita delle cellule tumorali [18], e l'inibizione di HIF-1 α attraverso un'elevata espressione di p53 [19]. Questa interazione molecolare è particolarmente importante perché HIF-1 esercita effetti importanti sul metabolismo del glucosio quando è attivo. La subunità regolatoria di HIF-1, HIF-1 α , si stabilizza in condizioni di ipossia, consentendole di traslocare nel nucleo e formare un eterodimero con la proteina HIF-1 β [14]. Questo eterodimero induce l'espressione di diversi geni ipossico-responsivi [20]. In particolare, HIF-1 α induce l'espressione degli enzimi della glicolisi esochinasi 2 (HK2), fosfofruttochinasi 1 (PFK1), aldolasi A (ALDOA),

fosfoglicerato chinasi 1 (PGK1), piruvato chinasi (PK), e la lattato deidrogenasi A (LDH-A) [20]. HIF-1 promuove anche l'espressione di altre proteine chiave coinvolte nella glicolisi aerobica, tra cui i trasportatori di glucosio (GLUTs), come il GLUT-1 per aumentare l'assorbimento del glucosio e i trasportatori di monocarbossilati (MCTs), come MCT4 per il trasporto del lattato verso l'esterno delle cellule [21]. Inoltre, HIF-1 media la riduzione dell'OXPHOS attraverso l'attivazione trascrizionale della subunità NDUFA4L2, che inibisce il complesso I della catena di trasporto degli elettroni (ETC) [22].

La vulnerabilità del metabolismo cellulare tumorale suscita un grande interesse nell'investigare nuovi approcci terapeutici anti-cancro. L'avanzamento degli studi riguardanti la conoscenza e la comprensione della riprogrammazione metabolica ha infatti portato allo sviluppo di terapie antitumorali che hanno come bersaglio vari aspetti del metabolismo [15]. Inficiare farmacologicamente una delle vie metaboliche ha il potenziale di ridurre significativamente la crescita e la proliferazione del tumore, ampliando la finestra terapeutica del trattamento oncologico.

2.2 Il ruolo del Complesso I (CI) mitocondriale nella progressione tumorale

Con l'avvento del ventunesimo secolo, l'influenza fondamentale della funzionalità mitocondriale su tutte le fasi dell'oncogenesi, in particolare della trasformazione maligna, della progressione del tumore e della risposta al trattamento, è stata rivalutata e riconosciuta [23,24]. I mitocondri sono la chiave per quasi tutti gli aspetti della progressione tumorale, in quanto situati alla convergenza di numerose vie cataboliche e anaboliche, processando e generando metaboliti chiave che alimentano le vie di crescita, divisione e segnalazione. Di fatto, la OXPHOS ed in particolare il complesso I (CI) sono fondamentali non solo per la generazione di energia, il mantenimento dell'omeostasi redox e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ma sono anche indirettamente coinvolti nella regolazione delle vie biosintetiche [5]. Il CI, chiamato anche NADH-ubichinone-ossidoreduttasi, è l'enzima più grande e complesso della catena respiratoria mitocondriale (**Fig.4**). È un complesso multi-enzimatico composto, nei mammiferi, da 45 subunità, di cui 38 di codifica nucleare e 7 di codifica mitocondriale [25]. La sua funzione principale è quella di ossidare il NADH, prodotto attraverso la glicolisi e il TCA, in NAD^+ e di trasferire elettroni all'ubichinone. Questo

processo è accoppiato al rilascio di quattro protoni (H^+) dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana, fornendo il gradiente elettrochimico necessario per la produzione di ATP. Il CI gioca un ruolo centrale nel metabolismo energetico e nel mantenimento dello stato redox cellulare, regolando non solo il rapporto $NAD^+/NADH$ ma anche la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [26].

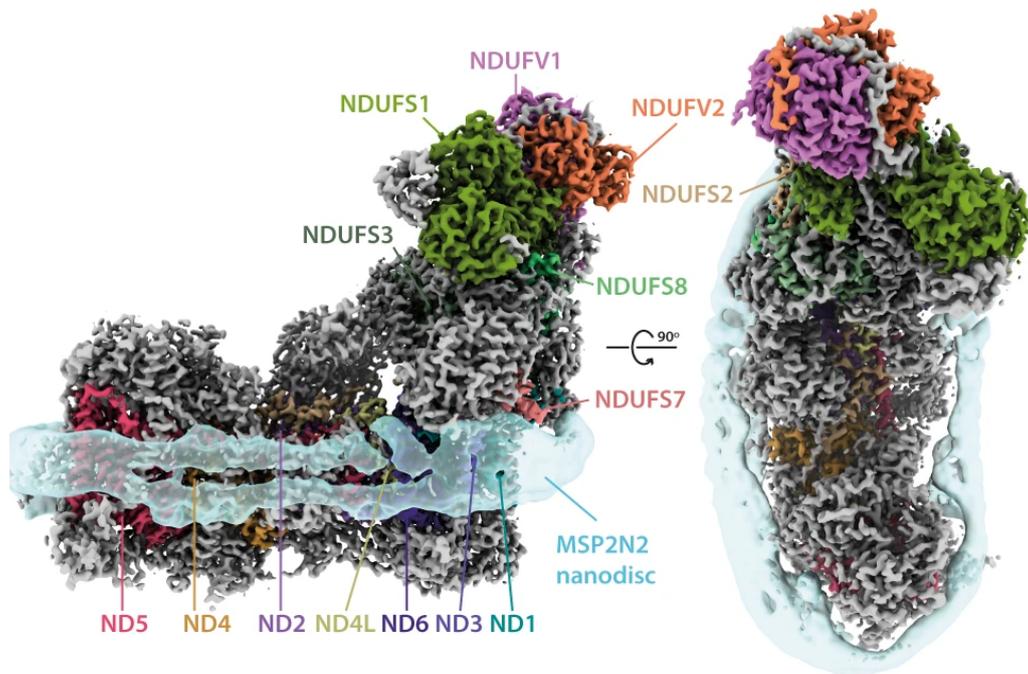


Figure 4 Panoramica della struttura del CI di *Bos taurus* ricostituito in nanodischi [27].

Le mutazioni a carico del DNA mitocondriale (mtDNA), in particolare quelle che ricadono in geni codificanti per il CI, sono riconosciute come modulatori della crescita e della progressione tumorale. Basandosi sull'ipotesi Warburg, è plausibile che mutazioni che compromettono la funzionalità del CI siano ritenute vantaggiose per la crescita e la trasformazione cancerosa, favorendo il metabolismo glicolitico. Analogamente, i primi studi riportavano che la compromissione del CI fosse associata ad un aumento delle proprietà tumorigeniche delle cellule tumorali. In realtà, l'impatto sulla progressione tumorale dipende dal tipo di mutazione, dalla carica mutazionale e dalle sue conseguenze bioenergetiche. L'effetto della disfunzione del CI sulla crescita e sulla sopravvivenza delle cellule tumorali può essere duplice e opposto, motivo per cui il CI è stato definito con il neologismo "oncojanus" [28].

In base agli effetti indotti sul CI, le mutazioni patogeniche identificate possono essere classificate in tre gruppi [29,30]:

- 1- Mutazioni che compromettono lievemente l'attività del CI, tra cui le tre comuni mutazioni patogeniche LHON (e.g. m.11778G>A/MT-ND4, m.3460G>A/MT-ND1 e m.14484T>C/MT-ND6);
- 2- Mutazioni che causano un severo danno all'attività del CI, senza comprometterne la stabilità e la funzionalità (e.g. m.14459G>A/MT-ND6);
- 3- Mutazioni che alterano la stabilità strutturale del CI (e.g. m.3571insC/MT-ND1)

Ogni cellula contiene migliaia di mitocondri e ogni mitocondrio contiene coppie multiple di mtDNA. Solitamente queste copie sono identiche, condizione definita come omoplasma. La condizione, invece, in cui all'interno dei mitocondri risiedono centinaia di molecole di mtDNA con differenti genotipi, è definita eteroplasma. Affinché una mutazione sul mtDNA correli con un fenotipo patogenico si deve raggiungere una soglia mutazionale, variabile per ogni tipo di mutazione [31]. La presenza di mutazioni omoplasmiche in geni che codificano per le subunità del CI, come m.11778G>A/MT-ND4 e m.14484T>C/MT-ND6, inducono una lieve disfunzione del CI, stimolando la produzione di ROS e potenziando la tumorigenesi di cibridi di osteosarcoma [32]. Allo stesso modo, la mutazione frameshift eteroplasmica m.12417insA/MT-ND5 esercita un effetto pro-tumorigenico *in vitro* e *in vivo*, stimolando la produzione di ROS che a sua volta porta all'attivazione della chinasi Akt, una proteina citosolica la cui attivazione porta alla crescita cellulare e alla resistenza all'apoptosi [33,34]. Tuttavia, quando questa mutazione raggiunge l'omoplasma, ne consegue una disfunzione severa del CI favorendo l'innescò della via apoptotica e impedendo la crescita tumorale (**Fig.5**).

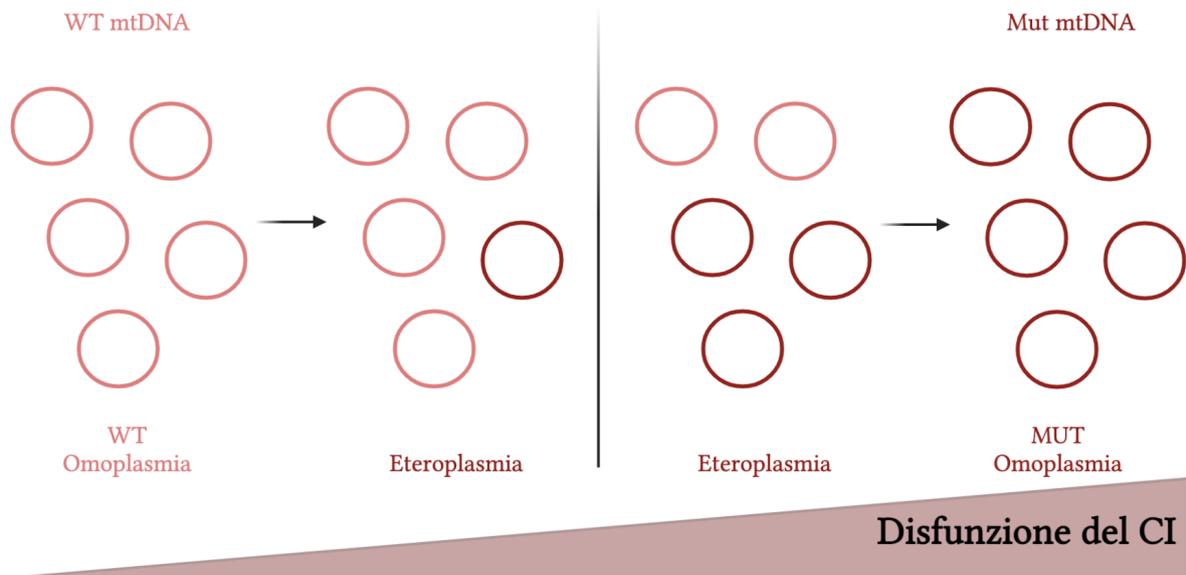


Figura 5 Il DNA mitocondriale esiste in più copie in ogni cellula. La condizione di omoplasma si raggiunge quando tutte le molecole di DNA mitocondriale (mtDNA) sono identiche (wild type (WT) o mutanti (MUT)), mentre l'eteroplasma si riferisce alla coesistenza di mitogenomi diversi. Quindi, per esercitare il loro effetto funzionale le mutazioni del mtDNA devono essere accumulate e superare una specifica soglia di mutazione che dipende dal tipo di mutazione e dal tessuto o dalla cellula colpita.

In questo contesto, evidenze sperimentali dimostrano che mutazioni in grado di compromettere la stabilità e l'attività del CI contribuiscono negativamente alla progressione tumorale [28]. In particolare, mutazioni omoplasmiche distruttive del CI sono associate *in vivo* ad un fenotipo oncocitico, quindi benigno e poco invasivo, grazie alla mancata stabilizzazione di HIF1- α , responsabile del caratteristico "effetto Warburg" [35]. Infatti, disfunzioni severe sul CI causano un decremento del rapporto $NAD^+/NADH$ [36], che può contribuire ad un'inibizione allosterica dell' α -chetoglutarato deidrogenasi [37], enzima del ciclo di Krebs, 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 [28,35]. L'alterato bilancio dei due metaboliti del ciclo di Krebs influenza la funzionalità di una classe di enzimi, prolidrossilasi (PHD), che regolano la stabilità di HIF1- α . Infatti, α -KG e succinato sono rispettivamente un attivatore ed un inibitore allosterico delle PHD [38,39]. 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 giustificando il fenotipo indolente e poco aggressivo osservato nei tumori oncocitici [40].

L'antitumorigenicità conseguente l'inibizione del CI e in generale della catena respiratoria mitocondriale ha tuttavia altri contribuenti oltre la destabilizzazione di HIF1- α . Da tempo è noto che le cellule umane prive di una catena respiratoria funzionale possono proliferare se coltivate in concentrazioni sovra-fisiologiche di piruvato [41]. Sebbene il piruvato possa servire come substrato biosintetico o influenzare lo stato redox della cellula promuovendo la rigenerazione di NAD⁺ [42,43], non è noto perché inverta gli effetti soppressivi dell'inibizione dell'ETC sulla proliferazione cellulare. L'attività dell'ETC, in particolare del CI, è cruciale per fornire il pool di equivalenti riducenti per la sintesi di aspartato [44], un aminoacido proteinogenico, che contribuisce anche alla sintesi di nucleotidi e all'anaplerosi del TCA. Infatti, un danno al CI causa l'auxotrofia da aspartato, influenzando negativamente la sintesi proteica e la proliferazione cellulare tumorale. Le cellule possono aumentare la disponibilità dell'aminoacido aumentando la sintesi *de novo* dall'ossalacetato oppure importando aspartato dall'ambiente extracellulare. Studi recenti hanno dimostrato come il supplemento di aspartato possa favorire il recupero della proliferazione delle cellule tumorali in caso di inibizione farmacologica dell'ETC [32], rivelandosi un determinante della sensibilità all'inibizione della catena respiratoria mitocondriale.

Le mutazioni distruttive del CI inducono una profonda crisi energetica seguita dall'aumento del rapporto AMP/ATP e dall'attivazione del principale sensore energetico *AMP-activated protein kinase* (AMPK), innescando una cascata di segnali che attiva le vie cataboliche e rallenta l'anabolismo [45–47]. L'attivazione di questa chinasi può riflettersi in una regolazione negativa della proliferazione cellulare e della traduzione proteica. Di fatto, una pleora di studi ha riportato che l'inibizione del CI innesca la cascata di segnalazione dell'AMPK che, a sua volta, inibisce la sintesi proteica e la crescita cellulare mediata dal complesso 1 del mammalian target of rapamycin (mTORC1) [48–51].

Complessivamente, da un lato, queste evidenze sottolineano quanto alcuni tumori necessitino di una stabilità minima del CI per avere una fosforilazione ossidativa funzionale, favorendo la progressione tumorale e impedendo la generalizzazione dell'ipotesi Warburg. Dall'altro, evidenziano quanto una grave disfunzione del CI possa essere svantaggiosa per la crescita tumorale, designandolo come un promettente target terapeutico (**Fig.6**).

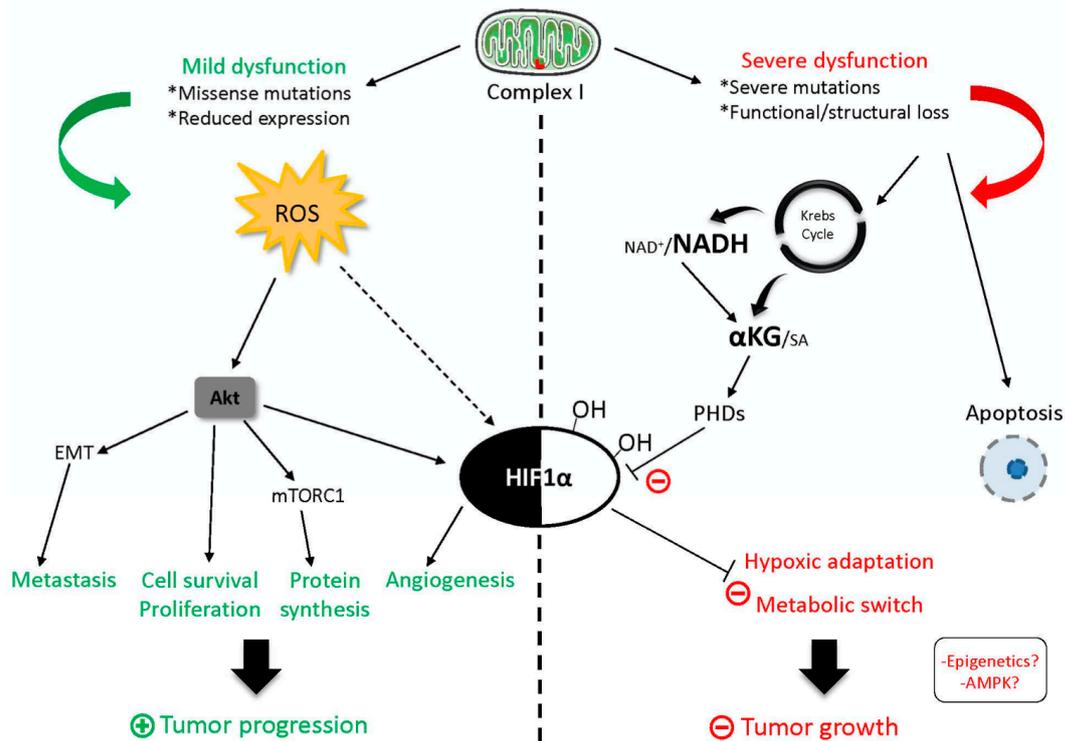


Figura 6 L'effetto *oncogiano* del CI sulla tumorigenesi. Lievi alterazioni funzionali del CI causano elevati livelli di ROS mitocondriali e la successiva attivazione della via oncogenica Akt/mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) che porta alla proliferazione e alla sopravvivenza delle cellule, alla transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e alla stabilizzazione di HIF1 α , favorendo così la progressione tumorale. Al contrario, una grave disfunzione del CI provoca l'accumulo di prodotti del TCA, NADH e α -KG, che impediscono la stabilizzazione di HIF-1 α , l'adattamento all'ipossia e, infine, l'arresto della crescita tumorale. Inoltre, la crisi energetica stimola la morte cellulare apoptotica [52].

2.3 Gli inibitori del CI come una potenziale terapia anti-tumorale

L'approccio terapeutico anti-metabolico è oramai considerato un approccio generalizzabile al trattamento oncologico, in quanto i tumori solidi altamente proliferanti spesso condividono percorsi comuni di riprogrammazione metabolica. Infatti, una delle più antiche chemioterapie contro il cancro si basa sull'inficiare il metabolismo tumorale. Gli antifolati (e.g. metotrexato), utilizzati fin dagli anni '40, grazie alla loro somiglianza strutturale con l'acido folico, si legano e inibiscono l'enzima diidrofolato reductasi, impedendo così la formazione di tetraidrofolato. Poiché il tetraidrofolato è necessario per la sintesi di purine e pirimidine, la sua carenza può portare all'inibizione della sintesi del DNA, dell'RNA e delle proteine, essenziali per la crescita e la sopravvivenza delle cellule normali e di quelle tumorali. Attualmente

esistono numerosi approcci antitumorali basati sul metabolismo, già applicati nei regimi terapeutici o in fase di sperimentazione in studi clinici e preclinici (**Fig. 7**) [53–55].

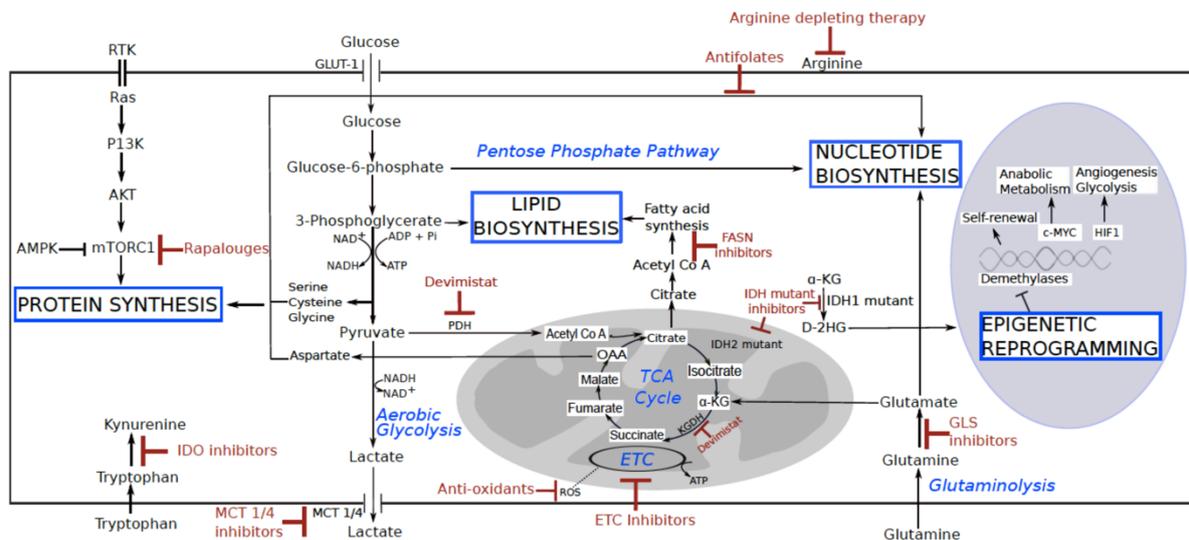


Figura 7 Rappresentazione schematica degli approcci mirati alla riprogrammazione metabolica del cancro. In una cellula tumorale in rapida proliferazione, l'energia viene spesso prodotta simultaneamente dalla glicolisi e dalla fosforilazione ossidativa. L'elevato assorbimento di glucosio sostiene l'aumento dei tassi glicolitici necessari per la biosintesi delle macromolecole (proteine, lipidi e nucleotidi), alimentati inoltre dagli intermedi del ciclo TCA che possono essere reintegrati dall'uso della glutammina come fonte di carbonio e azoto. Queste reazioni sono state riconosciute come validi bersagli per il trattamento del cancro e alcune delle attuali strategie metaboliche antitumorali sono indicate in rosso [53].

Oltre a colpire gli enzimi glicolitici e del ciclo di Krebs, l'importanza dell'OXPHOS nella progressione tumorale rende promettente l'esplorazione di strategie antitumorali contro la respirazione mitocondriale. In questo contesto, il CI è stato riconosciuto come un promettente bersaglio metabolico antitumorale, grazie ai suoi molteplici ruoli, quali il mantenimento dell'omeostasi redox, del metabolismo dell'aspartato e dell'adattamento all'ipossia delle cellule tumorali [36,56].

I biguanidi sono una classe di farmaci con proprietà ipoglicemizzanti utilizzati per il trattamento dei pazienti diabetici. Studi preclinici hanno dimostrato che la metformina e la fenformina possiedono un'attività antitumorale, stimolando i tentativi di promuoverle nella prevenzione e nella cura del cancro. Un meccanismo d'azione ampiamente investigato per spiegare le attività antitumorali dei biguanidi coinvolge la loro inibizione del CI mitocondriale o NADH deidrogenasi, causando una diminuzione della produzione di cAMP e l'attivazione di AMPK, una diminuzione dell'ossidazione del NADH in NAD⁺ e un rallentamento della produzione degli intermedi del TCA.

Infatti, l'espressione ectopica della subunità singola della NADH deidrogenasi, NDI1, in cellule tumorali con mutazioni del CI, blocca la capacità della fenformina di compromettere la proliferazione e il consumo di ossigeno [57]. La sensibilità alla fenformina è limitata alle cellule con una disfunzione mitocondriale; infatti, le cellule prive di mtDNA (143B Rho) risultano insensibili alla fenformina. Coerentemente con questi risultati, la fenformina inibisce la crescita di xenograft derivati da cellule tumorali con mutazioni del mtDNA (Cal-62,U-937), ma non da cellule prive di questi difetti (NCI-H929). Anche in questo caso, gli effetti della fenformina sulla crescita tumorale sono ristabiliti con l'introduzione di NDI1 nelle cellule mutanti mtDNA [46,57].

La metformina, altro derivato biguanidico, è il farmaco maggiormente prescritto per il trattamento antidiabetico in tutto il mondo [58]. Agli inizi del 2000, è stato riportato che la metformina inibisce il CI, provocando nella cellula un calo dell'ossidazione di NADH, riduzione del gradiente di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna e, in conclusione, un ridotto consumo di ossigeno [59]. Studi epidemiologici e retrospettivi hanno rivelato una minor incidenza di cancro in pazienti affetti da diabete sottoposti a trattamento farmacologico con metformina, rispetto a pazienti privi di diabete o diabetici con terapia alternativa [58]. Inoltre, studi *in vivo* rivelano che la metformina è in grado di inibire la crescita di diversi modelli di cancro [56,60,61] e riduce l'ipossia in sferoidi e xenograft, aumentando la suscettibilità alle radiazioni [62] e alla chemioterapia [63]. Nell'insieme, tutti questi dati hanno portato all'avvio di molteplici studi clinici, attualmente in corso, per determinare l'efficacia della metformina come potenziale agente antineoplastico [64]. La metformina, al contrario di altri inibitori noti del CI come il rotenone, è un inibitore reversibile non competitivo, sebbene le esatte interazioni molecolari del farmaco con l'enzima restino ancora da chiarirsi. Si tratta di una molecola scarsamente lipofila e quindi non in grado di oltrepassare le membrane cellulari. Pertanto, la sua distribuzione richiede trasportatori tessuto-specifici come il PMAT nell'intestino (trasportatore della membrana plasmatica delle monoamine) o il trasportatore di cationi organici 1 (OCT1) nel fegato [65–67]. Inoltre, una volta all'interno della cellula (**Fig. 8**), l'accumulo della metformina nei mitocondri dipende dal potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi$) che, a pH fisiologico, richiama il farmaco presente in forma cationica [56]. Negli studi preclinici è stato dimostrato che la fenformina possiede attività antitumorali più potenti della metformina [68–71]. Rispetto

alla metformina, la fenformina è più lipofila [72] e quindi più passivamente permeabile alle cellule, il che la rende meno dipendente dal trasporto attivo. Molte cellule tumorali e immunitarie esprimono livelli inadeguati di OCT limitando l'assorbimento della metformina, e di conseguenza la sua attività antitumorale a specifiche linee cellulari. Ad esempio, le linee cellulari di melanoma esprimono livelli molto più bassi di OCT2 rispetto alla linea cellulare di cancro al seno MDA-MB-468 [69] e la sovraespressione di OCT2 nelle cellule di melanoma ha aumentato la loro risposta al trattamento con metformina, mentre il knockdown di OCT2 in MDA-MB-468 ne ha diminuito la sensibilità al farmaco [69]. È stato inoltre riportato che OCT1 e OCT3 funzionano come trasportatori di metformina nelle cellule tumorali [73,74]. Nel complesso, mentre i biguanidi possono agire su più bersagli intracellulari per espletare le loro attività antitumorali, le differenze di targeting e l'efficacia possono essere dettate da differenze farmacodinamiche nella permeabilità cellulare in base all'espressione di OCT [46]. Tuttavia, anche se la fenformina, grazie alle sue proprietà strutturali e chimiche, riuscirebbe ad agire in uno spettro più ampio di cellule tumorali rispetto alla metformina, è stata ritirata dal commercio in molti Paesi perché associata ad una maggiore incidenza di acidosi lattica nel trattamento dei pazienti diabetici [75,76].

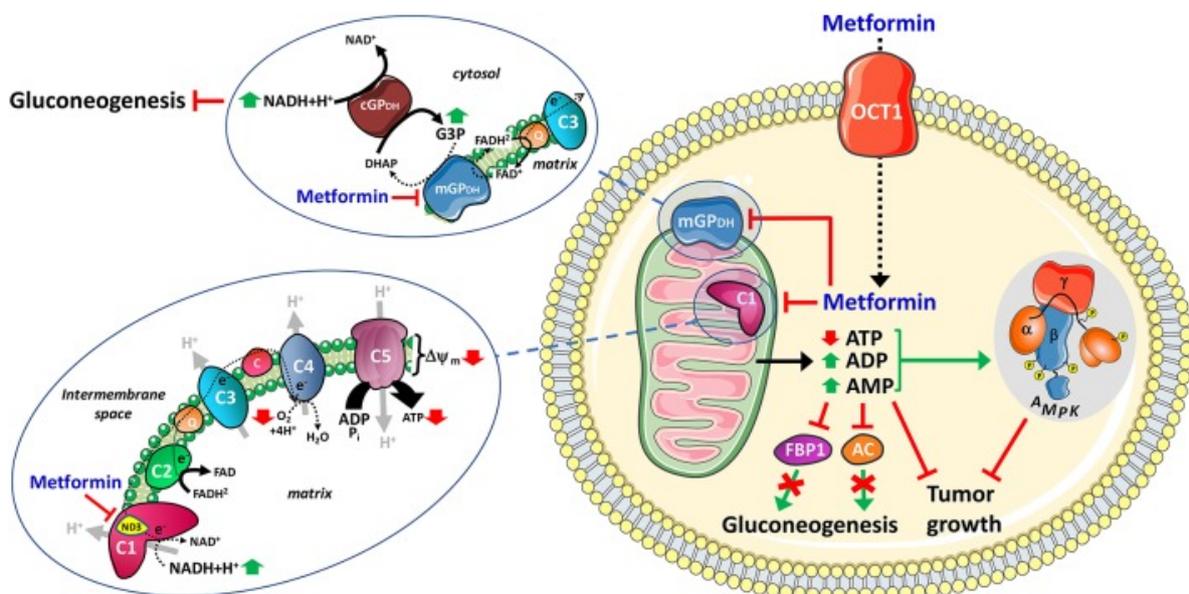


Figura 8 Meccanismo d'azione mitocondriale della metformina. Successivamente all'ingresso nella cellula, principalmente attraverso il trasportatore OCT1, i mitocondri sono il bersaglio primario della metformina, la quale esercita un'inibizione specifica sul C1 della catena respiratoria, presumibilmente attraverso un'interazione diretta con la subunità centrale ND3, e sulla glicerofosfato deidrogenasi mitocondriale (mGPDH). L'inibizione del C1 diminuisce l'ossidazione del NADH, il trasferimento di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna e il tasso di consumo di ossigeno, con conseguente

diminuzione del gradiente protonico ($\Delta\psi$) e riduzione della sintesi di ATP guidata dai protoni a partire da ADP e fosfato inorganico (Pi) [67].

La regressione tumorale successiva all'inibizione del CI da parte della metformina coinvolge diversi meccanismi, tra cui l'attivazione della proteina 5' AMP-attivata (AMPK), l'inibizione di mTORC1 (bersaglio meccanicistico del complesso di rapamicina 1), l'induzione di insufficienza da aspartato e l'inibizione del tumore all'adattamento all'ipossia [77–79]. Di conseguenza risulta chiaro che l'effetto antiproliferativo della metformina nel cancro non sia confinata all'attivazione di AMPK e, verosimilmente, tutte le cascate intracellulari promosse dal farmaco coesistono e interagiscono fra loro [58]. La metformina sopprime la gluconeogenesi, per cui il tasso di produzione di glucosio dal glicogeno nelle cellule epatiche si riduce e la sensibilità all'insulina e all'assorbimento del glucosio attraverso l'attivazione di AMPK aumenta nel fegato e nei tessuti periferici [80–82]. AMPK è un sensore metabolico pleiotropico: attiva i pathway catabolici, in concomitanza allo spegnimento dei processi anabolici attraverso l'inibizione di mTORC1 (bersaglio meccanicistico del complesso di rapamicina 1) [83]. Tutta questa cascata di eventi causa importanti cambiamenti metabolici, che si traducono con l'arresto della proliferazione delle cellule tumorali e inibizione della progressione neoplastica [84]. In aggiunta, l'attivazione di AMPK regola negativamente l'acquisizione di un fenotipo Warburg e la crescita tumorale *in vivo* [85]. Il trattamento con la metformina, in modelli neoplastici, causa un calo dei livelli sia di trascritto che di proteina di HIF-1 α mostrando, ancora una volta, il potenziale anti-Warburg e antiproliferativo del farmaco che inibisce il CI. Quindi, la metformina non solo contrasta la crescita delle cellule cancerose, ma impedisce anche il loro adattamento all'ipossia attraverso la riduzione dei livelli di HIF-1 α [79].

Nonostante i risultati convincenti sul potenziale della metformina nel promuovere la regressione tumorale, i trials clinici hanno fornito dati contrastanti sull'efficacia del farmaco nel trattamento oncologico [86]. Un'importante limitazione nella sperimentazione della metformina è rappresentata dal dosaggio del composto, il quale inibisce la proliferazione cellulare *in vitro* in un range di concentrazioni da 1mM a 50mM, generalmente impossibili da raggiungere nei pazienti [87]. La maggior parte degli effetti della metformina sono stati osservati a concentrazioni superiori a quelle

terapeutiche e inoltre la biodisponibilità del farmaco a livello tumorale è ancora controversa [67]. Questo potrebbe in parte giustificare la parziale risposta alla terapia e che quindi la concentrazione raggiunta a livello del tumore non è sufficiente ad inibire il CI. Studi recenti dimostrano che l'efficacia di un inibitore del CI è fortemente influenzata dalla disponibilità di glucosio [88] e, più in generale, dall'ambiente extracellulare nel quale proliferano le cellule [78]. Viceversa, una vasta collezione di studi indica che la metformina, così come altri inibitori del CI più specifici, potrebbe modulare la composizione e il fenotipo del microambiente tumorale, una nicchia tissutale che comprende cellule trasformate e normali, che riveste un ruolo emergente nella biologia del tumore stesso [89–91]. In aggiunta, il trattamento con la metformina causa effetti aspecifici sulle cellule tumorali e in generale nei tessuti, che vanno al di là dell'inibizione del CI e gli stessi problemi di dosaggio riscontrati nella sperimentazione potrebbero accompagnarsi a meccanismi non associati al blocco dell'OXPPOS [87]. Per esempio, è stato dimostrato che la metformina, oltre ad agire sul CI, cambia l'assetto epigenetico delle cellule tumorali, suggerendo la possibilità che l'effetto antitumorale di questo farmaco possa non essere dovuto al CI. È evidente quindi che l'attività antitumorale del farmaco causa effetti pleiotropici, che vanno oltre l'inibizione del CI. In conclusione, l'utilizzo della metformina nel trattamento oncologico presenta diverse limitazioni, marcando la necessità di studiare nuovi composti selettivi per il CI.

Tra questi, lo IACS-010759 è un potente inibitore del CI attualmente in sperimentazione clinica derivato da composti in grado di ridurre la risposta di HIF-1 e di inibire la proliferazione di neoplasie del sistema nervoso e di cellule difettose della glicolisi derivate dalla leucemia mieloide acuta (AML) [92]. Gli xenotrapianti derivati dalle stesse cellule tumorali hanno permesso di definire le giuste dosi *in vivo* e hanno confermato un effetto antitumorale di IACS-010759, supportandone l'uso in uno studio di fase I in soggetti con tumori e linfomi avanzati, recentemente completato (ClinicalTrials.gov ID: NCT03291938).

La validazione preclinica ha dimostrato l'efficacia *in vitro* e *in vivo*, in modelli di tumore non a piccole cellule e in linfomi non Hodgkin a cellule B di EVT-701, un nuovo inibitore del CI, altamente potente e selettivo. L'inibitore ha mostrato una maggiore efficacia di inibizione della proliferazione in modelli di tumore non a piccole cellule

caratterizzati da bassi livelli di espressione della serina/treonina chinasi LKB1 e in linfomi non Hodgkin a cellule B che esprimono bassi livelli della gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (GAPDH) [93]. Complessivamente, questi risultati supportano ulteriori indagini su EVT-701 in ulteriori modelli preclinici e nei clinical trials, mirando alla stratificazione e alla selezione dei pazienti.

Un altro inibitore emergente è il BAY 87-2243 (**Fig. 9A**), un inibitore specifico del CI identificato a partire da uno screening *high-throughput* di composti specificamente testati per colpire HIF-1 [94]. BAY 87-2243 condivide alcuni degli effetti molecolari dovuti alla deplezione del CI, tra cui una maggior efficacia in carenza di glucosio, un calo del consumo di ossigeno, l'attivazione di AMPK e la destabilizzazione di HIF-1 α [94–96]. Recenti studi di BAY 87-2243 hanno rivelato la sua efficacia nel ridurre la proliferazione del cancro al polmone non a piccole cellule [94] e ad indurre la morte cellulare in cellule di melanoma [95,96], impedendone la crescita tumorale *in vivo* [94–96].

Uno screening farmacologico high-throughput ha permesso di identificare EVP4593 (**Fig. 9B**), una molecola chinazolinica, conosciuta come inibitore di NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) e recentemente identificata come selettiva per il CI. EVP4593 ha rivelato la sua efficacia nel contrastare la proliferazione *in vitro* in assenza di glucosio e la capacità di ridurre il volume tumorale *in vivo* se utilizzata in associazione farmacologica con il bevacizumab, inibitore del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) [97,98].

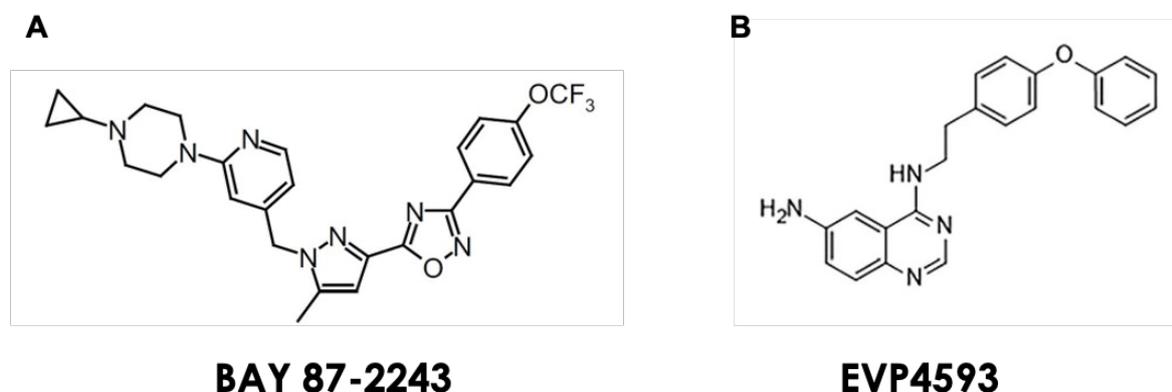


Figure 9 (A) Struttura chimica di BAY 87-2243 [94]. (B) Struttura chimica di EVP4593 [98].

Il crescente numero di evidenze riguardanti l'attività anti-proliferativa degli inibitori del CI corrobora l'ipotesi che un blocco completo dell'enzima è determinante nella regressione neoplastica e apre le strade per un nuovo possibile approccio terapeutico per il trattamento di tumori solidi, nei quali, in generale, è richiesta la funzionalità mitocondriale e l'adattamento all'ipossia [52]. Nonostante diversi studi mostrino i progressi nello sviluppo di nuovi inibitori del CI e le annesse proprietà antitumorali, nessuna di queste molecole è attualmente utilizzata nella pratica clinica. In primo luogo, gli studi condotti finora non hanno preso in considerazione i possibili effetti dei composti sui bersagli molecolari diversi dal CI, evidenziando il problema della loro specificità. In secondo luogo, l'efficacia degli inibitori come agenti antitumorali è stata determinata in un numero limitato di modelli tumorali, trascurando il fatto che l'efficacia degli inibitori è stata determinata in un numero limitato di modelli tumorali, trascurando l'istotipo tumorale e lo stato metabolico. Infine, i meccanismi alla base degli effetti di queste molecole non sono stati sufficientemente investigati, il più delle volte associando il loro effetto antiproliferativo alla morte cellulare apoptotica [89,99]. Complessivamente, non sorprende che il CI sia oramai riconosciuto come un attore chiave nello sviluppo e nella progressione del cancro, ma saranno necessari ulteriori studi su modelli umani per validare la potenza delle nuove molecole in grado di inficiare la funzionalità del complesso respiratorio.

2.4 Il ruolo dell'oncosoppressore p53 nell'adattamento metabolico in condizioni di deficit della catena di trasporto degli elettroni

Negli ultimi decenni la riprogrammazione metabolica delle cellule tumorali è emersa come una nuova area di indagine, delineando contestualmente il ruolo cruciale di diversi fattori di trascrizione. In un contesto tumorale con danno funzionale al CI e di carenza di nutrienti, il gene oncosoppressore TP53 può rivelarsi fondamentale nel contribuire all'adattamento metabolico, modulando l'equilibrio tra le vie ossidative e glicolitiche [16]. Mutazioni missenso nel gene *TP53* ricorrono nel 50% dei tumori umani, causando la perdita dell'attività dell'oncosoppressore wild type e l'acquisizione di nuove funzioni pro-oncogeniche che promuovono la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali [100]. Nei tumori p53 wild type, il fatto che p53 ostacoli o favorisca la

crescita del cancro rimane un aspetto ancora da approfondire [101]. L'attivazione di AMPK in seguito alla deprivazione di glucosio conduce all'attivazione di p53 attraverso la fosforilazione di un residuo di serina, inducendo un blocco persistente del ciclo cellulare in fase G1 [102]. Durante lo stress genotossico, l'attivazione di p53 induce un arresto del ciclo cellulare in fase G1, suggerendo che nei tumori con stress metabolico vengono attivati gli stessi bersagli, inducendo un blocco persistente della proliferazione cellulare. L'attivazione di AMPK, oltre che attivare p53, può agire positivamente sul complesso 2 di sclerosi tuberosa (TSC2), promuovendo l'inibizione di mTOR e quindi il blocco della proliferazione cellulare. Inoltre, la condizione di ipoglicemia attiva p53 inibendo il suo regolatore negativo E3 ubiquitina ligasi (EDD) in seguito all'attivazione del complesso proteico fosfatasi PP2A-B55 α [103]. L'attivazione di PP2A è stata osservata anche in seguito al danno indotto al CI, tramite l'utilizzo della metformina, associato alla condizione di ipoglicemia, innescando l'apoptosi e conducendo le cellule al collasso metabolico [88]. Sebbene in quest'ultimo studio la p53 non sia stata considerata, sarebbe interessante capire se possa influenzare il destino della cellula in crisi metabolica.

Un ruolo emergente di p53 è svolto nella regolazione del metabolismo degli amminoacidi. Alcuni tumori sono noti essere auxotrofi per specifici amminoacidi [104], una condizione che potrebbe essere esacerbata in condizioni di deficit generale dell'ETC o rallentamento del TCA. Infatti, l'attività dell'ETC, in particolare del CI, è cruciale per la sintesi dell'aspartato [44], necessario per la sintesi dei nucleotidi e delle proteine. Inoltre, la riduzione dei livelli di aspartato e glutammina contribuisce alla diminuzione dell'asparagina intracellulare, un fattore di scambio aminoacidico che favorisce l'assorbimento di serina, arginina e istidina extracellulari [105]. Sorprendentemente, l'attivazione di p53 in seguito ad una crisi metabolica causata da un blocco della respirazione mitocondriale può contribuire a ripristinare la quota di aminoacidi, ad esempio promuovendo l'espressione del trasportatore di glutammato/aspartato SLC1A3 [106]. Inoltre, è noto che p53 regola positivamente l'espressione di *SLC7A3*, aumentando l'assorbimento di arginina e favorendo complessivamente la sopravvivenza delle cellule tumorali [107].

Lievi 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 [108]. L'aumento dei ROS può, da un lato, attivare cascate di segnalazione oncogenica [109] e, dall'altro, se eccessivamente prodotto, esercitare un effetto citotossico [110]. In questo scenario, P53 è un attore critico anche nelle risposte cellulari allo stress ossidativo [111]. L'espressione dei geni regolati da p53 con funzioni antiossidanti sembrano essere sensibili a livelli basali di p53; viceversa, elevati livelli di p53, in risposta ad uno stress ossidativo prolungato, promuovono l'attivazione di geni pro-ossidanti [111–113]. Attraverso l'attivazione del regolatore della glicolisi e dell'apoptosi indotto da TP53 (TIGAR), p53 può effettivamente favorire livelli pro-tumorigenici di ROS [114]. 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 [115]. Quindi, l'incremento di espressione di TIGAR, in seguito al deficit del CI, potrebbe mitigare gli eccessivi livelli di ROS, sottolineando una funzione citoprotettiva indiretta mediata da p53. Se questa situazione si verifica quando il metabolismo energetico è fortemente compromesso, come nel caso di mutazioni distruttive del CI, può verificarsi un cortocircuito e il destino della cellula diventa dipendente dal contesto metabolico. Se la p53 può quindi agire favorendo la sopravvivenza nelle cellule con un lieve danno al CI, evitando che i livelli di ROS aumentino oltre la soglia tollerabile, la sua regolazione positiva della sintesi della citocromo c ossidasi 2 (SCO2) mostra un altro lato della medaglia. 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 [116]. Tuttavia, l'espressione di SCO2 è potenziata da p53 solo in condizioni di grave stress genotossico e ossidativo, come preludio a un innesco apoptotico. Infatti, è stato dimostrato che SCO2 promuove la produzione di ROS, il cui aumento è un prerequisito per l'aumento dell'attività chinasi dell'apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-1), un componente chiave della via apoptotica indotta dai ROS. SCO2 induce la dissociazione di ASK-1 dal suo inibitore tioredoxina, consentendo una fosforilazione attivante di ASK1 a Thr845, che porta infine a un'apoptosi guidata da p38 e JNK [117].

Uno studio condotto da Buzzai et al. ha rivelato l'effetto del farmaco metformina sulla crescita tumorale di linee cellulari isogeniche di cancro del colon, HCT116^{p53+/+} e HCT116^{p53-/-}. Il trattamento con metformina inibisce selettivamente la crescita tumorale degli xenograft di HCT116 p53^{-/-}. Inoltre, in presenza del farmaco, esclusivamente le cellule HCT116 p53^{+/+} e non le cellule HCT116 p53^{-/-} attivano processi autofagici, contribuendo alla sopravvivenza delle cellule tumorali sia *in vitro* che *in vivo* [118]. Parallelamente, per compensare l'inibizione della fosforilazione ossidativa dipendente dalla metformina, le cellule p53^{+/+}, ma non quelle p53^{-/-}, aumentano il tasso di glicolisi. L'attivazione di AMPK è necessaria per questo cambiamento metabolico, poiché gli effetti compensatori della p53 wild-type non si osservano nelle cellule prive della chinasi (AMPK^{-/-}). Questi dati suggeriscono che la p53 può regolare molteplici risposte metaboliche adattative che compensano la compromissione bioenergetica, non solo promuovendo la fosforilazione ossidativa mitocondriale come suggerito in precedenza [116].

Complessivamente, un ruolo di p53 wild type nei tumori con un CI non funzionale, merita ulteriori approfondimenti, in quanto potrebbe rivelarsi cruciale nelle risposte adattative che favoriscono la sopravvivenza o la persistenza delle cellule tumorali durante una crisi metabolica (**Fig. 10**). Un esempio potrebbe essere il caso specifico degli oncocitomi, tumori indolenti con un CI non assemblato, in cui questo soppressore tumorale non sembra essere promotore della tumorigenesi. Verosimilmente, i pazienti che presentano tumori nulli per p53, spesso resistenti alle chemioterapia o radioterapia, potrebbero trarre beneficio dal trattamento con un inibitore selettivo per il CI, in misura più efficace rispetto ai tumori con una proteina p53 wild-type.

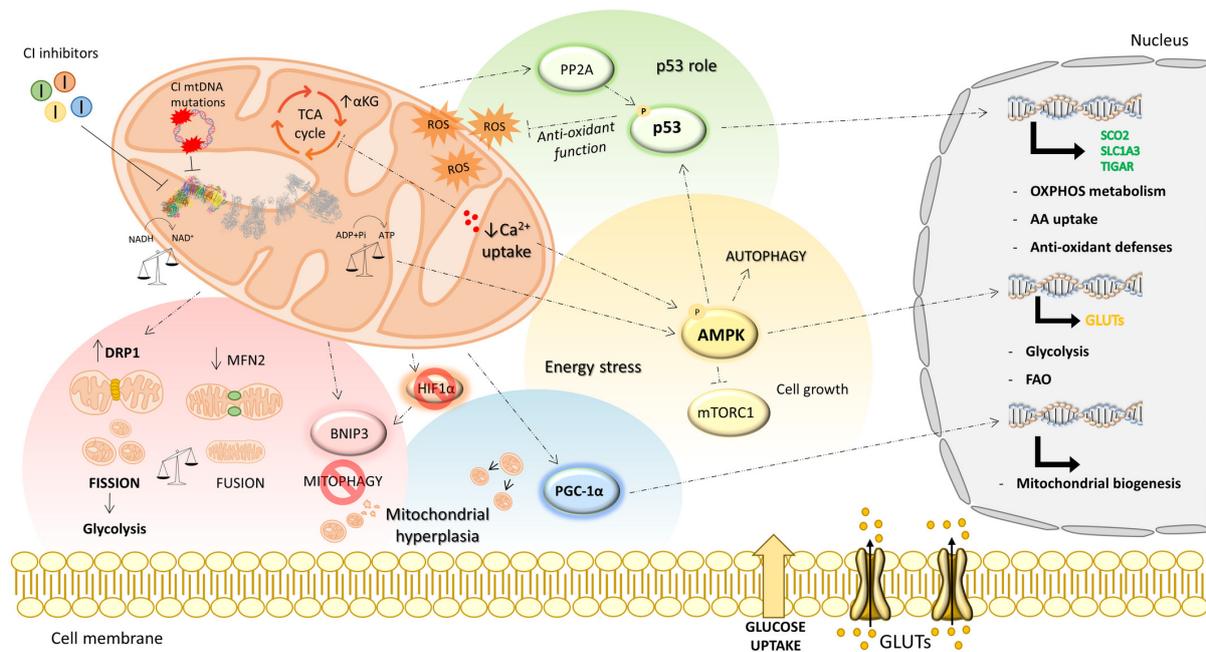


Figura 10 Panoramica delle risposte adattative in seguito all'inibizione/ablazione del CI. Le cellule prive del CI mitocondriale o trattate con i suoi inibitori sviluppano risposte adattative per superare il deficit energetico e metabolico. Successivamente all'inibizione del CI, la stimolazione di AMPK e PP2A induce probabilmente l'attivazione di p53, che può svolgere un ruolo fondamentale nell'adattamento metabolico. Infatti, p53 permette di superare la disfunzione energetica sostenendo la respirazione mitocondriale attraverso l'espressione di SCO2, un regolatore dell'assemblaggio del complesso IV. L'attivazione di p53 può anche contribuire a ridurre l'apporto di aminoacidi aumentando l'espressione del trasportatore SLC1A3. Infine, la regolazione positiva di TIGAR da parte di p53 conferisce alle cellule tumorali con deficit di CI un effetto citoprotettivo che le salvaguarda dalla sovrapproduzione di ROS [119].

3. SCOPO

Il CI mitocondriale svolge un ruolo cruciale durante la progressione tumorale, la formazione di metastasi, e la resistenza alla chemioterapia a causa del suo contributo determinante al controllo del metabolismo cellulare, all'adattamento all'ipossia, ed alla suscettibilità all'apoptosi [52]. Di fatto, l'ablazione genetica del CI *in vivo* rallenta la crescita tumorale, confinando i tumori aggressivi ad uno stato di bassa proliferazione, ed ampliando, così, lo spettro dei possibili interventi terapeutici per il trattamento oncologico [34,45,56,120,121].

Nonostante diversi inibitori del CI siano stati proposti come possibili agenti terapeutici in diversi contesti sperimentali preclinici [52,64,93,120], il meccanismo d'azione, l'efficacia, e la specificità di questi farmaci restano ancora poco approfonditi. Poiché il CI è un attore centrale della bioenergetica cellulare, è necessario un dosaggio finemente regolato dei farmaci per ambire a colpire selettivamente le cellule tumorali, limitando

effetti collaterali sulla componente non tumorale. Il seguente studio nasce quindi dall'esigenza di ampliare lo spettro di farmaci antitumorali più specifici ed efficaci, contribuendo all'introduzione clinica di nuovi farmaci con una potenza maggiore rispetto a quelli attualmente conosciuti. La prima parte del lavoro racchiude una serie di studi *in vitro* mirati ad approfondire la specificità e la potenza sia di inibitori noti, quali la metformina, che di molecole di nuova sintesi, BAY 87-2243 ed EVP 4593. Inoltre, lo sviluppo di xenograft in topi immunodepressi e successivamente trattati con gli inibitori del CI permette di ricapitolare farmacologicamente l'inibizione del CI e di valutarne l'eventuale efficacia antiproliferativa *in vivo*.

In un contesto di danno funzionale del CI e di mancanza di nutrienti, il gene *TP53* che codifica per l'oncosoppressore più frequentemente mutato nei tumori umani (p53), può svolgere un ruolo cruciale nell'adattamento metabolico modulando l'equilibrio tra le vie ossidative e quelle glicolitiche [16]. A tal proposito, la seconda parte dello studio si focalizza sul comprendere se l'efficacia degli inibitori possa dipendere dallo stato mutazionale di *TP53*, in quanto l'identificazione dei meccanismi adattativi in base allo stato genetico dei più noti driver della tumorigenesi permetterebbe di prevenirli oppure di indirizzare le scelte terapeutiche in medicina di precisione.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Colture cellulari

In questo studio sono state utilizzate le seguenti 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. Il *genome editing* genera una mutazione frameshift in omozigosi che causa un prematuro codone di stop e la sintesi di una proteina tronca, non funzionale. Inoltre, mediante tale procedura sperimentale, sono stati ottenuti i cloni singenica *NDUFS3*^{+/+} che

rappresentano la linea di controllo CI competente [121]. 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. Il *genome editing* genera una mutazione frameshift in omozigosi che causa un prematuro codone di stop e la sintesi di una proteina tronca, non funzionale. Dalla selezione clonale, successiva al *genome editing*, si è ottenuta anche la linea singenica *NDUFS3*^{+/+} [121]. 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 [122]. 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 [123]. 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 di tumore ovarico SKOV3, isolata dall'ovaio di una paziente affetta da adenocarcinoma ovarico, con uno stato genetico *TP53* nullo, in cui è stata introdotta una mutazione frameshift nel gene *NDFUS3* grazie al sistema CRISPR/Cas9, usando una guide indirizzata sull'esone 2 TGTCAGACCACGGAATGATG [123]. Dalla selezione clonale, si è ottenuta la linea

singena *NDUFS3^{+/+}*. La linea è stata acquistata da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

- La linea cellulare di melanoma murino B16-F10, in cui è stata introdotta una mutazione frameshift nel gene *NDUFS3* grazie al sistema CRISPR/Cas9, usando una guida indirizzata sull'esone 3 TTGTGGGGTCACATCACTCCG [124]. Dalla selezione clonale, si è ottenuta la linea singena *NDUFS3^{+/+}*. La linea è stata acquistata da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

4.2 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).

4.3 Trattamenti

Per i saggi di proliferazione *in vitro*, ai terreni sono stati aggiunti inibitori del CI mitocondriale, in particolare:

- **BAY 87-2243**, *1-Cyclopropyl-4-{4-[(5-methyl-3-{3-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl}-1H-pyrazol-1-yl)methyl]pyridin-2-yl}piperazine* (Bayer Pharma AG, Wuppertal, Germany). Si tratta di un composto in grado di inibire

l'attività funzionale di CI [94], già noto in letteratura per le sue proprietà antitumorali.

- **EVP4593**, 4-N- [2-(4 phenoxyphenyl) ethyl] quinazoline-4,6-diamine. La sua attività inibitoria del CI è stata caratterizzata dal Dr. Krishnathas [98]. Già noto in letteratura per il suo effetto antitumorale [97] (SML0579 – SIGMA).
- **Metformina**, 1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride. Si tratta di un farmaco ampiamente utilizzato nella terapia di malattie metaboliche quale il diabete e noto inibitore del CI [59] (D150959-5G - SIGMA).

EVP 4593, BAY 87-2243 sono stati diluiti in dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich #D2650) e conservati a -20°C. Prima di ogni esperimento, tutti e tre i farmaci sono stati disciolti nel terreno di coltura per raggiungere la concentrazione finale indicata. Per ogni trattamento, è stata calcolata la concentrazione finale di DMSO nel terreno di coltura ($\leq 0,1\%$), che è stata utilizzata come veicolo di controllo nella condizione non trattata.

4.4 Saggio di proliferazione con *IncuCyte S3*

La proliferazione e la morfologia delle linee cellulari in esame è stata valutata utilizzando il sistema *IncuCyte live-cell Analysis System*, il quale permette di quantificare in tempo reale, attraverso un sistema automatizzato di *live-imaging*, la proliferazione cellulare. 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.11**).



Figura 11 Immagine dello strumento *IncuCyte® Live-Cell Analysis Systems*

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 (**Tabella 1**).

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
SKOV3 ^{NDUFS3+/+; p53-/-}	3000
SKOV3 ^{NDUFS3-/-; p53-/-}	3000
B16-F10 ^{NDUFS3+/+}	1000
B16-F10 ^{NDUFS3-/-}	1000

Tabella 1 Numero di cellule seminate per i saggi di proliferazione

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 (**Fig.12**) che viene impostata dall'operatore 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. Per ogni combinazione cellulare, le linee nulle e wild-type per *NDUFS3*, rispettivamente, sono state seminate simultaneamente ed è stata applicata la stessa maschera di confluenza.



Figura 12 *Incucyte Vessel-View*. L'analisi della confluenza cellulare viene effettuata applicando una Maschera (in giallo) in grado di riconoscere le 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.

4.5 Saggio di apoptosi

L' induzione dell'apoptosi in seguito a trattamenti farmacologici è stata determinata attraverso il saggio Incucyte Caspase-3/7 (Sartorius #4440). Le cellule (SKOV3, HCT116 e B16-F10) sono state coltivate in una piastra a 96 pozzetti in presenza di una concentrazione di 25mM di glucosio. Dopo 24 ore, le linee cellulari sopra citate sono state trattate con gli inibitori farmacologici del CI (metformina, EVP 4593 e BAY 87-2243, rispettivamente) ed in presenza di 5 μ M del colorante verde Incucyte Caspasi-3/7 seguendo il protocollo del produttore. Al termine del trattamento, la piastra è stata incubata per 72 ore in IncuCyte S3 e le immagini (4/pozzetto) sono state acquisite con ingrandimento 10X a intervalli di 2 ore, sia in contrasto di fase che nel canale verde fluorescente. Per ogni linea cellulare, è stato eseguito il trattamento con la staurosporina (100 nM, #S4400), noto induttore dell'apoptosi, come controllo positivo. Per ogni condizione sperimentale, la maschera di confluenza idonea per l'identificazione degli oggetti fluorescenti è stata impostata dal software di analisi integrato in Incucyte. Il numero totale di cellule positive al segnale verde è stato quantificato con un ingrandimento di 10x in tre campi visivi per ogni condizione ed i dati sono espressi come percentuale di cellule apoptotiche [(numero di cellule verdi/numero di cellule totali)].

4.6 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.13**).

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 capside e per gli enzimi virali. Il risultato sarà la formazione di un vettore virale ricombinante.

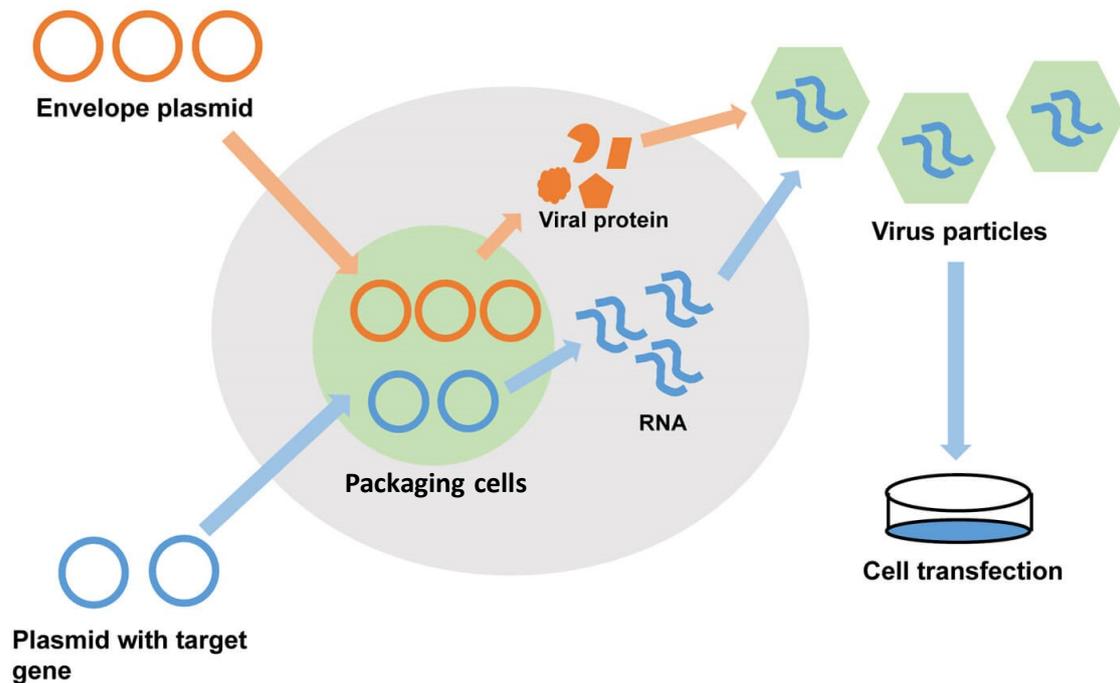


Figura 13 Rappresentazione schematica del processo di ricombinazione che avviene nelle cellule packaging.

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 2 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 ug/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 puromicina 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 puromicina, 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 puromicina, 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* esprime 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.

Il costrutto pMSCV_*TP53* wild-type è stato generato per retro-mutagenesi sito specifica, sfruttando il plasmide pMSCV_*TP53*c.467G>C già ingegnerizzato precedentemente nel nostro gruppo. La sequenza dell'inserto retro-mutato è stata verificata attraverso il sequenziamento Sanger. Dall'elettroferogramma (**Fig. 14**) si osserva la sostituzione della base citosina in guanina in posizione 467, confermando che la sequenza wild-type del cDNA di p53 clonato è stata ripristinata. La popolazione di cellule trasdotte è stata selezionata aggiungendo puomicina (0.5ug/mL), grazie alla presenza del gene per la resistenza presente nel plasmide pMSCV_vuoto di partenza. I cloni più adatti a generare i pool sono stati selezionati andando a valutare l'espressione della proteina di interesse (i.e. p53).

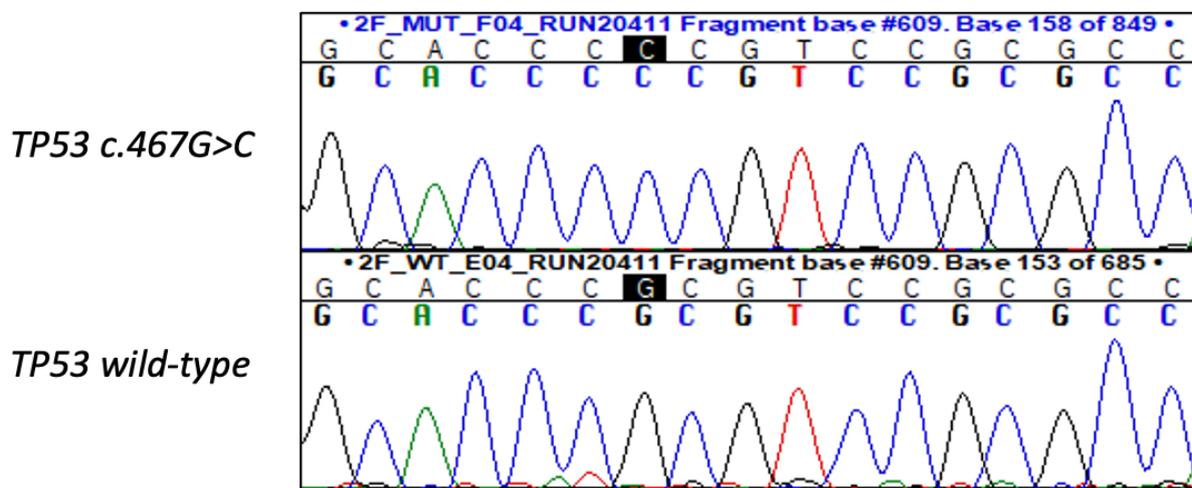


Figura 14 Elettroferogrammi delle sequenze del gene *TP53* mutato (c.467G>C) e wild-type.

Dalla selezione clonale derivata dall'infezione virale con il plasmide pMSCV_*TP53*c.467G>C sono stati selezionati quattro cloni (B8, C7, D7 e G8); altrettanti cloni sono stati selezionati dall'infezione virale con il plasmide pMSCV_*TP53* wild-type (D7, G8, B10 e A11). Sia nel caso del pMSCV_*TP53* wild-type che pMSCV_*TP53*c.467G>C. Dalle **Fig.15A-B**, per i cloni selezionati, si ha una elevata intensità per la banda attesa all'altezza di p53 (53KDa) indice di una probabile integrazione del costrutto in una zona di cromatina aperta e senza riarrangiamenti del transgene di interesse. Infine, dalla selezione clonale derivata dall'infezione virale con il plasmide pMSCV_vuoto sono stati selezionati 5 cloni (H10, D9, D10, F9 e F1) in cui

non vi fosse espressione della proteina p53 (**Fig. 15C**). Il gruppo di cloni selezionato, per ogni costrutto, è stato utilizzato per la generazione dei tre specifici pool cellulari: HCT116^{NDUFS3-/-; p53-/-}, HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+}, HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P}.

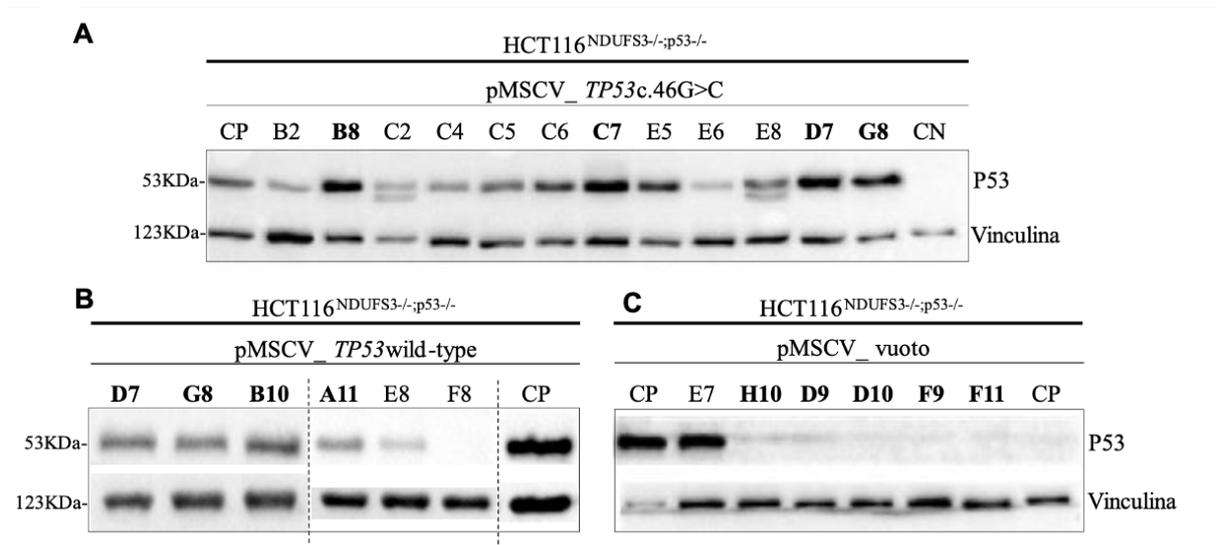


Figura 15 Analisi Western Blot della proteina p53 dopo trasduzione dei costrutti: **A)** pMSCV_TP53/c.467G>C, **B)** pMSCV_TP53wild-type e **C)** pMSCV_vuoto nella linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53-/-}. Il controllo positivo è rappresentato dalla linea 143BNDUFS3+/+;p53R156. Il controllo negativo, invece, è la linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53-/-} non sottoposta a trasduzione virale.

4.7 Estrazione dell'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)*.

4.8 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 programma riportato nella seguente tabella:

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

Tabella 3 Condizioni del termociclatore del protocollo di retrotrascrizione.

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.

4.9 qRT-PCR

L'analisi quantitativa è stata eseguita usando il metodo TAQMAN, che si basa sull'utilizzo di un oligonucleotide marcato ad un'estremità con un fluoroforo ed all'altra con un *quencher*.

Sfruttando l'attività 5'→3' esonucleasica della Taq polimerasi, dopo la normale fase di *annealing* della PCR, l'enzima esplica la propria attività esonucleasica scindendo il fluoroforo dal resto della molecola durante l'ibridazione. Pertanto, ad ogni ciclo, dopo irradiazione del campione, viene emessa una fluorescenza in quantità proporzionale al DNA target che diviene così facilmente quantificabile. Per il saggio TAQMAN, è stato selezionato il saggio PrimeTime™ qPCR Probes per ciascun gene sul sito web IDT (<https://eu.idtdna.com/site/order/qpcr/predesignedassay>) e per la quantificazione 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 seguente tabella sono riportate le sonde TAQMAN utilizzate:

<i>Gene</i>	<i>Primer FASTA</i>
SCO2	Sonda: 5’-/56-FAM/CCTCCCCTACTGACACTTCTCAACCA/36-TAMSp/-3’ Primer1: 5’-GGTGAGGGAATGGAAAGGAAG-3’ Primer2: 5’-TTGTTTCCCAAGGACAGG-3’
ACTB	Sonda: 5’/5Cy5/ TCATCCATGGTGAGCTGGCGG/3IAbRQSp/-3’ Primer1: 5’-ACAGAGCCTCGCCTTTG-3’ Primer2: 5’-CCTTGCACATGCCGGAG-3’

Tabella 4 Sequenza delle coppie di primer e delle specifiche sonde utilizzate per l’analisi qRT-PCR mediante saggio TAQMAN.

Per l’amplificazione e quantificazione dei campioni è stata utilizzato lo strumento 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 5 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 Δ Ct 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 del gene 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 (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

4.10 Estrazione del 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.

4.11 Sequenziamento Sanger

I prodotti di PCR da sequenziare sono stati purificati grazie a piastre *millipore* (MerckTM #MSNU03010) e risospesi in un volume di H₂O milliQ variabile (25-50µl) in base all'intensità della banda osservata su gel di agarosio. 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* fino a volume finale

La reazione è avvenuta sfruttando il 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 6 Impostazioni del termociclatore utilizzate 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

$C_2H_3NaO_2$, ed i pellet sono stati risospesi in 20 μ l 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).

4.12 Estrazione delle proteine e sistema di elettroforesi capillare (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 μ L 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 0.5 μ g/ μ L 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-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.

4.13 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-HSP70 (*BD Transduction #H53220*) 1:1000
- anti-4E-BP1 (*Cell Signaling #9644S*) 1:1000 rabbit.
- anti-phospho-4E-BP1 (*Cell Signaling #2855S*) 1:1000 rabbit.
- anti-S6-Ribosomal protein (*Cell Signaling #2217S*) 1:1000 rabbit.
- anti-phospho S6-Ribosomal protein (Ser235/236) (*Cell Signaling #4856S*) 1:1000 rabbit.
- anti-Vinculina (*Sigma-Aldrich #V9131*) 1:10000 mouse.
- anti- β -Actina (*Sigma-Aldrich #128K4805*) 1:10000 mouse.
- anti-puromocina (Millipore #12D10) 1:20000 mouse

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

4.14 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.

4.15 Analisi *in silico* per l'identificazione di elementi responsivi (RE)

L'analisi computazionale per identificare elementi responsivi di p53 nelle regioni regolatorie del gene *SCO2* è stata eseguita utilizzando il programma p53FamTaG (p53 FAMily TARget Genes), basato sull'algoritmo PatSearch, implementato nello strumento DNafan [125,126]. I filtri di DNafan consentono all'utente di analizzare regioni specifiche del genoma (ad esempio, regioni promotrici, 5'UTR, introni, ecc.). Il programma genera quindi automaticamente uno specifico set di sequenze che copre una determinata regione genica, applicando l'algoritmo PatSearch. PatSearch è particolarmente adatto a ricercare nei dati di sequenza la presenza di pattern oligonucleotidici complessi, la cui struttura è stata derivata dalla caratterizzazione sperimentale di elementi funzionali.

Utilizzando il modello di sintassi p53RE precedentemente descritto [125,126], abbiamo valutato l'eventuale presenza di elementi responsivi di p53 sul promotore, 5'UTR, 3'UTR o regioni introniche di *SCO2* ed abbiamo identificato una p53RE nel promotore di *SCO2* >ENSG00000130489_1|*SCO2* CHR:22 STRAND:-1 CHR_START:49257362, -2363 -2347 dal TSS.

4.16 Saggio di luciferasi

Studi di espressione genica mediante l'utilizzo di geni reporter *in vitro* è una strategia sperimentale valida poiché la loro espressione ectopica può essere misurata mediante visualizzazione diretta e/o saggio di attività enzimatica. I geni reporter possono essere espressi a partire da un promotore costitutivo (utilizzato per visualizzare una cellula o una proteina) o regolato (utilizzato per misurare l'attività di un promotore). I geni reporter che codificano per enzimi, come la luciferasi, misurano l'attività dell'enzima attraverso specifici substrati. Per valutare l'attività di un promotore, nel nostro caso del gene *SCO2*, l'elemento regolatorio identificato, discusso nel paragrafo 4.7, è clonato al monte del gene reporter della luciferasi ed il costrutto genico è trasfettato nelle cellule. Nel dettaglio, al momento della trasfezione (60-80% di confluenza cellulare), 200 µl di terreno DMEM senza siero sono stati incubati con il reagente di trasfezione

polietilenimina (PEI) (Sigma) per 5 minuti a temperatura ambiente. Il frammento contenente l'elemento responsivo di p53 sul promotore di SCO2 è amplificato dal DNA genomico umano e clonato nel plasmide pGL-3 basic (Promega). Tutti i vettori sono stati aggiunti al terreno contenente il reagente di trasfezione e incubati a temperatura ambiente per 20 minuti e successivamente aggiunti alle colture cellulari per 48 h. Ogni campione è stato co-trasfettato con: 1) il vettore reporter ricombinante contenente gli elementi responsivi a p53 (RE) del gene *SCO2*, 2) il vettore Renilla pRL-SV40 (Promega) e, alternativamente, 3) o il vettore pcDNA3 vuoto, o contenente la sequenza wild-type, la sequenza con la mutazione (c.524G>A; p.R175H) o la sequenza con la mutazione (c.467G>C; p.R156P) del gene *TP53*. Dopo 24 ore dalla trasfezione, nella linea HCT116^{NDUFS3+/+; p53+/+} è stata eseguito il trattamento in condizioni di basso glucosio (DMEM no glucose, supplementato con Glucosio 5mM, 10%FBS, 1%P/S; 1% L-Glut; uridina 1X) e contestualmente indotta l'inibizione del Complesso I con l'inibitore non specifico Rotenone. Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule H1299^{p53-/-} e HCT116^{NDUFS3+/+; p53+/+} sono state lisate in tampone di lisi (Promega) e il saggio della luciferasi è stato eseguito utilizzando il sistema Dual Luciferase assay (Promega), secondo le istruzioni del produttore. I dati sono stati normalizzati al segnale del reporter Renilla. I risultati riportati rappresentano la media di almeno tre esperimenti indipendenti e sono indicati con le deviazioni standard.

4.17 Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

Le linee cellulari HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53R156P} sono state coltivate in piastre da 15 cm e dopo 24 ore le cellule sono state trattate in condizioni di basso glucosio (DMEM no glucose, supplementato con Glucosio 5mM, 10%FBS, 1%P/S; 1% L-Glut; uridina 1X). Dopo 6 ore di trattamento in condizioni stringenti di glucosio, le cellule sono esposte al trattamento fisico-chimico con formaldeide, essenziale per ottenere i frammenti di cromatina (DNA-proteine). Il saggio di immunoprecipitazione della cromatina è stato eseguito con il sistema MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (Thermo Fisher). Per immunoprecipitare i complessi DNA-proteina sono stati utilizzati 2µg dei seguenti anticorpi: anti-p53 (Santa Cruz

Biotechnology) ed anti-acetil-istone-H4 (Biorad). I frammenti di DNA sono stati analizzati mediante RT-qPCR utilizzando primer specifici.

4.18 Micro-respirometria

La respirazione mitocondriale è stata misurata utilizzando il protocollo descritto per il Seahorse XFe Cell Mito Stress Test Kit (Agilent #103015-100) seguendo le istruzioni del produttore. 12×10^3 cellule/pozzetto (SKOV3, HCT116) e 8×10^3 (B16-F10) sono state coltivate in 80 μ L di DMEM in piastre di coltura cellulare XFe96 e incubate per 48 ore (HCT116) e per 24 ore (SKOV3, B16-F10) a 37°C e 5% di CO₂. Il terreno di crescita completo è stato sostituito con 180 μ L del terreno di coltura XF (Agilent #103575-100) supplementato con 10 mM di glucosio, 1 mM di piruvato di sodio, 2 mM di L-glutamina, a pH 7,4. Per raggiungere un corretto equilibrio della temperatura e del pH, le cellule sono state incubate a 37°C per 30 minuti. Tre misurazioni in basale della quota di consumo di ossigeno (OCR) sono state seguite tramite iniezione di un veicolo o di diverse concentrazioni di inibitori del CI e successive misurazioni; 1 μ M di oligomicina, carbonilcianuro-p-trifluorometossifenilidrazone (FCCP), 1 μ M di rotenone e 1 μ M di antimicina A sono stati aggiunti in sequenza a ciascun pozzetto. Le concentrazioni di FCCP sono state precedentemente ottimizzate per titolazione e sono state scelte le concentrazioni di 0,5 μ M per SKOV3, 0,75 μ M per HCT116 e 1 μ M per B16-F10, rispettivamente. Al termine del saggio, il terreno è stato rimosso ed il saggio con la sulforodamina B (SRB) è stato eseguito per determinare il contenuto proteico, essenziale per attuare la normalizzazione. In breve, il saggio SRB prevede un primo step in cui le cellule sono incubate con acido tricloroacetico (TCA) al 10% per 1 ora a 4 °C per garantire la fissazione delle cellule sulla superficie del pozzetto. Successivamente, si effettuano 5 lavaggi in acqua. Una volta asciugate le piastre, le proteine sono colorate mediante incubazione con SRB allo 0,4% per 30 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, l'SRB è stato solubilizzato con 10 mM Tris e l'assorbanza è stata determinata a 560nm. I dati (pmol/min) sono stati normalizzati all'assorbanza di SRB corretta per il bianco.

4.19 Preparazione delle frazioni arricchite di mitocondri

Le frazioni arricchite di mitocondri sono state ottenute mediante frazionamento subcellulare (10×10^6 cellule/mL) in presenza di 50 $\mu\text{g/mL}$ di digitonina (Calbiochem, #3000410). I mitocondri crudi sono stati isolati da circa $20\text{-}40 \times 10^6$ cellule, risospesi in un tampone isotonico saccarosio-mannitolo (200 mM mannitolo, 70 mM saccarosio, 1 mM EGTA e 10 mM Tris-HCl a pH 7,6) ed omogeneizzati con un omogeneizzatore Potter-Elvehjem in vetro/Teflon. Per separare i mitocondri crudi dalle altre frazioni subcellulari è stata eseguita una centrifugazione differenziale (600 g per 10 minuti a 4 °C seguita da 10.000 g per 20 minuti a 4 °C). I pellet ottenuti sono stati risospesi in tampone saccarosio-mannitolo, conservati a - 80 °C ed utilizzati per la determinazione spettrofotometrica dei complessi respiratori e dell'attività della citrato sintasi (CS).

4.20 Misurazione delle attività dei complessi mitocondriali

I mitocondri crudi sono stati utilizzati per misurare le attività redox dei complessi mitocondriali con uno spettrofotometro UV-Vis (V550 Jasco). Per la misurazione di tutti i complessi respiratori, la frazione mitocondriale è stata risospesa in un tampone contenente 50 mM KPi pH 7,8, 1 mM EDTA, 2,5 mg/mL di BSA, eccetto per il complesso I (CI) che richiede una concentrazione di BSA di 3,5 mg/mL. Tutte le attività enzimatiche sono state eseguite a 37°C in agitazione continua, tranne quando indicato. Per l'attività del CI e CII, il saggio spettrofotometrico è stato eseguito alla lunghezza d'onda di 600 nm, seguendo la riduzione del 2,6-diclorofenolindofenolo (DCIP). La cinetica è stata calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare del DCIP ($19,1 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Le attività del CIII e CIV sono state misurate seguendo la riduzione/ossidazione del citocromo c a 550 nm (coefficiente di estinzione molare $19,1 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$). L'attività specifica per ogni reazione è stata misurata dopo la sottrazione dell'attività aspecifica condotta in un saggio separato, aggiungendo l'inibitore specifico del complesso all'inizio della reazione (CI: 1 μM Rotenone; CII: 5mM Malonato; CIII: 1 μM Antimicina A; CIV: 300 μM KCN). L'attività della citrato sintasi è stata valutata in mitocondri risospesi in un buffer contenente 125mM TrisHCl, 0,1% Triton X-100, 100 μM DTNB ($\epsilon = 13,6 \text{mM}^{-1}$), 300 μM di Acetil-CoA, pH 8. La reazione è stata indotta con l'aggiunta di 500 μM

di ossalacetato (Trounce et al., 1996) e misurata a 412 nm a 30°C. La normalizzazione è stata eseguita sia sul contenuto proteico del campione (precedentemente quantificato secondo Bradford MM, 1976) che sull'attività della citrato sintasi. I dati sono quindi espressi come attività redox normalizzata.

4.21 Dosaggio del consumo di glucosio

Il consumo di glucosio è stato determinato utilizzando il kit per il dosaggio della glucosio ossidasi (GO) (Sigma-Aldrich #GAGO20) modificando il volume finale del saggio di 1 mL, rispetto al protocollo del produttore. In breve, le cellule sono state coltivate in piastre a 6 pozzetti ($3,45 \times 10^5$ cellule/pozzetto) in presenza di una concentrazione di 25 mM di glucosio. Dopo 24 ore, le cellule sono state lavate in PBS e incubate con DMEM-5 mM di glucosio senza rosso fenolo. Aliquote di 100 μ L di terreno sono state prelevate al tempo 0 e dopo 12 h e 15 h di incubazione. Al termine dell'esperimento, 3 μ L di campione sono stati utilizzati per determinare la concentrazione di glucosio, mediante la reazione enzimatica della glucosio ossidasi accoppiata all'ossidazione mediata da perossidasi dell'o-dianisidina ridotta ($\lambda = 540$ nm, 30 min, 37 °C). I dati ottenuti sono stati normalizzati sul numero di cellule.

4.23 Gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)

La gascromatografia-spettrometria di massa è tra i metodi analitici più avanzati per l'identificazione e quantificazione di molecole organiche in una varietà di matrici. Le linee HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53^{+/+}} ed HCT116^{NDUFS3^{-/-};p53R156P}, al termine del trattamento in condizioni di 5 mM di glucosio, sono state raccolte e sottoposte a estrazione con una miscela di CHCl₃:MeOH:H₂O (Sigma #34854-1 e #900688-1, Merck #102699-1000) (1:1:1) e successivamente spenta con 0,4 mL di metanolo freddo e un volume uguale di acqua contenente 1 μ g di norvalina (Sigma #53721), usata come standard interno. In seguito, è stato aggiunto un volume di cloroformio ed i campioni sono stati posti in agitazione a 4°C per 30 minuti. I campioni sono stati centrifugati a 3000 g per 10 minuti e la fase acquosa è stata raccolta in una nuova provetta e fatta evaporare a temperatura

ambiente. I metaboliti polari essiccati sono stati disciolti in 60 μ L di cloridrato di metossiamina al 2% (Sigma #226904) di piridina (25104 Thermo) e tenuti a 30°C per 2 ore. Dopo la dissoluzione e la reazione, sono stati aggiunti 90 μ L di MSTFA + 1% TMCS (69478-10x Sigma) e i campioni sono stati incubati a 37°C per 60 minuti. Le corse gascromatografiche sono state eseguite con elio come gas di trasporto a 0,6 mL/min. La temperatura di iniezione dello split è stata impostata a 250°C e il volume di iniezione ad 1 μ L. È stato utilizzato un rapporto di splitting di 1:10. La rampa di temperatura del forno GC è stata settata da 60°C a 325°C a 10°C/min. La velocità di acquisizione dei dati era di 10 Hz. Per il quadrupolo è stata utilizzata una sorgente ad impatto elettronico (EI) (70 eV) e gli spettri full-scan (intervallo di massa da 50 a 600) sono stati registrati in modalità ioni positivi. Le temperature della sorgente ionica e della linea di trasferimento sono state impostate, rispettivamente, a 250°C e 290°C. Lo strumento di elaborazione dei dati MassHunter (Agilent) è stato utilizzato per ottenere un profilo metabolico globale. Libreria RTL Fihen Metabolomics (Agilent G1676AA).

4.24 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.

4.25 Saggio radioattivo con aspartato radio marcato

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.

4.26 Analisi statistiche

È stato utilizzato GraphPad Prism versione 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) per eseguire test statistici e creare grafici e diagrammi a barre. Se non diversamente specificato, per confrontare le medie sono stati eseguiti t-test di Student non appaiati a due code, assumendo una varianza uguale. Quando il test F per confrontare le varianze tra i due gruppi è risultato significativo, i dati sono stati trasformati ($y' = \log y$) prima del calcolo del t-test. Per ogni esperimento sono state analizzate almeno tre repliche biologiche. Le analisi *in vitro* sono state ripetute da almeno due esperimenti indipendenti. Per ogni esperimento, i valori di p (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001) sono indicati nelle didascalie delle figure. Inoltre, dove indicato, l'errore standard della media (s.e.m.) è rappresentato dalle barre di errore. Le curve di sopravvivenza sono state stimate con il metodo del limite di prodotto di Kaplan-Meier e confrontate con il test log-rank (Mantel-Cox).

Per confrontare le medie della componente epiteliale dei tumori dell'omento delle pazienti affette da carcinoma sieroso ad alto grado, è stata eseguita l'analisi della varianza a una via (Anova, Analysis Of VAriance).

Diversamente, per comparare le curve di proliferazione (**Fig. 26**), ottenute in Incucyte, è stato applicato un test ANOVA a due vie, un test parametrico che viene utilizzato per determinare se esiste un effetto di interazione tra due variabili indipendenti su una variabile dipendente continua. All'interno della stessa analisi è stato effettuato un test post-hoc per ottenere un confronto multiplo tra i vari gruppi.

4.27 Crescita tumorale in modelli xenograft

Per gli studi *in vivo*, sono stati utilizzati i topi nu/nu (CD-1® Nude Mouse Crl:CD1-Foxn1n) acquistati dal Charles River Laboratories. Sono state rispettate tutte le normative etiche pertinenti per la sperimentazione e la ricerca sugli animali. Gli animali sono stati trattati secondo le linee guida e i regolamenti istituzionali dell'Università di Bologna. Rispettivamente, lo studio ha ricevuto l'approvazione etica del Comitato Etico del Ministero della Salute italiano (codice di autorizzazione 437/2018-PR).

I modelli xenograft derivano dall'inoculo di linee cellulari umane di origine tumorale nel modello murino immunodeficiente CD1 *nude*. Trattandosi di un esperimento pilota è stato deciso di inoculare solo le HCT116, una delle linee cellulari tumorali utilizzate per gli studi degli inibitori *in vitro*. L'impianto delle HCT116 è stato eseguito sul fianco dell'animale, per cui in sede ectopica, inoculando per via sottocutanea una sospensione di 100 µL di 5×10^6 cellule in una soluzione di PBS/matrigel matrigel (Corning #356234). Le dimensioni dello xenotrapianto sono state misurate con un calibro scorrevole due volte alla settimana, secondo la formula: volume = larghezza × altezza × lunghezza/2. Gli animali, dopo l'inoculo, sono stati controllati quotidianamente e non appena hanno sviluppato un tumore con un volume maggiore di 50mm³ sono stati randomizzati in tre gruppi: il primo gruppo non ha ricevuto il trattamento con i farmaci, per cui ha rappresentato il gruppo di controllo (100 µL 20%DMSO/H₂O con iniezione intraperitoneale giornaliera); il secondo gruppo di animali ha ricevuto il trattamento con metformina (2mg/ml in acqua cambiata due volte a settimana e 100 µL 20%DMSO/H₂O con iniezione intraperitoneale giornaliera); il terzo gruppo, infine, ha ricevuto il trattamento con l'inibitore EVP 4593 (1mg/kg per EVP 4593 in 100 µL 20%DMSO/H₂O con iniezione intraperitoneale giornaliera). Il sacrificio dell'animale è stato eseguito quando il tumore ha raggiunto un volume maggiore o uguale a 1 cm³, con l'obiettivo di creare sia le curve di crescita del volume tumorale che le curve di sopravvivenza. Ogni quattro giorni è stato misurato il volume tumorale, ottenendo un andamento della crescita del tumore nel tempo. Questo ha permesso di confrontare se ci fossero differenze nella crescita tumorale dipendentemente dal tipo di trattamento ed escludendo i tumori necrotici.

4.28 Colture tridimensionali (3D) *ex-vivo*

Gli esperimenti con coltura 3D in bioreattore sono stati condotti su campioni *ex-vivo* da pazienti sottoposti a rimozione di tumore primario ovarico e/o di massa metastatica all'omento. Immediatamente dopo la rimozione, le masse sono state sezionate e collezionate in pezzi dalle dimensioni approssimative di 2x2x2 mm (i.e. *chunk*).

Per ogni tumore, quattro *chunk* sono stati selezionati casualmente e caratterizzati strutturalmente tramite analisi istopatologica ed immagini in immunofluorescenza (IF) dopo fissazione in formalina al 4% ed inclusione in paraffina.

I rimanenti *chunk* sono stati sottoposti a processo di congelamento lento in una soluzione al 10% (V/V) di dimetilsolfossido (DMSO, Sigma Aldrich) in siero fetale bovino (FBS, Thermo Fisher, Numero di Lotto 2166297).

L'effetto del processo di congelamento e scongelamento sui tessuti tumorali è stato verificato tramite colorazione con ematossilina ed eosina (H&E), accertando (i) un appropriato mantenimento della morfologia tessutale se comparata con i campioni freschi e (ii) la presenza di una percentuale di componente epiteliale sufficiente per riuscire ad eseguire analisi quantitative a valle degli esperimenti (i.e. > 10% dell'area tumorale). Il confronto è stato effettuato con il materiale di N=5 pazienti svolgendo un'analisi quantitativa sui campioni.

Il bioreattore a perfusione U-CUP (Cellec® Biotek AG, #9018.9084, Basel, Switzerland) [127] è stato sfruttato per mantenere i campioni in coltura, in 3D ed in perfusione, per un periodo di 5 giorni.

A valle del controllo precedente, in questa fase si sono impiegati solo campioni sottoposti al processo di congelamento lento e poi scongelati. Tale procedura permette di disaccoppiare le fasi di disponibilità del campione e di inizio dell'esperimento, aumentando così indirettamente la disponibilità di tessuto primario. Di nota, nel presente studio, per ogni donatore ed ogni condizione, 3 o 4 *chunk* tumorali (a seconda della disponibilità) sono stati inclusi nel bioreattore dai 3 ai 4 *chunk* tumorali, ed i *chunk* sono stati analizzati singolarmente in modo da ottenere una stima dell'eterogeneità intra-tumorale.

La sperimentazione in U-CUP è stata divisa in due fasi: una fase di ottimizzazione delle condizioni sperimentali, ed una fase di valutazione della risposta agli inibitori del CI in contesto *ex-vivo*.

Nella prima fase si sono valutate due metodologie di coltura: una “*scaffold-free*” consistente nella semplice inclusione dei *chunk* tumorali nella camera di coltura del bioreattore, ed una “*con scaffold*” che presuppone il posizionamento *dei chunk* fra due dischi di collagene (Avitene™ Ultrafoam™, BD #1050050, Franklin Lakes, NJ, USA) in una configurazione a sandwich (i.e. collagene-pezzetti tumorali-collagene).

In entrambe le configurazioni i tessuti sono stati incorporati in un supporto in silicone con morfologia anulare e chiuso ad entrambi i lati tramite due reti in etilene tetrafluoroetilene (ETFTE). I costrutti assemblati sono poi stati inseriti nella camera di perfusione del bioreattore a perfusione U-CUP ed i tessuti sono stati coltivati per 5 giorni a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. La portata del mezzo di coltura è stata fissata a 0.47 ml/min, per garantire una velocità superficiale di 100 μm/s come precedentemente dimostrato per la coltura sia di tessuti tumorale che delle controparti tessutali fisiologiche.

I normali terreni di coltura, utilizzati per gli esperimenti *in vitro*, contengono una quantità di glucosio non fisiologica (25mM). Verosimilmente, nell’ottica di sfruttare la U-CUP come modello preclinico per lo studio degli inibitori del CI, l’utilizzo di un terreno di coltura con una concentrazione non fisiologica di glucosio potrebbe permettere alle cellule di compensare il blocco della catena respiratoria promuovendo maggiormente la glicolisi. Quindi, è stato utilizzato un terreno di coltura privo di glucosio (DMEM – Gibco – Thermo Fischer Scientific 11966-025) e addizionato con D-glucosio alla concentrazione finale di 5mM (concentrazione fisiologica) (Sigma-Aldrich #G8270). Inoltre, al terreno sono stati addizionati i seguenti supplementi:

- GlutaMAX™ 1X
- Primocin 100μg/mL
- FBS 10%
- EGF 25ng/mL
- B27 1X
- Hepes 10mM

- Streptomicina 100µg/mL di streptomicina
- Penicillina 100µg/mL
- Nicotinamide 10mM
- N-Acetilcisteina 1.25mM

Nella seconda fase, invece, è stata valutata la risposta dei tessuti *slow frozen* da pazienti a determinati inibitori del CI: EVP 4593 utilizzato alla concentrazione finale di 0.5µM (diluito in DMSO) e metformina alla concentrazione finale di 20µM (diluita nel terreno di coltura). I tessuti sono stati incorporati in U-CUP come sopra descritto utilizzando la condizione "*scaffold free*" ed il mezzo di coltura DMEM 5mM. Si è valutata la risposta del materiale proveniente da N=4 pazienti, di cui tre campioni di metastasi omentali e un campione di tumore primario (ovaio).

In entrambe le fasi, al termine della coltura i bioreattori sono stati disassemblati, i tessuti estratti, fissati in formalina al 4% per 24h a 4°C, ed inclusi in paraffina per il sezionamento istologico come sotto descritto.

4.29 Immunoistochimica ed immunofluorescenza

I *chunk* tumorali sono stati fissati in una soluzione di formalina al 4% per 24 ore a 4°C ed incorporati in paraffina seguendo i protocolli standard. Sezioni dei tessuti dallo spessore di 4 µm sono state ottenute tramite un microtomo automatico (Microm HM 340E), de-paraffinizzate in xilene, reidratate, e sottoposte a colorazione H&E o ad analisi in immunofluorescenza (IF). Per ogni campione, si è proceduto con l'acquisizione di immagini corrispondenti ad almeno tre diversi piani di sezione del tumore, distanziati circa di 40 µm l'uno dall'altro, in modo da avere sia una panoramica più ampia, seppur ancora limitata, della struttura dell'intero tumore, sia una maggiore numerosità di aree per le analisi.

La colorazione H&E è stata eseguita seguendo il protocollo standard, le colorazioni in immunofluorescenza come qui descritto in dettaglio.

Il recupero degli epitopi è stato effettuando esponendo le sezioni a calore in una soluzione di Citrate Buffer, (pH 6.0, 1X, #C9999, Sigma-Aldrich) riscaldato in microonde a 800W per 10 minuti (Heat-induced epitope retrieval).

Le sezioni di tessuto sono poi state permeabilizzate in una soluzione con 1% di *goat serum* in PBS allo 0.4% Triton X-100 (PBS-T) per 5 minuti. I siti di legame aspecifico sono stati bloccati con una *blocking solution* al 5% di *goat serum* in PBS allo 0.4% Triton X-100 (PBS-T) per 30 minuti a temperatura ambiente.

Le slides sono poi state incubate con gli anticorpi primari diluiti in una soluzione 1% di *goat serum* in PBS-T a temperatura ambiente per 1 ora e mezza, lavate, ed incubate 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari (diluiti nella stessa soluzione).

Le componenti epiteliali e stromali sono state distinte tramite semplice morfologia nella colorazione H&E mentre in immunofluorescenza la componente epiteliale è stata marcata attraverso la Caderina E (effettuata con anticorpo mouse anti human E-CAD #14472, Cell Signaling, diluizione 1:200). Le cellule proliferanti sono state marcate tramite Ki67 (effettuata con anticorpo rabbit anti human Ki67 Alexa Fluor 488, #NB500-170AF488, Novus, diluizione 1:200) e le cellule apoptotiche tramite cleaved caspase 3 (tramite anticorpo rabbit anti human cC3 (#9661, Cell Signaling, diluizione 1:200). Appropriati anticorpi secondari *goat anti rabbit* e *goat anti mouse* coniugati con i fluorofori *Alexa Fluor 546* e *647* (*Alexa Fluor™*, Thermo Fisher) sono stati utilizzati alla diluizione di 1:1000. I nuclei sono stati marcati utilizzando il DAPI #564907 (BD Biosciences), incubato insieme agli anticorpi secondari ad una diluizione 1:1000.

Le immagini, acquisite con il microscopio invertito a epi-fluorescenza Nikon Eclipse Ti2, sono poi state utilizzate per condurre indagini quantitative tramite il software per patologia digitale QuPath [128]. Nella fattispecie, attraverso la programmazione di due script, si è quantificato il rapporto fra area tumorale ed area totale del tessuto in immagini con colorazione H&E. Il primo script identifica il tessuto tumorale e il secondo discrimina la componente epiteliale da quella stromale all'interno del tessuto tumorale. Si è poi proceduto all'analisi delle immagini in immunofluorescenza quantificando le cellule tumorali (i.e. E-CAD +) proliferanti (i.e. Ki67 +) e quelle apoptotiche (i.e. cC3 +) tramite specifici *classifier* disponibili nel software basati sull'intensità del segnale in fluorescenza.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 EVP 4593 e BAY 87-2243 sono inibitori della respirazione mitocondriale più potenti della metformina

L'inibizione del CI della catena respiratoria mitocondriale influisce sulla crescita tumorale, confinando l'aggressività del tumore in uno stato a basso grado proliferativo ed aprendo una finestra temporale per ulteriori interventi terapeutici [121]. I meccanismi molecolari innescati dalla mancanza del CI ed alla base della regressione tumorale includono la destabilizzazione di HIF-1 α [121], una crisi energetica con conseguente attivazione di AMPK [85], una carenza di aspartato con successivo calo della biosintesi nucleotidica [78] e un'alterazione del bilanciamento redox. Quindi, causare un danno funzionale al CI è attualmente considerata una strategia terapeutica antitumorale promettente. L'inibitore del CI maggiormente investigato è la metformina, il farmaco di prima linea nel trattamento di pazienti con diabete mellito di tipo II. Diversi studi *in vitro* e *in vivo* evidenziano l'azione di questo farmaco nel prevenire la progressione tumorale [56,78], tuttavia le meta-analisi dei dati clinici hanno rivelato una risposta eterogenea, a seconda del tipo di tumore e dello stadio [129] con risultati contrastanti che emergono anche da studi clinici conclusi [130].

Inoltre, un'importante limitazione nella sperimentazione della metformina è rappresentata dal dosaggio del farmaco, il quale inibisce la proliferazione cellulare tumorale *in vitro* in un intervallo di concentrazioni del millimolare (mM), generalmente non traslabili in clinica perché incompatibili con il trattamento farmacologico dei pazienti [87]. Pertanto, è necessario ampliare lo spettro degli inibitori del CI con farmaci più potenti. BAY 87-2243 è tra gli inibitori recentemente emergenti, in grado di ridurre la proliferazione cellulare nel tumore ai polmoni non a piccole cellule [94] e indurre la morte cellulare in cellule di melanoma, prevenendo la crescita del tumore *in vivo* [95,96]. Un'ulteriore molecola in grado di inibire selettivamente il CI mitocondriale è EVP 459, caratterizzato dalla stessa base strutturale della chinazolina e originariamente scoperto come inibitore di NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [98]. EVP 4593 è stato recentemente testato nel cancro, rivelando la sua efficacia nel contrastare la proliferazione *in vitro* in assenza di glucosio e la capacità di ridurre il volume tumorale *in vivo* se impiegato in combinazione farmacologica con composti anti-angiogenici [97].

Nonostante le consolidate proprietà antitumorali di queste molecole nel trattamento dei tumori solidi, nei quali, in generale, è richiesta la funzionalità mitocondriale e l'adattamento all'ipossia, e i progressi nel disegno di nuovi inibitori del CI, nessuno di essi è attualmente utilizzato nella pratica clinica.

La prima parte di questo lavoro si pone come obiettivo quello di confrontare l'efficacia di inibizione della respirazione mitocondriale di metformina, EVP 4593 e BAY 87-2243. Il primo passo è stato quello di determinare quali fossero le minime concentrazioni di ogni singolo inibitore tali da abolire la respirazione mitocondriale e di conseguenza il tasso del consumo di ossigeno (OCR). La titolazione dei tre farmaci è stata eseguita in linee cellulari di carcinoma ovarico (SKOV3), melanoma (B16-F10) e carcinoma al colon retto (HCT116), rappresentative di tumori solidi in cui la metformina ha mostrato in precedenza risultati contrastanti [130–132]. La scelta dell'intervallo delle concentrazioni utilizzate per la titolazione di ogni singolo inibitore nasce da una ricerca in letteratura, laddove sia stata dimostrata la loro efficacia di contrastare la crescita tumorale *in vitro*. Indipendentemente dal modello cellulare, il trattamento con la metformina induce una riduzione della respirazione basale di circa il 25-30% solo alle concentrazioni più alte nell'ordine del millimolare (50mM) (**Fig.16A**). Questo risultato riflette le proprietà intrinseche della metformina, un farmaco scarsamente lipofilico che richiede l'internalizzazione nelle cellule attraverso i trasportatori cationici (OCT) [67]. Inoltre, la metformina è un catione e si prevede che si accumuli da 100 a 500 volte nei mitocondri a causa del potenziale di membrana, per cui il suo ingresso non sarebbe immediato. Infatti, la pre-incubazione del composto per 24 ore riduce sia la respirazione basale che la respirazione massima. La respirazione basale rappresenta il consumo di ossigeno della cellula necessario per soddisfare la richiesta di ATP in condizione di base; la respirazione massima, invece, simula una richiesta di energia stimolando la catena respiratoria ad aumentare la sua funzionalità e viene misurata utilizzando il disaccoppiante FCCP (carbonyl cyanide-p- trifluoromethoxyphenyl-hydrazon).

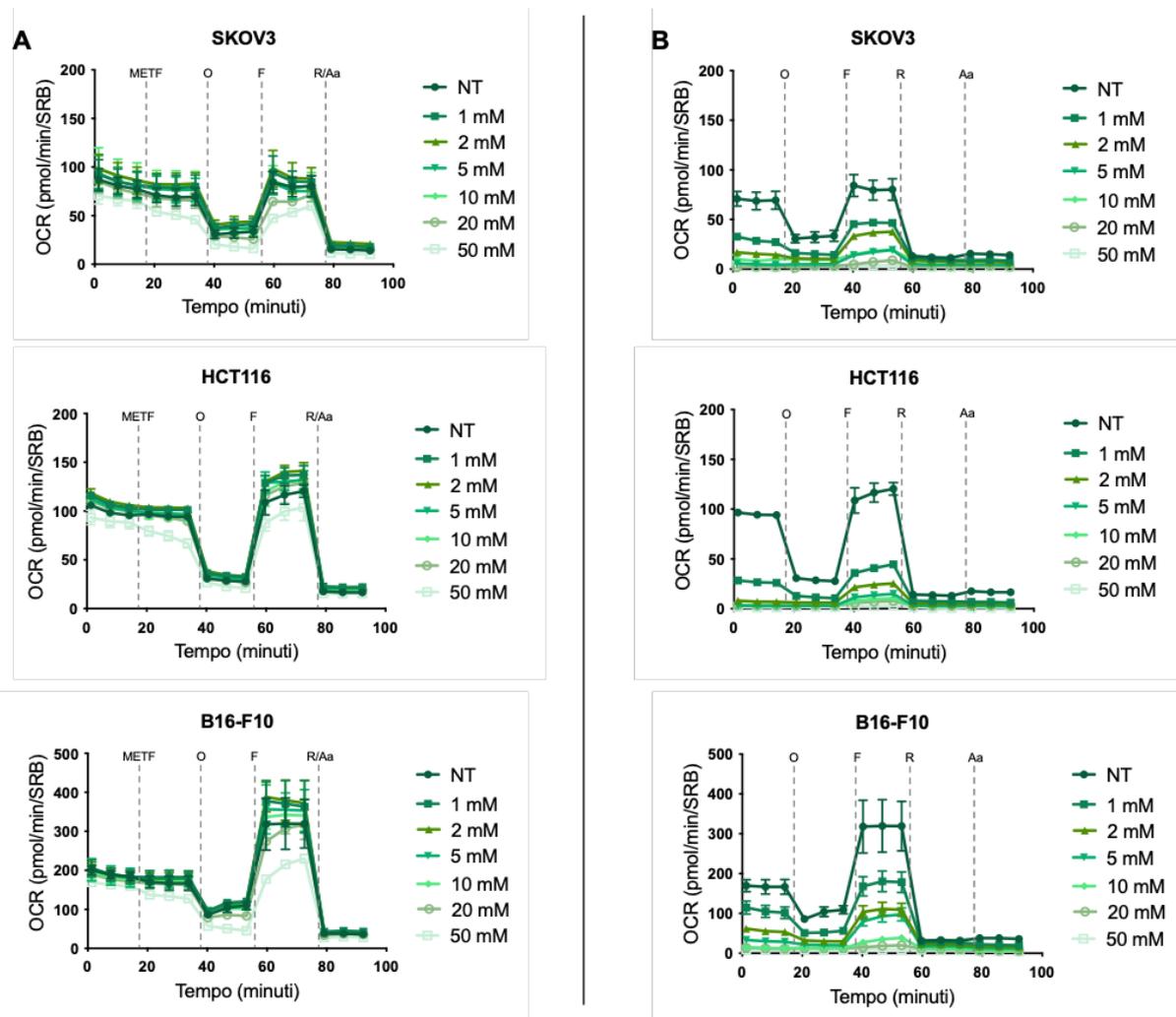


Figura 16 La titolazione degli inibitori sulla respirazione mitocondriale rivela le concentrazioni minime necessarie per inibire la respirazione mitocondriale. **(A-B)** Titolazione di metformina su linee cellulari SKOV3, HCT116 e B16-F10 utilizzando l'analizzatore Seahorse XFe96. Il tasso di consumo di ossigeno (OCR) è stato determinato dopo l'iniezione acuta di diverse concentrazioni di composti, 1 μ M di oligomicina (O), 0,5 μ M (SKOV3), 0,75 μ M (HCT116) e 1 μ M (B16-F10) di FCCP (F), 1 μ M di rotenone (R) e 1 μ M di antimicina A (Aa). Nel pannello (B) la titolazione è stata eseguita dopo 24 ore di pre-incubazione con metformina prima della misurazione dell'OCR. Per ogni pannello i dati sono espressi come pmole O₂/min, normalizzati su SRB, e riportati come media \pm SEM (n=2).

Il tasso di consumo di ossigeno basale è abolito dalla metformina alla concentrazione di 2mM nelle HCT116 e nelle SKOV3, e 10mM nelle B16-F10 (**Fig. 16B**). L'efficacia della metformina, quindi, come inibitore della respirazione mitocondriale è anche dipendente dal tempo, in quanto un'esposizione più lunga al farmaco richiederebbe concentrazioni più basse di metformina per abbattere il tasso di consumo dell'ossigeno. Tuttavia, alle concentrazioni utilizzate, la respirazione massima è ancora rilevabile, mentre risulta abolita quando le cellule sono pre-incubate con 50mM di metformina. La metformina è un farmaco idrofilo che a pH fisiologico è carico positivamente. La sua idrofilia limita la

sua permeabilità attraverso le membrane lipidiche e lo stato stazionario all'interno delle cellule dipende sia dalla quantità e dall'attività dei trasportatori OCT sia dalla concentrazione plasmatica di metformina. Non è ancora chiaro se i tumori esprimono uno o tutti gli OCT. A tal proposito, uno studio recente ha riportato il potenziale limitato di basse dosi di metformina per la prevenzione e il controllo della carcinogenesi mammaria indotta da N-metil-N-nitrosourea (MNU), attribuendolo in parte alla bassa espressione genica dei trasportatori OCT nei carcinomi mammari [133]. Contrariamente, uno studio neoadiuvante a braccio singolo con metformina, in pazienti non diabetiche affette da carcinoma mammario, ha rilevato che tutti i tumori esprimevano i trasportatori OCT [134]. In aggiunta, xenograft di HCT116, linee cellulari di carcinoma del colon retto che esprimono i trasportatori OCT, regrediscono nella loro crescita *in vivo* quando ai topi viene somministrata metformina [56]. Nessuno di questi studi ha però mai correlato l'espressione di OCT con l'accumulo di metformina nel tessuto tumorale, e l'evidenza dell'assorbimento e dell'accumulo di metformina nei tumori, a livelli sufficienti per mediare un effetto diretto *in vivo*, è limitata. Uno studio recente, a sostegno del potenziale accumulo di metformina nel tessuto tumorale, ha riportato le concentrazioni di metformina che raggiungono valori micromolari in biopsie di tumori ovarici di pazienti che assumono metformina prima dell'intervento [135]. Nonostante resti ancora poco chiara la presenza e la distribuzione dei trasportatori OCTs nei tessuti tumorali, l'effetto di inibizione della respirazione nelle linee cellulari SKOV3, HCT116 e B16-F10, in seguito al trattamento con la metformina, fa presupporre che il farmaco riesca ad entrare nelle cellule. Probabilmente l'espressione quantitativa dei trasportatori è variabile tra i diversi tumori, giustificando le diverse concentrazioni di inibizione della respirazione basale ottenute dalla titolazione del farmaco. Inoltre, è importante notare che le concentrazioni della metformina solitamente utilizzate negli esperimenti riportati in letteratura, 10mM e 20mM, non sono in grado di abbattere la respirazione massima, motivo per cui gli effetti osservati a valle non possono essere associati esclusivamente all'inibizione del CI. Questi dati sono in linea con studi recenti in cui è stato dimostrato che la metformina frena altre vie metaboliche come la gluconeogenesi da lattato e glicerolo [136] e l'ossidazione degli acidi grassi [137], o di colpire altri enzimi mitocondriali, come l'ATP sintasi F1Fo [138] e la glicerofosfato deidrogenasi (mGPDH) [136,139,140]. I risultati scaturiti da questo studio potrebbero contribuire a spiegare i

dati contrastanti ottenuti negli studi clinici sull'uso della metformina come farmaco antitumorale per diverse neoplasie [130,131,141–146], suggerendo la presenza di bersagli molecolari aggiuntivi ancora sconosciuti.

La titolazione dell'inibitore EVP 4593, invece, mostra un abbattimento della respirazione mitocondriale (sia basale che massima) nelle SKOV3 e HCT116 già alla concentrazione di 100nM, mentre nelle B16-F10 è necessaria una concentrazione di 200nM (**Fig. 17A**). Infine, BAY 87-2243 inibisce totalmente la respirazione mitocondriale alla concentrazione di 1 μ M nelle HCT116 e SKOV3, mentre le B16-F10 risultano essere meno sensibili a questo inibitore, richiedendo una concentrazione di 20 μ M (**Fig.17B**).

Alla luce di questi risultati, EVP 4593 e BAY 8722 si rivelano essere più potenti della metformina, essendo in grado di inibire la respirazione mitocondriale rispettivamente nell'ordine del nM e del μ M.

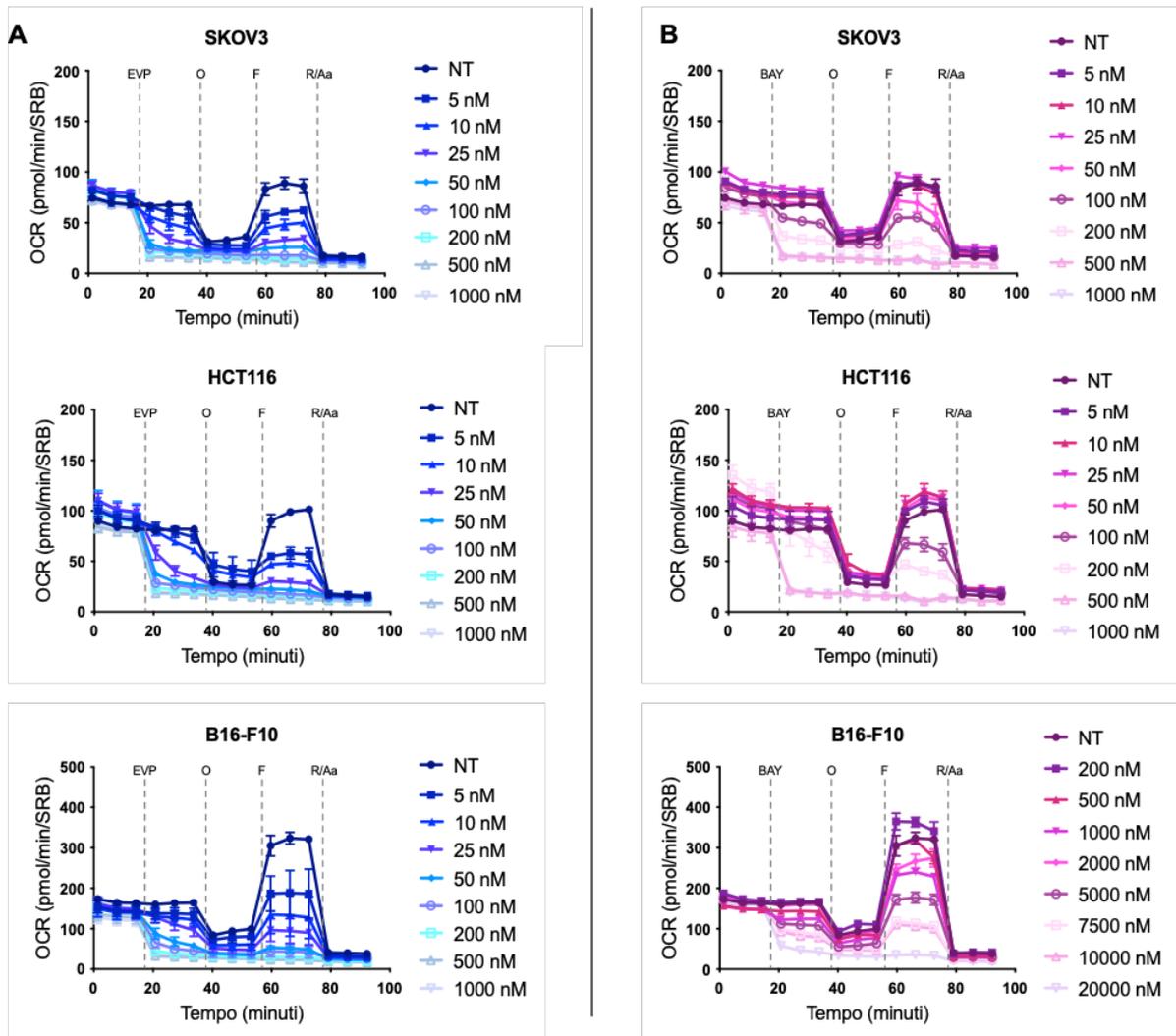


Figura 17 La titolazione degli inibitori sulla respirazione mitocondriale rivela le concentrazioni minime necessarie per inibire la respirazione mitocondriale. Titolazione di (A) EVP 4593 e (B) BAY 87-2243 su linee cellulari SKOV3, HCT116 e B16-F10 utilizzando l'analizzatore Seahorse XFe96. Il tasso di consumo di ossigeno (OCR) è stato determinato dopo l'iniezione acuta di diverse concentrazioni di composti, 1 μ M di oligomicina (O), 0,5 μ M (SKOV3), 0,75 μ M (HCT116) e 1 μ M (B16-F10) di FCCP (F), 1 μ M di rotenone (R) e 1 μ M di antimicina A (Aa). Nel pannello (B) la titolazione è stata eseguita dopo 24 ore di pre-incubazione con metformina prima della misurazione dell'OCR. Per ogni pannello i dati sono espressi come pmole O₂/min, normalizzati su SRB, e riportati come media \pm SEM (n=2).

La minore potenza della metformina rispetto a EVP 4593 e BAY 87-2243 potrebbe essere anche dettata dal tipo di legame del composto al CI. Non è noto come la metformina inibisca il CI, ma potrebbe stabilire dei legami aspecifici che giustificherebbero l'abbattimento della respirazione basale esclusivamente con concentrazioni alte, quali 50mM. Di nota, il recente rilascio di strutture di CI di mammifero a cui si legano IM1761092, un derivato della fenformina più complesso e idrofobico che esercita un'elevata attività inibitoria sul CI, ha rivelato che le biguanidi sono in grado di legare

almeno tre siti del CI deattivato, spiegando il comportamento non competitivo di queste molecole [147], ma sollevando anche domande sulla loro specificità e potenza.

Da un lato l'utilizzo di alte concentrazioni della metformina *in vitro* potrebbero aggirare alcuni limiti intrinseci del farmaco, dall'altro renderebbe poco traslabile il suo utilizzo in studi clinici nell'ambito del trattamento oncologico.

Contrariamente alla metformina, EVP 4593 e BAY 87-2243 si confermano inibitori potenti del CI, seppure con un'efficacia diversa. La differenza di efficienza di EVP 4593 e BAY 87-2243 potrebbe dipendere da determinanti strutturali delle loro interazioni con il CI. Un'analisi di simulazione computazionale, nota come "*docking*" molecolare, ha permesso di predire sia l'orientamento del ligando (inibitore) rispetto al CI che la regione del modulo Q dove possono avvenire le interazioni con gli inibitori [148]. Il *docking* molecolare ha mostrato che EVP 4593 lega il modulo Q posizionandosi nella tasca posta più in profondità, in modo simile ai classici inibitori del CI, come il rotenone e la piericidina A. Contrariamente, BAY 87-2243, il cui legame è principalmente dovuto alle interazioni di van der Waals e alla complementarità dimensionale, si posiziona nella tasca più superficiale del modulo Q, caratterizzata da residui idrofili [148]. Se questa differenza nel sito di legame possa influire sulla capacità di questi inibitori di competere con il chinone e quindi sulla loro efficacia è ancora da definire.

Inoltre, è interessante notare come EVP45943 mostri un abbattimento della respirazione mitocondriale in un intervallo di concentrazioni simili in tutte le linee cellulari utilizzate, mentre BAY 87-2243 risulta essere circa 50 volte meno potente nel modello murino (B16-F10) rispetto a quelli umani (SKOV3 e HCT 116). La differenza di potenza della stessa molecola in modelli di specie diversa potrebbe essere il risultato di un cambiamento nei residui di interazione con il BAY 87-2243 tra il CI umano e murino. Sebbene il tipo di tumore, il carico mutazionale o le peculiarità metaboliche delle cellule non possano essere escluse per spiegare tale differenza, le modifiche a livello del CI tra le diverse specie possono rappresentare i determinanti più plausibili del fenomeno. Pertanto, è stata valutata la conservazione degli aminoacidi che si prevede leghino EVP 4593 e BAY 87-2243 nella tasca posta in profondità e quella più in superficie del modulo Q (dati non mostrati). La tasca posta in profondità del modulo Q conserva 8 aminoacidi su 10 che si prevede interagiscano con EVP 4593 e sono tutti identici nelle sequenze di

riferimento umane, murine e ovine. Invece, la tasca più in superficie conserva 13 aminoacidi su 16, coinvolti nell' interazione con BAY 87-2243. In questo caso, tutti i residui sono identici nelle sequenze di riferimento umane, murine e ovine, con la sola eccezione di una treonina (Thr21 in ND1), che si trova nel topo e ovini, ma corrisponde a una metionina nell'uomo [148]. Questo amminoacido risulta conservato nei primati, indicando chiaramente che è stato acquisito di recente durante l'evoluzione e che potrebbe contribuire ad una maggiore sensibilità del modulo Q delle cellule umane al legame di BAY 87-2243.

Nei tre modelli tumorali (SKOV3, HCT116, B16-F10), EVP 4593 è in grado di sopprimere completamente la respirazione mitocondriale in un intervallo di concentrazione di 100-200 nM, quindi 100-200 volte inferiore alle dosi solitamente impiegate in letteratura [97,98]. Alla luce dei dati mostrati, è possibile trarre due conclusioni. Le concentrazioni di EVP 4593 utilizzate in letteratura sicuramente inibiscono la respirazione mitocondriale, essendo più alte rispetto a quelle individuate in questo studio, ma allo stesso tempo concentrazioni così alte potrebbero aumentare il rischio di causare effetti non specifici per il CI e/o per le cellule tumorali. Infatti, è molto importante ricordare che gli inibitori del CI inibirebbero il metabolismo ossidativo, caratteristico di tutte le cellule, non solo di quelle tumorali. Di nota, difetti genetici ereditari delle subunità strutturali o dei fattori di assemblaggio di CI sono eziologici di mitocondriopatie, che vanno da gravi disturbi neuromuscolari come la sindrome di Leigh, la sindrome di miopatia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica ed episodi simili all'ictus (MELAS), cardiomiopatie ipertrofiche, fino a forme di atrofia ottica ereditata o recessiva a livello mitocondriale [149]. In effetti, l'inibizione del CI da parte di alcuni inibitori classici (ad es. rotenone, MPP+ o paraquat) favorisce l'insorgenza di disturbi neurodegenerativi come il morbo di Parkinson [150].

Per le cellule tumorali umane SKOV3 e HCT116, la concentrazione più alta di BAY 87-2243 utilizzata in letteratura (1 μ M) è risultata la quantità minima che sopprime totalmente la respirazione mitocondriale, quindi già ottimale per ulteriori esperimenti.

I dati di questo studio aprono la strada a considerazioni rilevanti sui potenziali effetti collaterali derivanti dall'uso di inibitori del CI nel trattamento del cancro. Poiché il CI è

un attore centrale della bioenergetica cellulare, costitutivo e ubiquitario, è necessario un dosaggio finemente regolato dei farmaci per ambire a colpire selettivamente le cellule tumorali, dipendenti dalla funzionalità del metabolismo ossidativo, limitando effetti collaterali sulla componente non tumorale.

Complessivamente, sia l'EVP 4593 che il BAY 87-2243 sono risultati inibitori altamente specifici della respirazione mitocondriale e più potenti della metformina.

5.2 Modelli tumorali NDUFS3 nulli rivelano l'effetto antiproliferativo di EVP 4593 e BAY 87-2243 specifico per il CI

Nella caratterizzazione di molecole potenzialmente adatte a studi clinici, è importante discernere i possibili meccanismi tramite i quali un farmaco antineoplastico agisce, non solo per prevedere possibili effetti collaterali, ma anche per identificare eventuali meccanismi di chemioresistenza. Tuttavia, gli studi condotti finora non hanno considerato i possibili effetti degli inibitori del CI su target molecolari diversi dal CI, ponendo la questione della loro specificità. Nella valutazione dell'effetto antiproliferativo dei nuovi inibitori del CI, un aspetto primario da tenere in considerazione è l'eventuale presenza di effetti aspecifici in seguito al trattamento. A tal proposito, una volta compreso l'intervallo di concentrazioni degli inibitori in cui la respirazione mitocondriale è inibita, si è valutato se alle stesse concentrazioni i farmaci avessero un'influenza sulla proliferazione cellulare e se l'effetto sul fenotipo fosse specifico all'inibizione del CI. Specificatamente alla metformina, sebbene sia un noto inibitore del CI, questo effetto è stato osservato a dosi sopra-farmacologiche (10mM e 20mM) del composto [151], alle quali non si è osservata un'inibizione totale della respirazione mitocondriale. Inoltre, essa agisce nel contesto tumorale in maniera pleiotropica e alcuni di questi meccanismi riportati in letteratura sembrano essere indipendenti dall'inibizione del CI [86,152,153]. Alla luce di queste considerazioni, la metformina è stata esclusa dalla successiva analisi *in vitro*.

Quindi, allo scopo di identificare quale fra i nuovi inibitori del CI (BAY 87-2243 ed EVP4593) presenti un profilo migliore dal punto di vista terapeutico, in primo luogo è stato valutato se esercitassero o meno un effetto antiproliferativo nelle stesse linee cellulari in cui è stata precedentemente calcolata la minima concentrazione inibente la respirazione mitocondriale. La proliferazione cellulare è stata monitorata con un saggio di proliferazione in IncuCyte, uno strumento automatizzato di *live imaging* attraverso cui è stato possibile monitorare la confluenza cellulare. L'effetto sulla proliferazione cellulare è stato investigato trattando le cellule per 72 ore con gli inibitori del CI e utilizzando le concentrazioni di inibizione dell'OCR di EVP 4593 (100 nM per SKOV3 e HCT116 e 200 nM per B16-F10) e BAY 87-2243 (1 μ M per SKOV3 e HCT116, e 20 μ M per B16-F10). È interessante osservare che entrambi gli inibitori esercitano un effetto antiproliferativo nelle cellule con un CI funzionale (**Fig. 18A-B**), suggerendo che le concentrazioni ottimizzate con la misurazione del tasso di consumo di ossigeno causino un effetto antiproliferativo a valle dell'inibizione specifica del CI.

Il trattamento con EVP 4593 causa una significativa riduzione della proliferazione dopo 72 ore di circa il 60% nelle HCT116, 50% nelle SKOV3 e 40% nelle B16 F10. Nonostante nelle B16 F10 la concentrazione di EVP 4593 risulti essere il doppio (200nM) rispetto a quella utilizzata per le altre linee (100nM), il trattamento mostra un'efficacia antiproliferativa minore. Il trattamento con BAY 872243, invece, causa una significativa riduzione della crescita cellulare di circa il 20% nelle HCT116, 40% nelle SKOV e 60% nelle B16 F10. Nonostante l'effetto antiproliferativo risulti superare il 50% nella linea B16 F10, la concentrazione di BAY 872243 utilizzata è 20 volte superiore rispetto a quella testata nelle altre due linee. Le B16 F10 sono cellule tumorali con un tasso di crescita superiore a tutte le altre linee. Da questo risultato si potrebbe ipotizzare una correlazione tra tasso proliferativo e sensibilità al trattamento, dove l'efficacia antineoplastica potrebbe dipendere dalla velocità di duplicazione delle cellule tumorali. Quindi, cellule tumorali altamente replicanti potrebbero necessitare di una quantità maggiore di inibitore, ipotesi però non ancora supportata da ulteriori evidenze sperimentali.

Complessivamente, nonostante entrambi gli inibitori mostrino un effetto antiproliferativo in diverse linee cellulari di tumori solidi, EVP 4593 si conferma più potente di BAY

872243. Anche se la riduzione della crescita cellulare dopo trattamento con gli inibitori è pressoché uguale, l'efficacia antiproliferativa di EVP 4593 è raggiungibile utilizzando una concentrazione almeno 5 volte inferiore rispetto a quella utilizzata per BAY 872243.

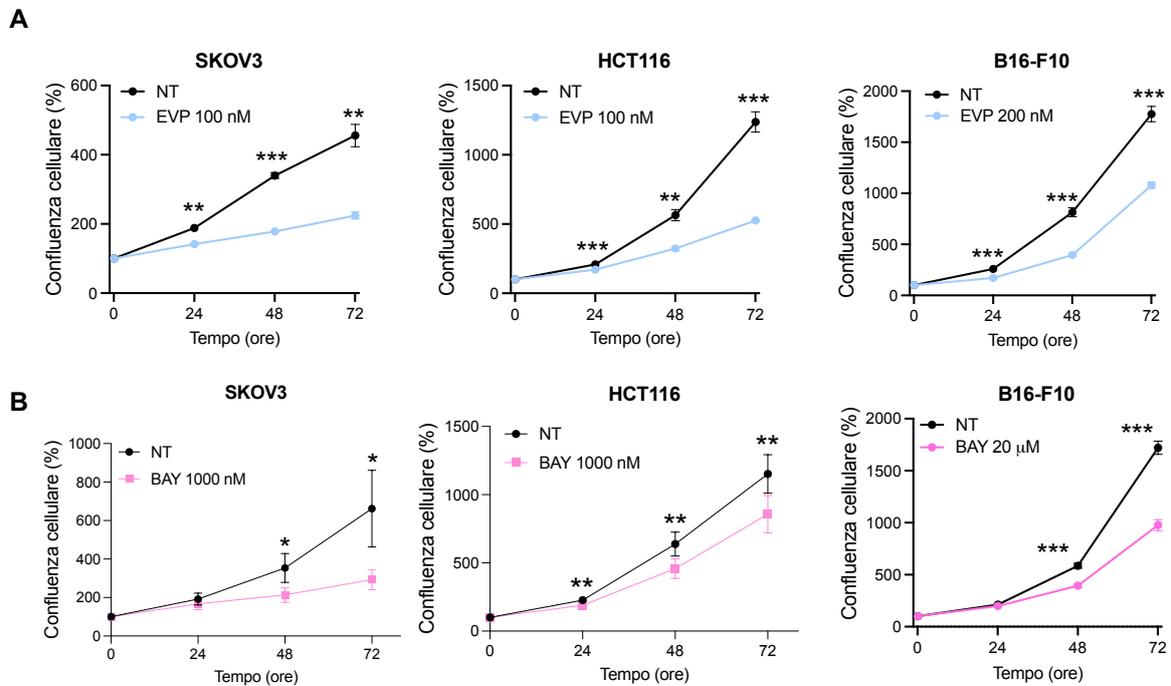


Figura 18 Curve di proliferazione di cellule SKOV3, HCT116 e B16-F10 dopo trattamento con diverse concentrazioni di EVP 4593 (EVP) (A) e BAY 87-2243 (BAY) (B). Le cellule sono state monitorate per 72 ore con il sistema Incucyte Live-imaging. I dati sono presentati in percentuale (%) di confluenza cellulare per ciascun punto temporale e normalizzata rispetto al tempo 0 (T0). I dati sono medi \pm SEM ($n \geq 3$). E' stato eseguito il t-Test tra i campioni non trattati (UT) e quelli trattati a 24, 48 e 72 ore. La significatività statistica è indicata con asterischi (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Una volta associato l'effetto anti proliferativo dei due emergenti inibitori del CI e allo scopo di definire se la riduzione della crescita cellulare fosse un effetto diretto a valle dell'inibizione del CI, sono stati sfruttati i modelli cellulari privi del CI. La specificità degli effetti antiproliferativi osservati sul CI è stata investigata nella controparte cellulare singenica in cui è stato geneticamente rimosso il gene *NDUFS3* che porta ad un disassemblaggio del CI, denominate SKOV3^{-/-}, HCT116^{-/-} e B16-F10^{-/-} [121,123,124]. La generazione di questi modelli cellulari tumorali *NDUFS3* nulli ha permesso lo studio della specificità di EVP 4593 e BAY 872243 nell'indurre gli effetti antiproliferativi selettivamente via CI. In assenza del CI, l'eventuale effetto antiproliferativo che gli

inibitori potrebbero avere sulla crescita delle cellule dovrebbe essere associato ad un meccanismo alternativo.

Anche in questo saggio sono state utilizzate le concentrazioni precedentemente ottimizzate di EVP 4593 (100 nM per SKOV3^{-/-} e HCT116^{-/-} e 200 nM per B16-F10^{-/-}) e BAY 87-2243 (1 μM per SKOV3^{-/-} e HCT116^{-/-}, e 20 μM per B16-F10^{-/-}). Il trattamento con entrambi gli inibitori, nelle linee cellulari prive del CI e alle concentrazioni specifiche di inibizione della respirazione mitocondriale, non causa una riduzione della crescita cellulare (**Fig. 19A-B**). Ne consegue che l'effetto antiproliferativo di BAY 872243 ed EVP 4593, osservato precedentemente nelle controparti singeniche, si esplica in maniera altamente specifica all'inibizione del CI.

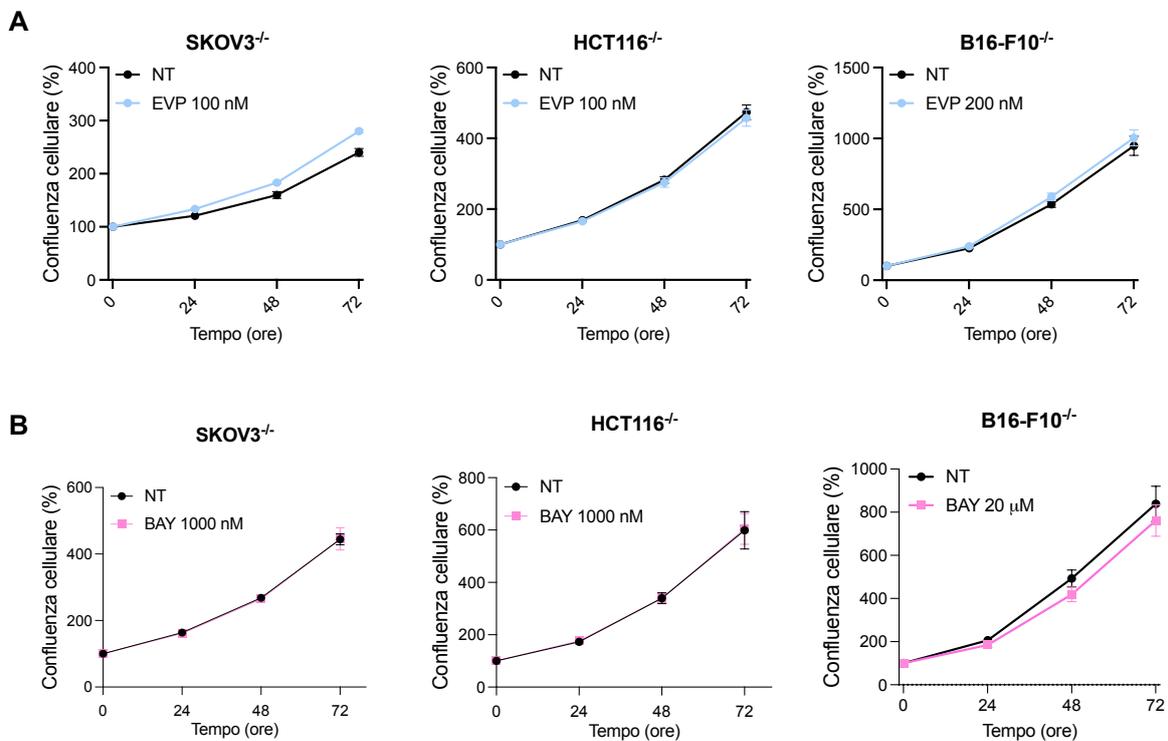


Figura 19 Curve di proliferazione di cellule SKOV3^{-/-}, HCT116^{-/-} e B16-F10^{-/-} dopo trattamento con diverse concentrazioni di EVP 4593 (EVP) (**A**) e BAY 87-2243 (BAY) (**B**). Le cellule sono state monitorate per 72 ore con il sistema Incucyte Live-imaging. I dati sono presentati in percentuale (%) di confluenza cellulare per ciascun punto temporale e normalizzata rispetto al tempo 0 (T0). I dati sono medi ± SEM (n ≥ 3). E' stato eseguito il t-Test tra i campioni non trattati (UT) e quelli trattati a 24, 48 e 72 ore. La significatività statistica è indicata con asterischi (*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001).

Inoltre, le cellule nulle per il CI hanno un tasso di crescita inferiore alle loro controparti con un CI assemblato e funzionale. Il trattamento con EVP 4593 e BAY 87-2243 induce

un blocco della proliferazione cellulare nelle cellule con un CI funzionale analogo alle loro controparti nulle per il CI, indicando che tale effetto antiproliferativo è mediato dall'inibizione del CI.

I modelli nulli per NDUFS3 potrebbero rappresentare un nuovo modello sperimentale per definire e/o confermare la specificità di un farmaco selettivo per il CI, contribuendo in futuro alla caratterizzazione di nuove molecole.

5.3 Gli effetti antiproliferativi dipendenti dall'inibizione del CI non sono associati all'apoptosi

Nonostante le consolidate proprietà antitumorigeniche dei nuovi inibitori del CI, nessuno di essi è attualmente utilizzato nella pratica clinica in quanto diversi aspetti restano tutt'oggi controversi. Ad esempio, i meccanismi alla base degli effetti di queste molecole sono stati raramente sviscerati, il più delle volte associando il loro effetto antiproliferativo alla morte cellulare apoptotica [89,99]. Allo scopo di valutare se la ridotta proliferazione causata dall'inibizione specifica del CI fosse da ricondurre alla morte o, al contrario, all'arresto della divisione cellulare, le linee cellulari neoplastiche SKOV3, HCT116 e B16-F10 sono state monitorate per 72 ore subito dopo il trattamento con EVP4593 e BAY 872243. La metformina è stata utilizzata come controllo positivo, in quanto l'induzione dell'apoptosi osservata nelle cellule tumorali in seguito al trattamento con questo farmaco è un dato già consolidato [99,154]. Inoltre, grazie alla titolazione della metformina in linee cellulari con un CI funzionale (vedi sezione 5.1) è plausibile dedurre che l'effetto citotossico, causato dalle metformina e riportato in letteratura, non è conseguente all'inibizione del CI. Di fatto, le concentrazioni del farmaco che causano apoptosi (20mM) sono nettamente inferiori a quelle che garantiscono un abbattimento della respirazione mitocondriale (50mM).

Grazie all'analisi qualitativa *live-imaging* è stato possibile discernere l'effetto citostatico (l'arresto o il rallentamento della divisione cellulare nell'arco delle 72 ore) o citotossico (le cellule perdono la caratteristica morfologia di cellula adesa in proliferazione e appaiono visibilmente morte) degli inibitori del CI. In aggiunta all'alterazione della

morfologia cellulare, è stata valutata l'attivazione dell'apoptosi valutando l'espressione della caspasi 3/7.

Le cellule tumorali SKOV3, HCT116 e B16-F10 sono state trattate sia con EVP 4593 (100 nM per SKOV3 e HCT116 e 200 nM per B16-F10) che con BAY 87-2243 (1 μ M per SKOV3 e HCT116, e 20 μ M per B16-F10) alle concentrazioni specifiche inibenti il CI. La concentrazione della metformina è stata 20mM, nota in letteratura per indurre l'apoptosi.

Nel pannello di immagini riportato in **Fig.20** è possibile osservare il fenotipo cellulare delle SKOV3, HCT116 e B16-F10 trattate con i diversi inibitori. Le cellule trattate con la metformina appaiono con una morfologia tondeggianta, non adese e quindi visibilmente morte, contrariamente a quelle trattate con gli altri due inibitori. Infatti, le cellule trattate sia con EVP 4593 che BAY 872243, appaiono ben adese, con un fenotipo comparabile a quello delle corrispettive cellule senza trattamento con gli inibitori.

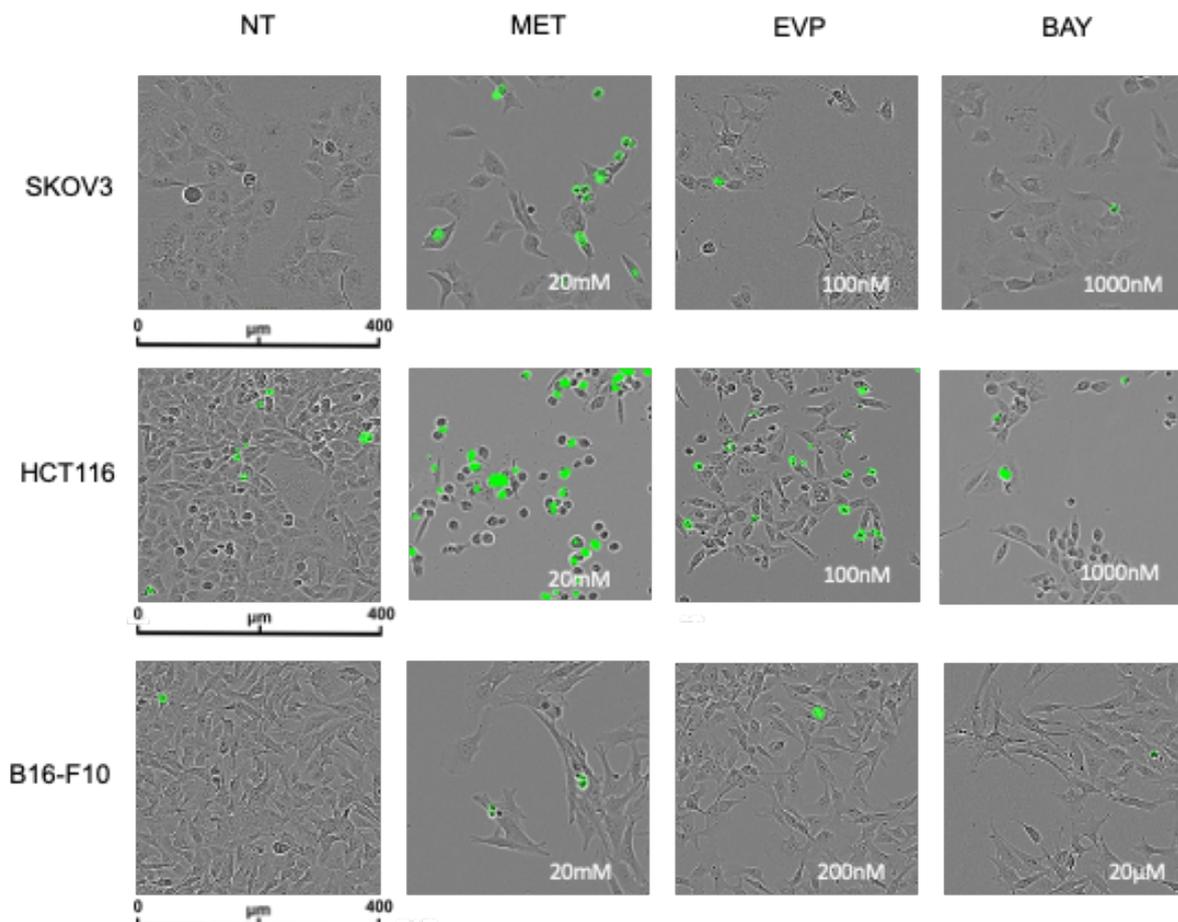


Figura 20 Immagini rappresentative delle linee cellulari SKOV3, HCT116 e B16-F10 trattate con le concentrazioni ottimizzate di EVP 4593 e BAY 87-2243 per 72 ore in presenza di un colorante

fluorescente attivato dalla caspasi-3/7. Barre di scala: 400 μm . Ingrandimento: 10x. La confluenza cellulare e la fluorescenza verde sono state analizzate con il sistema Incucyte Live-imaging. La metformina alla concentrazione di 20mM è stata utilizzata come controllo positivo.

Il dato morfologico è confermato dalla quantificazione della caspasi 3/7. Indipendentemente dal modello cellulare tumorale, la metformina causa un aumento significativo dell'attivazione della caspasi 3/7, indice di una morte apoptotica in corso, sia rispetto alle cellule non trattate con il farmaco che alle cellule trattate con gli inibitori EVP4593 e BAY 872243 (**Fig.21**). Questo dato è in linea con l'induzione dell'apoptosi osservata in cellule di carcinoma epatocellulare in seguito a trattamento con metformina 20mM [155]. La titolazione della metformina, volta a definire la concentrazione minima inibente la respirazione mitocondriale, ha rivelato che la concentrazione di 20mM non è sufficiente ad abbattere il tasso di consumo di ossigeno. Pertanto, l'effetto antiproliferativo, osservato utilizzando la stessa concentrazione negli esperimenti riportati in letteratura, è indipendente dall'inibizione del CI.

L'apoptosi via caspasi 3 è una via specifica di morte cellulare, ma non l'unica. Riguardo la morte cellulare programmata, ci sono due pathway che attivano l'apoptosi: la via estrinseca (mediata dai recettori di morte) e la via intrinseca (mediata dai mitocondri). Entrambe le vie convergono a livello dei mitocondri attraverso la proteina tBID (truncated BH3-interacting domain). I segnali della via estrinseca e intrinseca alla fine inducono la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna al citocromo c e ad altre proteine dello spazio intermembrana mitocondriale. Quando queste proteine vengono rilasciate nel citosol, si verificano altri eventi di segnalazione che attivano la cascata delle caspasi, tra cui le caspasi effettrici 3/7, che tagliano diversi substrati nucleari e citoplasmatici che conducono alla morte della cellula. Il saggio della caspasi 3/7 in Incucyte permette di confermare l'induzione della cascata apoptotica da parte della metformina, ma ciò non esclude che la metformina possa innescare l'attivazione di altri meccanismi di morte cellulare. Infatti, ad un'analisi esclusivamente qualitativa della linea cellulare HCT116 trattata con metformina si apprezza la presenza di molte cellule con una morfologia tondeggianti, non adese e quindi morte ma che non mostrano positività per l'attivazione delle caspasi effettrici 3/7. In questo scenario si pone uno studio recente incentrato sui meccanismi di morte cellulare attivati dalla metformina in linee cellulari di carcinoma mammario [154]. La principale novità di questo studio

vede la metformina coinvolta in due tipi di morte cellulare. Contestualmente, l'utilizzo in singolo di inibitori della pan-caspasi e della necroptosi, rispettivamente Z-VAD e Nec-1, inibiscono gli effetti citotossici del farmaco. La necroptosi è una cascata di morte cellulare non apoptotica, definita una necrosi programmata che può scaturire da segnali interni, come elevati livelli di ROS e stress cellulare, come anche da segnali esterni. Anche in questo studio, le concentrazioni di metformina utilizzate non sono sufficienti per abbattere la respirazione mitocondriale (1mM e 5mM), rafforzando l'ipotesi che l'effetto citotossico indotto dal farmaco è indipendente dall'inibizione del CI.

Le somministrazioni sia di EVP 4593 che di BAY 8722 causano un aumento significativo della percentuale di cellule apoptotiche, rispetto al corrispettivo controllo non trattato. Tuttavia, l'induzione di apoptosi rimane significativamente inferiore a quella indotta dal trattamento con l'inibitore aspecifico metformina.

L'osservazione della morfologia cellulare al termine del trattamento con gli inibitori torna utile perché permette di correlare l'effetto antiproliferativo con l'attivazione di meccanismi di morte cellulare, apoptotici o non, oppure con un blocco della divisione cellulare. Dalla morfologia delle cellule non sembra che l'effetto antiproliferativo sia adducibile ad un evento di morte cellulare, piuttosto ad un rallentamento della crescita.

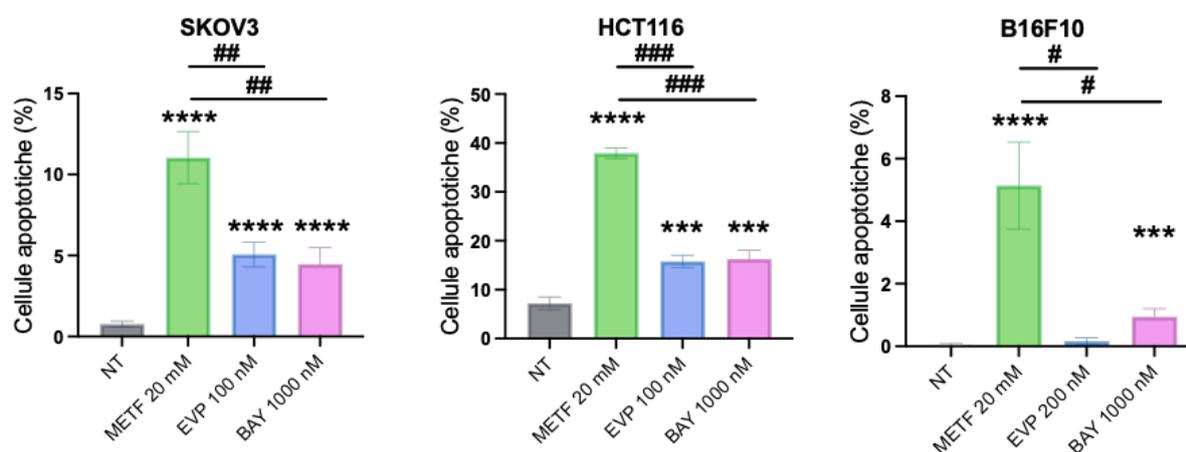


Figura 21 La quantificazione delle cellule apoptotiche espresse in percentuale in ciascun trattamento è stata calcolata dividendo il numero di oggetti verdi positivi per il numero totale di cellule per campo. Le cellule trattate con 20mM di metformina (METF) sono state utilizzate come controlli positivi. I dati sono medi \pm SEM (n=3) e il test t di Student è stato eseguito tra i campioni non trattati (UT) e quelli trattati. La significatività statistica è indicata con asterischi (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Nel nostro gruppo di ricerca, è stato dimostrato che l'ablazione genetica del CI causa una significativa riduzione della crescita di xenograft e una ridotta invasione tumorale, per lo più rallentando la crescita neoplastica piuttosto che innescando la morte cellulare [121]. Tuttavia, questo aspetto non è ancora stato chiarito nel contesto dell'inibizione farmacologica. I dati dell'analisi *in vitro*, raccolti in questo lavoro, indicano che anche l'inibizione selettiva del CI mediata da EVP4593 e BAY 8722 sembra causare il blocco della crescita delle cellule, corroborando l'idea che l'inibizione del CI causi un effetto antitumorale di tipo citostatico. Si deve riconoscere tuttavia che si tratta di un dato indicativo, che richiede ulteriori evidenze sperimentali per poter essere confermato.

Confinare i tumori in uno stato di bassa proliferazione è considerato un valido approccio alternativo all'eradicazione del cancro, poiché trasformare il cancro in una malattia cronica rallenta la sua evoluzione genetica e permette al pool di cellule tumorali in progressione di consumare competitivamente le risorse disponibili. Inoltre, il motivo più comune per la terapia neoadiuvante per il cancro è ridurre le dimensioni del tumore in modo da facilitarne l'asportazione, permettendo interventi chirurgici più conservativi. In questo scenario, l'utilizzo degli inibitori del CI potrebbe rappresentare un promettente approccio terapeutico nel trattamento oncologico.

La maggior parte dei farmaci antineoplastici sono classificati in base alla loro struttura oppure in base alla loro azione sul ciclo cellulare. In particolare, i farmaci antineoplastici ciclo cellulare-specifici sono più efficaci contro i tumori che hanno un alto tasso di proliferazione. La rapida ciclicità garantisce che la cellula attraversi la fase in cui è vulnerabile agli effetti dei farmaci. Un esempio sono gli antimetaboliti che sono specifici per la fase S del ciclo cellulare [156]. Viceversa, i farmaci antineoplastici non ciclo cellulare-specifici agiscono anche su cellule a riposo (fase G₀), le quali sono vulnerabili agli effetti citotossici di questi farmaci tanto quanto le cellule in divisione. Di conseguenza i farmaci non ciclo cellulare-specifici sono più efficaci contro i tumori a crescita lenta.

I farmaci antitumorali sono più efficaci se somministrati in associazione tra di loro. Il criterio alla base della terapia combinata è utilizzare farmaci con differenti meccanismi

d'azione, riducendo così la possibilità di sviluppo di cellule tumorali resistenti. In questo scenario, l'utilizzo di un inibitore del CI, che causa un effetto citostatico sulla popolazione tumorale, potrebbe essere indirizzato in una terapia combinata con un farmaco antineoplastico non ciclo cellulare-specifico, favorendo un effetto sinergico antitumorale.

5.4 EVP 4593 esercita un effetto antiproliferativo *in vivo* paragonabile a quello della metformina

Lo studio *in vitro* di EVP 4593 e BAY 87-2243 ha consolidato la loro selettività verso il CI e la loro efficacia antiproliferativa in diverse linee cellulari tumorali. Inoltre, entrambi gli inibitori riducono la proliferazione cellulare senza essere generalmente citotossici se utilizzati a concentrazioni finemente controllate, in accordo con quanto già riportato da precedenti studi [94,95,157]. Questi risultati supportano il loro uso come agenti antitumorali, ampliando lo spettro di inibitori del CI nel trattamento oncologico.

Alla luce dei dati incoraggianti *in vitro* e allo scopo di valutare l'efficacia antiproliferativa dell'inibizione farmacologica del CI in un modello preclinico, sono stati realizzati esperimenti di formazione di xenograft della linea HCT116 in topi immunodepressi e successivamente trattati con EVP 4593 e metformina. BAY 872243 è stato escluso dall'esperimento perché già supportato da un considerevole numero di esperimenti *in vivo* nell'ambito del trattamento oncologico. Inoltre, dagli esperimenti *in vitro* è emerso essere meno potente di EVP 4593. Pertanto, è stato valutato l'effetto antitumorigenico *in vivo* di EVP 4593, in merito al quale sono riportati pochissimi studi nel contesto tumorale, confrontandolo con quello della metformina, essendo l'inibitore del CI più comunemente usato nel trattamento clinico, seppure in contesti patologici diversi.

Il gruppo di animali di controllo mostra una crescita più rapida del volume tumorale rispetto ai gruppi di animali trattati con i farmaci, non del tutto sorprendente in quanto il carcinoma del colon retto è di tipo aggressivo e quindi con un rapido tasso proliferativo. La somministrazione della metformina causa una riduzione significativa della crescita tumorale rispetto ai controlli, già a partire dall'undicesimo giorno.

Analogamente, il trattamento con EVP 4593 rallenta la crescita del tumore in maniera significativa, già a partire dall'undicesimo giorno, rispetto ai controlli, in modo comparabile alla metformina (**Fig.22**).

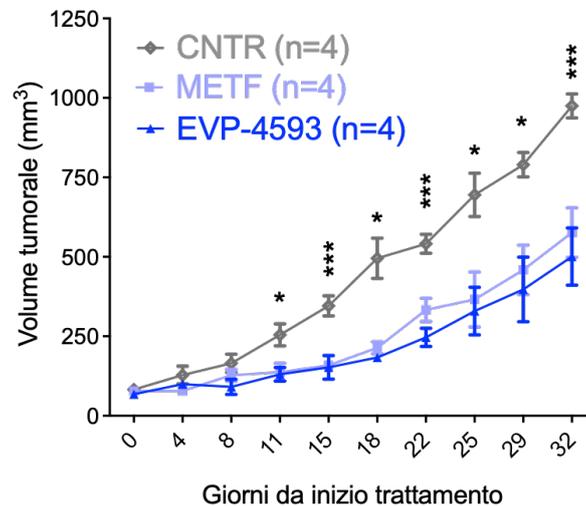


Figura 22 Esperimenti di crescita in vivo di xenograft HCT116 trattati con gli inibitori del CI (metformina-METF ed EVP4593) e con DMSO (CNTR). Curva di crescita degli xenograft fino a 32 giorni dopo il trattamento con metformina ed EVP-4593, escludendo i tumori che nell'arco del trattamento hanno sviluppato necrosi esterna. I dati rappresentano la media \pm s.e.m. La significatività statistica è indicata con gli asterischi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$).

Nonostante si tratti di un esperimento pilota, il risultato preliminare è incoraggiante e spinge ad approfondire ulteriori aspetti, quali ad esempio la misurazione della concentrazione del farmaco, sia nel plasma che nel tumore, dopo il trattamento con gli inibitori, soprattutto per l'inibitore EVP 4593, per il quale gli studi attuali sono molto limitati. Determinare la concentrazione del farmaco nel tumore permetterebbe di associare o meno l'effetto antitumorale all'inibizione specifica del CI.

La metformina riesce ad abbattere la respirazione mitocondriale in cellule tumorali *in vitro* solo ad alte concentrazioni, nell'ordine del millimolare, quindi non traslabili nella clinica [148]. Uno studio *in vivo*, condotto da Wheaton et al., rivela che il trattamento con la metformina, con concentrazioni analoghe a quelle utilizzate nell'esperimento appena descritto, riduce la tumorigenesi in modelli di xenograft di HCT116. Contestualmente, la concentrazione del farmaco sia nel tessuto tumorale che nel plasma sono entrambe nell'intervallo di 3.2–12.4 μM . Per cui, alla luce dei dati ottenuti dalla

titolazione della metformina, l'effetto antitumorale del farmaco nei modelli di xenograft potrebbe non essere associato all'inibizione del CI. La metformina può sopprimere la progressione tumorale modulando la fisiologia metabolica dell'intero organismo o agendo direttamente sulle cellule tumorali. L'assunzione di questo farmaco diminuisce la produzione epatica di glucosio, con conseguente riduzione dei livelli sistemici di glucosio e insulina, che potrebbe compromettere la crescita maligna in modo indiretto senza richiedere l'accumulo di metformina nel tumore. In alternativa, la metformina può agire direttamente sulle cellule tumorali, inibendo la progressione del cancro attraverso la soppressione della segnalazione di mTOR, l'ossidazione mitocondriale del glucosio e/o la riduzione della stabilità di HIF in condizioni di ipossia [78]. Quindi pur esercitando un effetto antiproliferativo sulla crescita del tumore delle linee HCT116 *in vivo* dopo trattamento con la metformina, bisogna tenere conto che presumibilmente si tratta di un effetto indiretto, aspecifico e non associato all'inibizione del CI.

Dalle curve del volume tumorale si evidenzia un rallentamento della crescita tumorale negli animali trattati con EVP 4593 e metformina, garantendo una sopravvivenza prolungata degli animali, i quali impiegano più tempo a sviluppare le masse tumorali di 1 cm³ ('end point' dell'esperimento). Infatti, le curve ottenute con il metodo di Kaplan-Meier dimostrano che gli animali trattati con EVP 4593 e metformina sopravvivono di più rispetto ai controlli (**Fig. 23 A-C**). In particolare, la curva di sopravvivenza dei controlli ha una mediana di sopravvivenza di circa 33 giorni, mentre quelle dei trattamenti sono maggiori, estendendosi a 41 giorni nei topi trattati con metformina e 44 giorni in quelli trattati con EVP 4593 (**Fig. 23 A-C**).

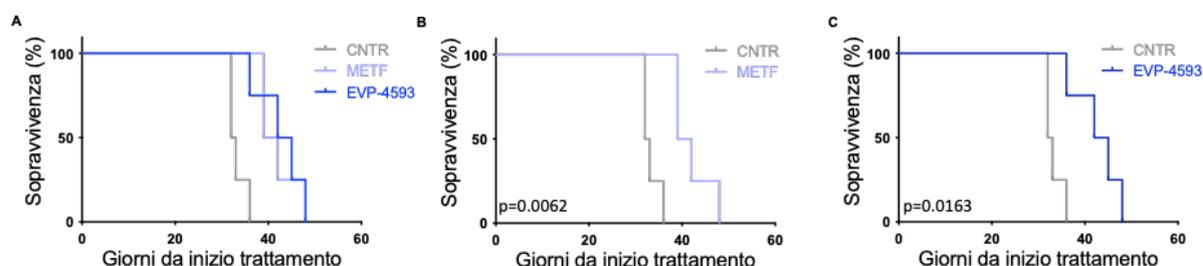


Figura 23 Esperimenti di crescita *in vivo* di xenograft HCT116 trattati con gli inibitori del CI (metformina-METF ed EVP4593) e con DMSO (CNTR). Sono rappresentate le curve di sopravvivenza Kaplan-Meier per

le quali come end-point è stato stabilito il raggiungimento di una dimensione del tumore $>1 \text{ cm}^3$. In ogni grafico è indicata la significatività con il p value (p).

Anche se la sopravvivenza è significativamente allungata, tutti i tumori, indipendentemente dal trattamento con EVP 4593 o metformina, arrivano a raggiungere il volume di 1 cm^3 (**Fig.24**). Questo dimostra che l'effetto antitumorale dei due inibitori è quello di rallentare la progressione tumorale, ma non di arrestarla.

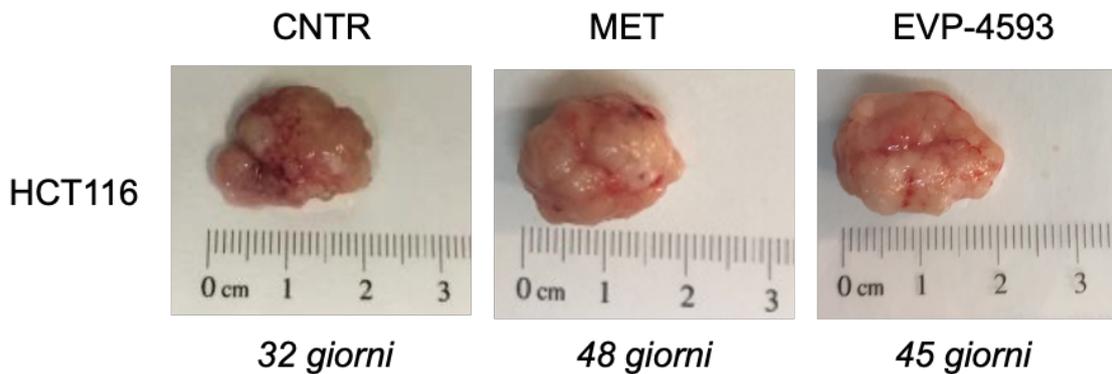


Figura 24 Esperimenti di crescita *in vivo* di xenograft HCT116 trattati con gli inibitori del CI (metformina-METF ed EVP4593) e con DMSO (CNTR). Immagini rappresentative dei tumori espantati.

Complessivamente, questi risultati evidenziano l'azione antitumorigenica *in vivo* di metformina ed EVP4593, i quali causano la riduzione del volume tumorale, e l'aumentata sopravvivenza degli animali trattati. Da questi primi dati preliminari, i quali necessitano di essere consolidati aumentando la numerosità degli animali, si evince che l'effetto antiproliferativo dei singoli inibitori è simile fra di loro e l'efficacia di EVP4593 nel prolungare la sopravvivenza degli animali sembra equivalente a quella della metformina.

L'ablazione genetica del CI ha dimostrato rallentare la crescita tumorale *in vivo*, ma non arrestarla. Inoltre, contestualmente, la destabilizzazione di HIF-1 α altera la vascolarizzazione tumorale nei tumori privi del CI, compromettendo l'apporto di nutrienti. Di fatto, la vascolarizzazione tumorale risulta caratterizzata principalmente da vasi piccoli, immaturi e privi di lume [121]. Saranno necessarie ulteriori analisi per valutare se il fenomeno osservato a valle dell'inibizione genetica del CI *in vivo* è ricapitolato farmacologicamente.

Un severo danno funzionale del CI causa un drastico calo della fosforilazione ossidativa con un aumento del rapporto AMP/ATP e l'attivazione della chinasi AMPK mediante fosforilazione (AMPK-P). Al fine di valutare se il trattamento con EVP 4593 e metformina induca uno stress energetico, sarà analizzato lo stato di attivazione di AMPK nei lisati totali proteici estratti da xenograft.

Le differenze principali tra i due farmaci, alla luce degli esperimenti riportati sia in questo lavoro che in letteratura, sono la potenza e la specificità. Nonostante l'effetto sul tumore, a seguito dei due trattamenti sia comparabile, è ragionevole pensare che nel caso della metformina, il farmaco possa coinvolgere anche altri meccanismi molecolari, scatenando effetti aspecifici nell'organismo. In questo contesto, è importante sottolineare che, allo scopo di definire le concentrazioni ottimali, la specificità dell'inibitore del CI dovrebbe essere valutata anche nella sperimentazione preclinica *in vivo*, possibilmente confrontando l'effetto antiproliferativo tra modelli tumorali con un CI funzionale e con un CI danneggiato, analogamente agli esperimenti condotti *in vitro*.

Inoltre, l'inibizione specifica del CI non è indicativa del tipo di danno apportato al CI. L'effetto della disfunzione del CI sulla crescita e sulla sopravvivenza delle cellule tumorali può essere duplice e a volte opposto [52]. Infatti, da un lato, una stabilità minima del CI è necessaria per alcuni tumori per avere una fosforilazione ossidativa funzionale, favorendo la progressione tumorale e impedendo la generalizzazione dell'ipotesi Warburg. Dall'altro, una grave disfunzione del CI può essere svantaggiosa per la crescita tumorale, designandolo infatti come un promettente target terapeutico. L'utilizzo degli inibitori specifici del CI ha come scopo ultimo quello di indurre un danno funzionale al CI e quindi avere a valle un effetto antitumorigenico e non viceversa. È noto che alcuni inibitori del CI stimolano la produzione di specie reattive dell'ossigeno che sono noti modulatori della progressione e dell'aggressività dei tumori [158]. A questo proposito, non è mai stato osservato un aumento della proliferazione cellulare in tutti i modelli studiati e in tutte le condizioni testate, indicando che la produzione di specie reattive dell'ossigeno potrebbero non essere rilevanti nel meccanismo d'azione di EVP 4593, BAY 87-2243 e metformina alle concentrazioni che inibiscono selettivamente il CI. Pertanto, un dosaggio ben tollerato e preciso di inibitori specifici

della CI è particolarmente consigliabile per evitare effetti collaterali dannosi che possono coinvolgere il sistema nervoso, nonché i muscoli cardiaci e scheletrici, o aumentare la progressione e l'aggressività del tumore.

5.5 P53 influenza l'effetto degli inibitori del CI

Le cellule tumorali sono in grado di riprogrammare il proprio metabolismo a seconda della disponibilità di nutrienti e del microambiente che le circonda [2].

Nell'utilizzo di farmaci che inibiscono la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) e quindi il metabolismo cellulare, è importante considerare questa plasticità metabolica, variabile da tumore a tumore e che potrebbe essere un fattore che determina la sensibilità di una cellula neoplastica all'inibizione del CI. Si consideri inoltre che un elevato contributo dell'OXPHOS nella produzione energetica di una cellula non ne implica una sua dipendenza, così come cellule tumorali in grado di sostenere la proliferazione attraverso la sola glicolisi aerobica potrebbero comunque essere suscettibili all'inibizione dell'OXPHOS [64]. Pertanto, puntare su una via metabolica specifica potrebbe essere inefficace nell'inibire la crescita tumorale. Per mirare a tale flessibilità metabolica, in un recente lavoro [88], combinano il digiuno intermittente, un approccio clinicamente attuabile per ridurre la disponibilità di glucosio ematico, con il noto inibitore del CI metformina. Contestualmente, nei modelli di xenograft derivati da HCT116 ed esposti a cicli di alimentazione/digiuno per 24h, la metformina compromette la crescita tumorale solo quando somministrata durante l'ipoglicemia indotta dal digiuno. Gli stessi autori, successivamente, studiano *in vitro* gli eventi molecolari dell'effetto sinergico della terapia combinata. Così, gli effetti antineoplastici mediati dalla combinazione metformina/ipoglicemia sono associati ad un collasso metabolico ed all'induzione di apoptosi mediante la modulazione della via PP2A (Protein phosphatase 2A) - GSK3 β (glicogeno sintasi chinasi 3b) - MCL1 (Myeloid cell leukemia 1) (**Fig. 25**).

PP2A è una delle principali serina-treonina fosfatasi agente come oncosoppressore. L'inattivazione genetica e/o funzionale di PP2A, e quindi la perdita della sua attività di fosfatasi, sono state riscontrate in diversi tipi di tumori [159,160]. La soppressione tumorale della PP2A avviene tramite la regolazione del grado di de-fosforilazione della GSK3 β [161,162]. Quest'ultima, a sua volta, assume un ruolo cruciale nel collasso

energetico, diminuendo l'espressione della proteina anti-apoptotica MCL-1 e quindi regolando positivamente la cascata apoptotica [163,164]. Quindi, la presenza funzionale dell'oncosoppressore PP2A assume un ruolo chiave della citotossicità della combinazione metformina ed ipoglicemia.

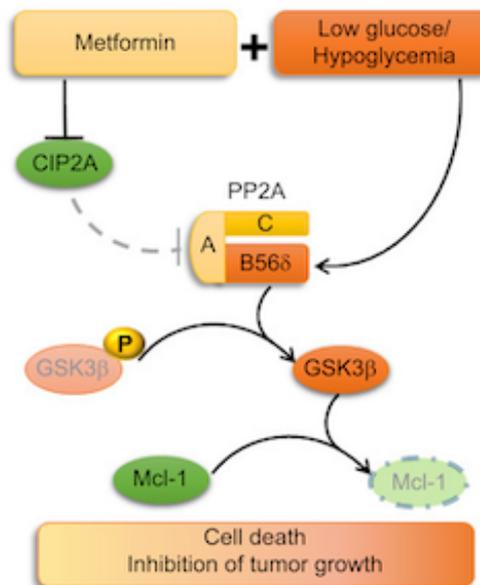


Figura 25 Rappresentazione schematica del meccanismo molecolare della plasticità metabolica delle cellule tumorali in seguito alla combinazione glucosio-metformina [88].

Da un lato, lo studio di Elgendy et al., alimenta l'interesse nell'esplorare l'uso degli inibitori del CI nella terapia antitumorale combinata, nonostante in alcuni contesti possano essere efficaci anche se utilizzati come singoli agenti; dall'altro, sottolinea quanto la perdita funzionale/genetica di determinati oncosoppressori possa comportare un fallimento del trattamento sinergico, suggerendo un potenziale approccio strategico per la stratificazione dei pazienti.

L'adattamento metabolico è un evento di riprogrammazione multifattoriale ed organo-specifico, frutto di una complessa integrazione di eventi mutazionali nei più noti driver della tumorigenesi. Pertanto, un altro fattore che potrebbe influenzare l'efficacia terapeutica di inibizione del CI è l'accumulo di mutazioni in oncogeni ed oncosoppressori. Ad esempio, amplificazioni nell'oncogene c-myc o mutazioni

nell'oncosoppressore *TP53*, sono correlate ad attività anaboliche o cataboliche includenti la glicolisi ed il controllo dell'omeostasi redox nel cancro [165,166].

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 che favorisce, ad esempio, l'espressione del trasportatore del glucosio di tipo 1 (GLUT1) o della fosfo-fruttochinasi (PFK) che promuove la terza reazione della glicolisi [167]. Inoltre, l'attivazione di *c-myc* promuove l'espressione della glutammina 1 (GLS1), che idrolizza la glutammina in glutammato ed ammoniaca influenzandone il metabolismo [168].

TP53, codificante l'oncosoppressore p53, è invece il gene più frequentemente mutato nei tumori umani [169] e conseguentemente uno dei geni soppressori più studiati e meglio caratterizzati. In generale, p53 regola la glicolisi [115], la fosforilazione ossidativa [116], la glutaminolisi [170], la risposta antiossidante [170,171] ed infine coordina la segnalazione autofagica [172], e di mTOR [173]. Ciò garantisce l'innescò da parte di p53 di un ampio range di risposte allo stress metabolico, dipendente dal suo stato genetico. Mutazioni somatiche nell'oncosoppressore *TP53*, che possono condurre alla perdita della canonica funzione dell'oncosoppressore e/o all'acquisto di funzioni neomorfe pro-oncogeniche, sono state identificate in circa il 50% dei tumori umani. Gli hotspot mutazionali più noti e caratterizzati (p.R175H, p.R181H, p.R249S, p.R273H) sembrano favorire il metabolismo glicolitico [111,174], ma alcune delle mutazioni identificate sono di significato biologico ancora ignoto.

L'efficacia del trattamento sinergico, inibizione del CI associata ad ipoglicemia, osservata nello studio di Elgendy et al. [88], è stata ricapitolata e approfondita nel seguente lavoro sfruttando un pannello di diverse linee cellulari tumorali, CI nulle e con un diverso stato genetico dell'oncosoppressore *TP53*.

Specificamente, sono state impiegate le linee 143B^{NDUFS3-/-} (da osteosarcoma) ed HCT116^{NDUFS3-/-} (da carcinoma colon-rettale) in cui è stato indotto, tramite *genome editing*, il knock out del gene di codifica nucleare *NDUFS3* responsabile dell'assemblaggio del CI [121].

Si noti inoltre che le 143B^{NDUFS3^{-/-}} sono caratterizzate da una mutazione in omozigosi apparente sul gene *TP53* che porta ad un cambio amminoacidico sul dominio di legame al DNA (p.R156P), mentre le HCT116^{NDUFS3^{-/-}} sono nulle per p53.

Dalla linea HCT116^{NDUFS3^{-/-}} con stato p53 nullo (p53^{-/-}) è stata poi generata la controparte p53 wild-type (p53^{+/+}), rinominata (HCT116^{p53^{+/+}; NDUFS3^{-/-}}). Infine, è stata generata la linea tumorale ovarica OV90 in cui è stato indotto lo stesso deficit genetico sulla subunità NDUFS3 (OV90^{NDUFS3^{-/-}}). Le OV90 sono caratterizzate da una mutazione in omozigosi apparente sul gene *TP53* che porta, come per le 143B, ad un cambio amminoacidico sul dominio di legame al DNA (p.S215R).

Nelle quattro linee cellulari sopra descritte è stata valutata la vitalità cellulare fino alle 72h, sia nelle condizioni di coltura con una concentrazione di glucosio standard (25mM) che in presenza di una concentrazione di glucosio prossima a quella fisiologica (5mM). Le linee cellulari 143B^{NDUFS3^{-/-}}, OV90^{NDUFS3^{-/-}} e HCT116^{NDUFS3^{-/-}} mostrano una significativa riduzione della vitalità cellulare in basso glucosio a tempi prolungati, ma variabili tra le tre linee, evidenziando una sensibilità eterogenea alla carenza di glucosio anche all'interno dei modelli con deficit del CI (**Fig.26A**). La linea HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{+/+}}, invece, non sembra risentire dell'effetto del basso glucosio in termini di proliferazione cellulare. Inoltre, il deficit energetico e nutrizionale è sempre associato ad un caratteristico fenotipo di stress nei modelli in esame (**Fig.26B**), eccetto nella linea HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{+/+}}, che appare resistente. Mentre le cellule coltivate ad una concentrazione di glucosio di 25mM appaiono con una morfologia allungata e ben adese, quelle coltivate a 5mM risultano di minori dimensioni, con bordi frastagliati e non adese alla superficie.

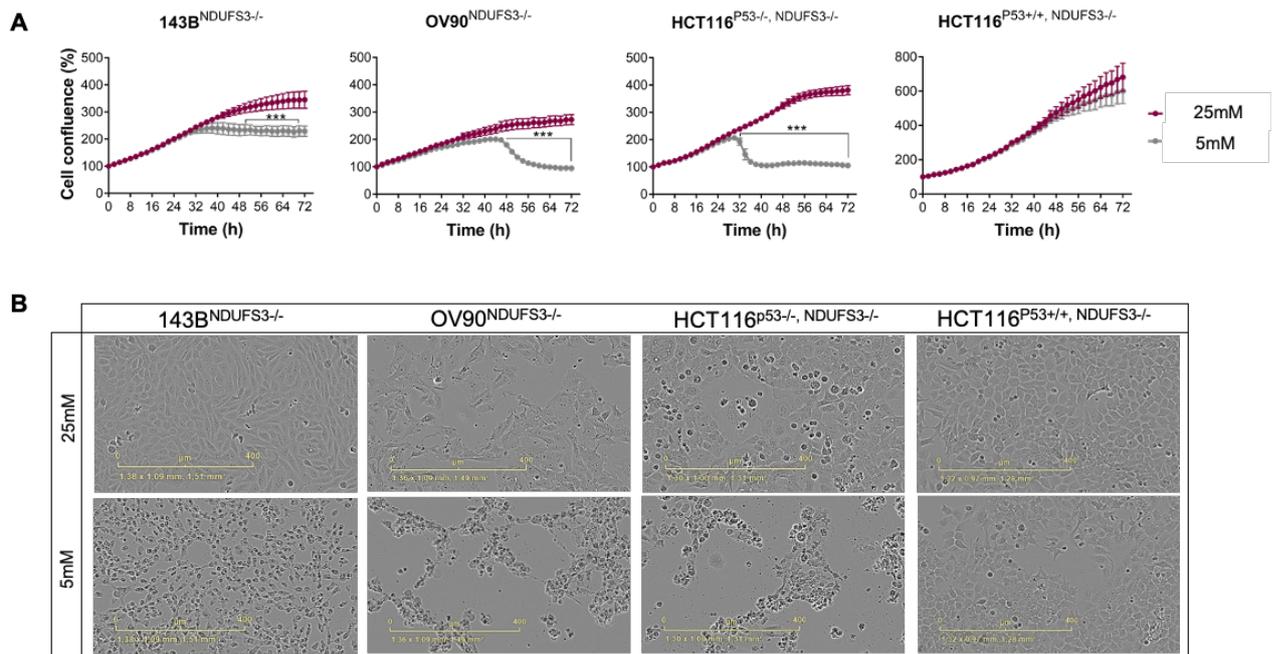


Figura 26 (A) Saggio di vitalità cellulare eseguito utilizzando *Incucyte live-cell imaging* di linee cellulari NDUFS3+/+ e NDUFS3-/- 143B (n=4), OV90 (n=3), HCT116^{p53-/-} (n=2) e HCT116^{p53+/+} (n=2) coltivate in glucosio 25 (HG) e 5mM (LG) per 72h. La percentuale (%) di proliferazione cellulare è stata calcolata come confluente cellulare (cell confluence%) normalizzata al tempo 0 (T0). I dati sono rappresentati come media±SEM. (B) Immagini rappresentative di NDUFS3+/+ e NDUFS3-/- 143B, OV90, HCT116^{p53-/-} e HCT116^{p53+/+}. Le cellule sono state coltivate in glucosio 5mM per 72h. Le immagini sono state scattate a partire dal time-point di 48h con un ingrandimento di 10x utilizzando il live-cell imaging di Incucyte. La barra di scala rappresenta 400 µm.

La capacità di resistere della linea p53+/+ suggerirebbe un adattamento al deficit del CI ed un riarrangiamento delle vie metaboliche. È noto che, in alcune cellule tumorali, mutazioni che danneggiano la funzionalità dei mitocondri innescano una riprogrammazione metabolica verso la carbossilazione riduttiva della glutammina [175] o l'attivazione della piruvato carbossilasi [176], sostenendo i processi anaplerotici e anabolici necessari per la proliferazione.

P53, oltre a contribuire alla sopravvivenza di cellule tumorali cresciute in assenza di glucosio [102], induce una risposta di adattamento anche in seguito alla rimozione degli aminoacidi non essenziali serina e glicina. Infatti, in uno studio condotto da Maddocks et al., linee cellulari HCT116 p53-/- risultano più sensibili, in termini di proliferazione, alla deplezione dei due aminoacidi rispetto alla controparte HCT116 p53+/+. In particolare, in presenza di un genotipo p53+/+, le cellule subiscono un arresto in fase G1, dipendente da p21, consentendo ai limitati livelli di serina *de novo* di essere incanalati verso la produzione di GSH, preservando così la capacità cellulare anti-

ossidante [177]. In questo scenario, la funzionalità dell'OXPHOS è determinante. Infatti, la crescita delle cellule p53+/+ è completamente inibita in presenza della oligomicina, noto inibitore dell'ATP sintasi mitocondriale, e in assenza di serina e glicina.

In un contesto di danno funzionale del CI e di mancanza di nutrienti, il gene soppressore tumorale *TP53* può svolgere un ruolo cruciale nell'adattamento metabolico modulando l'equilibrio tra le vie ossidative e quelle glicolitiche (**Fig.27**) [1]. È noto il ruolo di p53 nel mantenimento della fosforilazione ossidativa mitocondriale. P53 induce l'espressione del fattore che induce l'apoptosi (*AIF*) per mantenere l'integrità del CI [179], come anche di *GLS2*, che catalizza l'idrolisi della glutammina a glutammato, promuove la fosforilazione ossidativa mitocondriale e aumenta la sintesi di glutazione (GSH) per ridurre i livelli di ROS nelle cellule [170,171]. Inoltre, p53 regola positivamente la sintesi del fattore di assemblaggio del complesso IV della citocromo c ossidasi 2 (*SCO2*), sottendendone un ruolo di p53 nel potenziamento della respirazione mitocondriale [116].

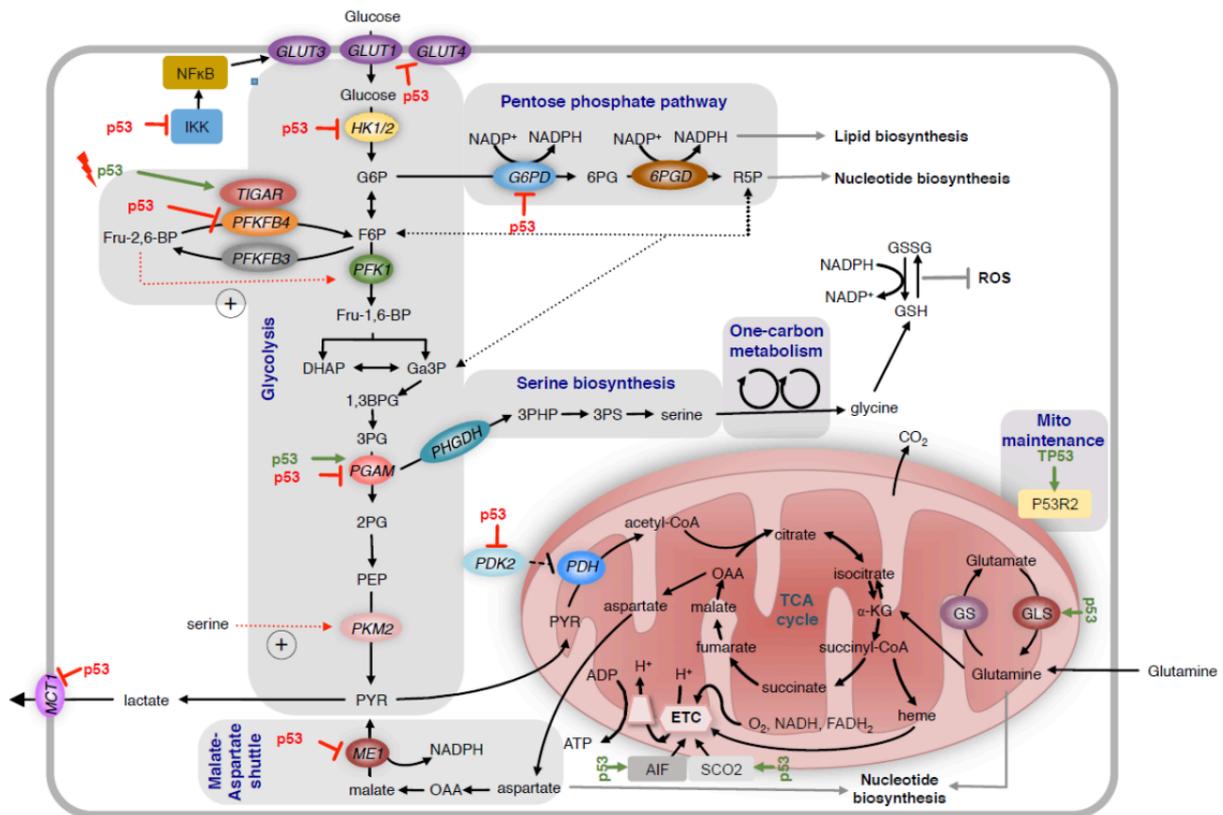


Figura 27 Rappresentazione schematica della regolazione del metabolismo glicolitico e ossidativo da parte di p53 [178].

Successivamente, l'espressione della proteina p53 è stata validata nei modelli cellulari CI nulli (**Fig.28**), per confermare che la proteina p53 fosse sovraespressa e stabile laddove mutata ed assente nelle nulle.

Nelle linee 143B^{NDUFS3-/-} ed OV90^{NDUFS3-/-}, entrambe caratterizzate dalla presenza di una p53 mutata (p.R156P e p.S215R rispettivamente), si osserva la scomparsa della proteina p53 in condizioni di glucosio 5mM. Sebbene non vi siano studi in letteratura che caratterizzino l'effetto biologico delle due mutazioni sul gene *TP53*, un'analisi condotta sullo IARC *TP53 database* definisce la sostituzione amminoacidica p.R156P (143B) come non patogena e la sostituzione p.S215R (OV90) come patogena. 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 diminuire il potenziale tumorigenico, sfavorendo il tumore. Difatti, è noto che l'accumulo e la stabilizzazione dei mutanti p53 conferiscono proprietà tumorigeniche (gain of function - GOF) durante la progressione maligna [180,181]. Per tali ragioni, mirare farmacologicamente ai meccanismi che regolano la sua stabilizzazione è emerso come un approccio terapeutico promettente. Un risultato inatteso è osservato nella linea cellulare p53+/+, la stessa in cui, pur non avendo un CI funzionale e la cui proliferazione non è influenzata dalla carenza di glucosio. Contestualmente, i livelli di espressione della proteina p53 sono inalterati, supportando l'ipotesi di una riprogrammazione metabolica in atto.

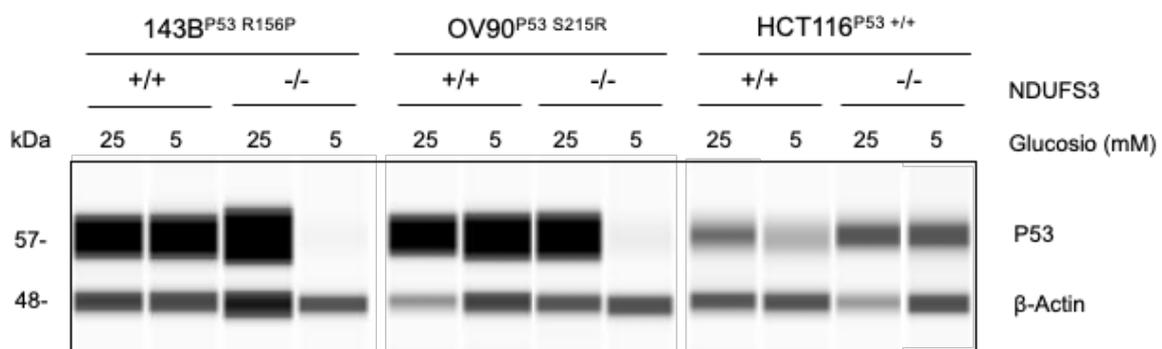


Figura 28 Espressione della proteina P53 valutata mediante elettroforesi capillare con sistema western blot (WES) in linee cellulari NDUFS3+/+ e NDUFS3-/- 143B (n=3), OV90 (n=3) e HCT116^{P53+/+} (n=3) per 48h in glucosio 25 (HG) e 5mM (LG). La β-actina è stata usata come controllo del caricamento delle proteine.

5.6 Disfunzioni del CI inducono un blocco della sintesi proteica nelle linee cellulari p53 mutate e nulle

L'auxotrofia da amminoacidi è una caratteristica di alcuni tumori solidi [104,182], la quale può essere esacerbata in presenza di un severo danno nell'ETC o di un rallentamento nel TCA. È noto, infatti, che l'inibizione generica dell'ETC, in particolare del CI, riduca il pool di equivalenti riducenti essenziali per sostenere la sintesi di aspartato intracellulare [78], compensato a sua volta dal supplemento esogeno di piruvato che fornisce un pathway alternativo per la rigenerazione del pool di NAD⁺ [44].

L'aspartato può essere prodotto dall' α -KG tramite due diverse vie biosintetiche: una riduttiva ed una ossidativa (**Fig.29**). Entrambe le vie, nel susseguirsi dei vari passaggi di reazione, richiedono un cospicuo pool di NAD⁺ e FAD, la cui disponibilità è soggetta a variazioni in particolari condizioni di stress, tra cui un difetto nella respirazione mitocondriale [44].

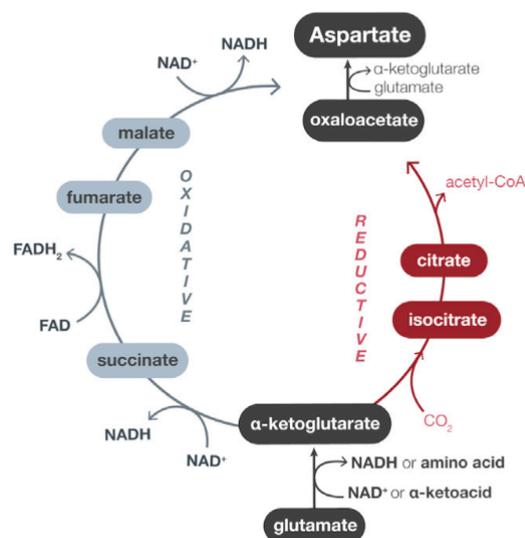


Figura 29 Rappresentazione schematica delle vie del TCA cruciali per la biosintesi di aspartato [44].

A sostegno di ciò, in un lavoro del 2018, è stata saggiata la vitalità cellulare di un pannello di linee cellulari tumorali in seguito all'inibizione dell'ETC, dimostrando come

la diversa suscettibilità al danno mitocondriale dipenda dalla disponibilità di aspartato, che si caratterizza pertanto come metabolita limitante per la proliferazione [32]. L'aspartato è un amminoacido polare non essenziale ed un nutriente anaplerotico cruciale per sostenere il metabolismo ossidativo ed il TCA, la cui auxotrofia rende altamente vulnerabili le cellule tumorali. 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.

Studi recenti di metabolomica, effettuati dal nostro gruppo di ricerca, hanno evidenziato una diminuzione significativa dei livelli di aspartato nelle linee cellulari HCT116 e 143B con un danno funzionale al CI rispetto alla controparte singenica con un CI funzionale (**Fig.30,**) [183]. 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.

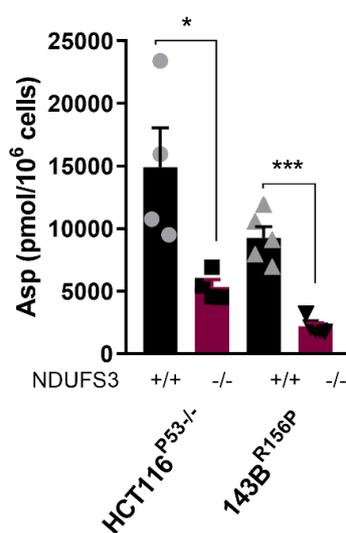


Figura 30 Misurazione dei livelli intracellulari di aspartato mediante spettrometria di massa in linee cellulari NDUFS3+/+ e NDUFS3-/- 143B (n=5) e HCT116P53-/- (n=4) coltivate in 25mM di glucosio. I dati sono rappresentati come media±SEM.

La mancata sintesi di aspartato potrebbe condurre ad un calo dell'aminoacido all'interno delle cellule, che può bloccare successivamente la traduzione di molte proteine causandone uno stallo sul ribosoma. Inoltre, un suo deficit inficerebbe tanti meccanismi

in cui è direttamente coinvolto, ovvero un'alterazione dei meccanismi di sintesi delle purine e delle pirimidine, essenziali per la sintesi di DNA e RNA, come anche un calo della sintesi di trasportatori di energia, come ATP e GTP, e di cofattori come il NAD⁺ e il FAD.

La sintesi proteica è un processo altamente dispendioso e finemente regolato per resistere alle costanti fluttuazioni della disponibilità di nutrienti ed ossigeno del microambiente tumorale. 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, esacerbato presumibilmente dall'auxotrofia da aspartato. Quindi, è stato valutato se un contesto di danno funzionale al CI e deprivazione di nutrienti potesse condurre un blocco della sintesi proteica cellulare.

Per valutare un eventuale blocco della sintesi proteica le cellule sono state trattate con puromicina, un antibiotico aminonucleoside che blocca la sintesi proteica, sia nei procarioti che negli eucarioti, causando la terminazione prematura delle catene polipeptidiche nascenti. Si presenta strutturalmente simile ad un RNA transfer (tRNA), con una modifica sulla base dell'adenosina, legata covalentemente ad una tirosina [184]. La differenza principale risiede nella natura del legame tra l'amminoacido e il ribosio: un estere labile nel tRNA amminoacilato (aa-tRNA) contro un legame peptidico stabile nella puromicina (**Fig. 31A**). Come l'aa-tRNA, la puromicina può entrare nel sito A ribosomiale, dove il suo gruppo amminico libero accetta una catena polipeptidica nascente dal peptidil-tRNA del sito P. L'incorporazione della puromicina nel C-terminale delle catene nascenti impedisce un ulteriore allungamento e determina una terminazione prematura e irreversibile della traduzione (**Fig. 31B**).

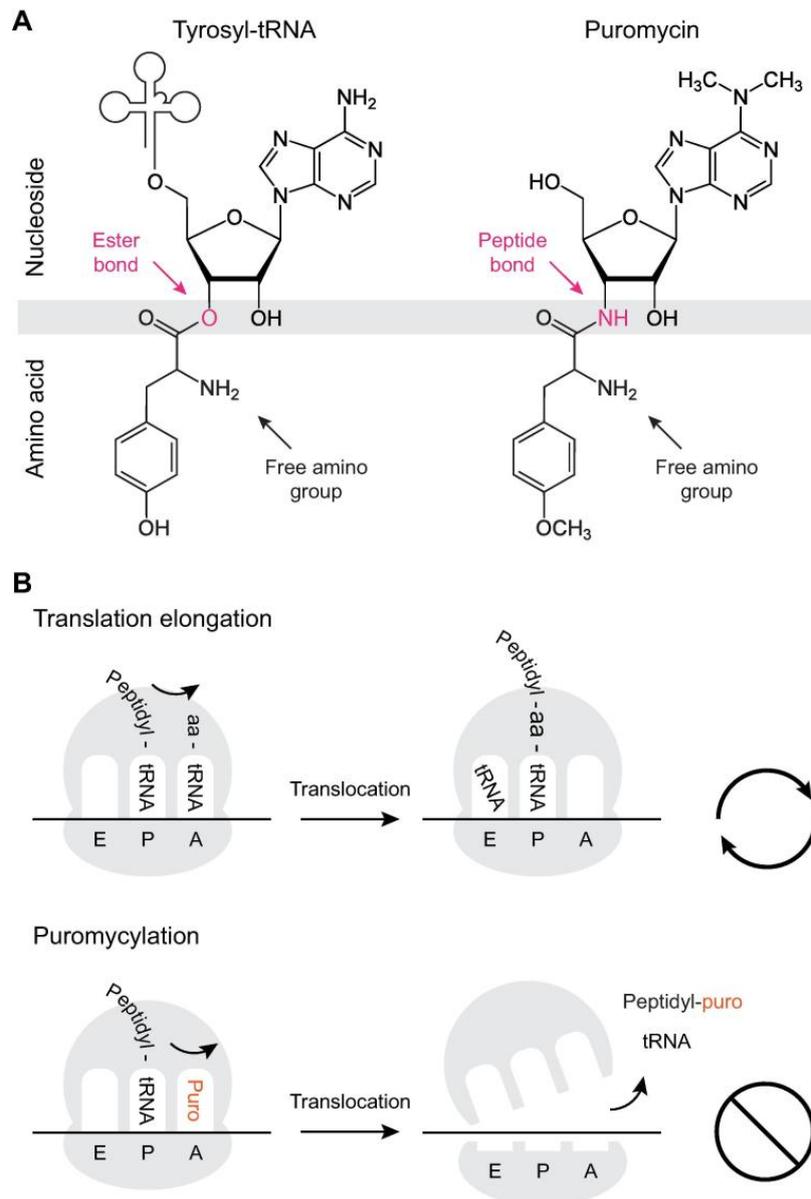


Figura 31 Struttura e meccanismo d'azione della puromicina. **(A)** Strutture chimiche dell'estremità 3' di un tirosil-tRNA aminoacilato (a sinistra) e della puromicina (a destra). I diversi legami tra le porzioni nucleosidiche e aminoacidiche sono evidenziati in rosa. **(B)** Meccanismo di base dell'azione della puromicina. Durante l'allungamento della traduzione, l'aa-tRNA entra nel sito A e accetta la catena polipeptidica nascente dal peptidil-tRNA nel sito P. Dopo la traslocazione, il sito A diventa disponibile per accogliere il successivo aa-tRNA (in alto). Come l'aa-tRNA, la puromicina può entrare nel sito A e legarsi alla catena nascente. Ciò determina la terminazione della traduzione, il disassemblaggio del ribosoma e il rilascio della catena nascente con una puromicina al 3' (in basso) [184].

L'esperimento è stato eseguito nella linea di osteosarcoma 143B^{NDUFS3^{-/-}} e nella rispettiva controparte singenica con il CI funzionale (143B^{NDUFS3^{+/+}}) sia in condizione di coltura standard (25mM) che in basso glucosio (5mM). Come è possibile osservare in **Fig.32**, solo la copresenza del danno funzionale sul CI e del basso glucosio agiscono

sinergicamente inducendo un blocco traduzionale totale, al contrario della controparte con un CI funzionale che non risente di alcun effetto sulla sintesi proteica.

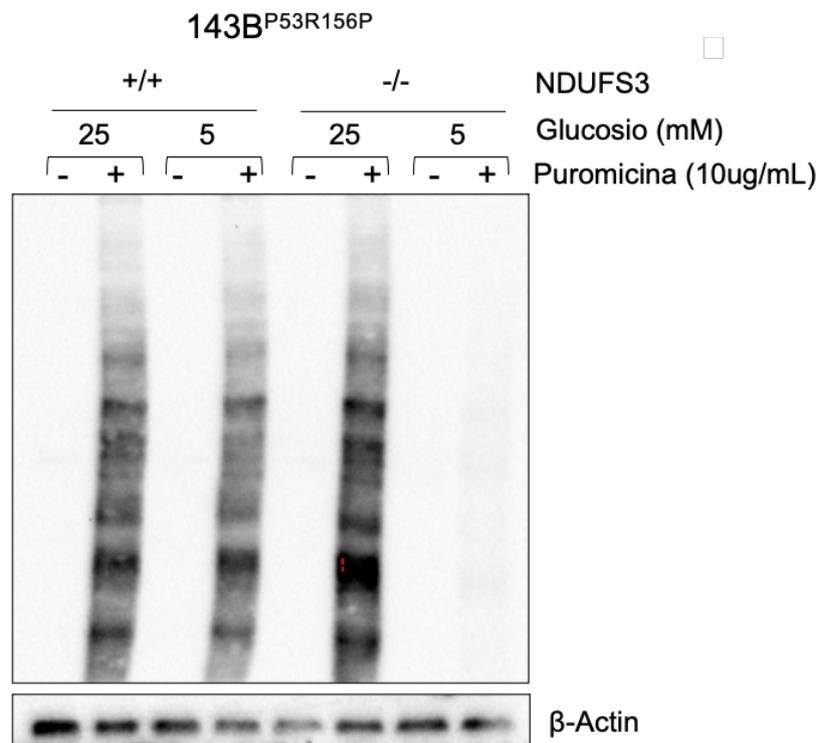


Figura 32 Saggio di sintesi proteica de novo valutato mediante Western Blotting in linee cellulari 143B (NDUFS3^{+/+} e NDUFS3^{-/-}), cresciute in 25mM e 5mM di glucosio. La β-actina è stata utilizzata come controllo di caricamento delle proteine.

Questo risultato, in linea con l'arresto della proliferazione ed il fenotipo di stress osservato, suggerisce come il fenomeno di scomparsa della proteina p53 mutata sia parte di un processo generale e non proteina specifico, sebbene non si osservi alcuna variazione nei livelli di espressione dell'actina. Quest'ultima, essendo una proteina strutturale è caratterizzata da un'emivita più lunga e da un turnover più lento. L'emivita specifica di ciascuna proteina è esattamente correlata al suo ruolo fisiologico. Ad esempio, la maggior parte delle proteine *housekeeping* (come l'actina) hanno un'emivita piuttosto lunga. Al contrario, le proteine che sono richieste solo per un periodo di tempo limitato nella cellula, ad esempio in una certa fase del ciclo cellulare, durante lo sviluppo, la crescita o la differenziazione o in risposta a stimoli esterni, hanno spesso emivita breve [185].

Inoltre, in condizioni fisiologiche le cellule sono in uno stato di equilibrio dinamico, in cui la sintesi proteica e i meccanismi di degradazione sono perfettamente bilanciati; in condizioni di stress, invece, si assiste ad uno sbilanciamento del turnover proteico, a favore della sintesi o della degradazione, dipendentemente dall'integrazione di (i) parametri intrinseci, (ii) parametri funzionali, e (iii) determinanti contestuali specifici per ogni singola proteina.

Le caratteristiche intrinseche includono l'emivita dell'mRNA, la composizione aminoacidica, le dimensioni e la struttura secondaria assunta (e.g. struttura a foglietto beta/alfa elica). I parametri funzionali includono l'abbondanza della proteina a livello intracellulare, l'appartenenza ad un complesso proteico ed il coinvolgimento in specifiche cascate di segnalazioni molecolari. Infine, i determinanti contestuali includono la localizzazione subcellulare, il tipo cellulare in cui la proteina viene espressa, il tessuto ed il microambiente [186]. 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 termodinamicamente favorevole, è spesso instabile in condizioni fisiologiche [187]. 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 in condizioni di basso glucosio si esauriscano i nutrienti nel terreno di coltura. L'associazione dello stress calorico ad uno stress ossidativo, causato da un danno funzionale sul CI, potrebbe commissionare le cellule tumorali ad un collasso metabolico.

Dunque, la carenza di glucosio nella linea cellulare 143B^{NDUFS3^{-/-}} associata ad un danno funzionale del CI, indotto geneticamente, causa un blocco della sintesi proteica. Successivamente, è stato investigato se l'abbattimento della sintesi proteica si ricapitolasse farmacologicamente utilizzando un inibitore specifico del CI. Pertanto, la controparte singenica della linea cellulare 143B con il CI funzionale, è stata trattata con l'inibitore EVP4593. Come atteso, si osserva un blocco della sintesi proteica, esclusivamente in condizioni di stress energetico, indotto dal trattamento con EVP4593, e nutrizionale, causato dalla restrizione di glucosio (**Fig.33**).

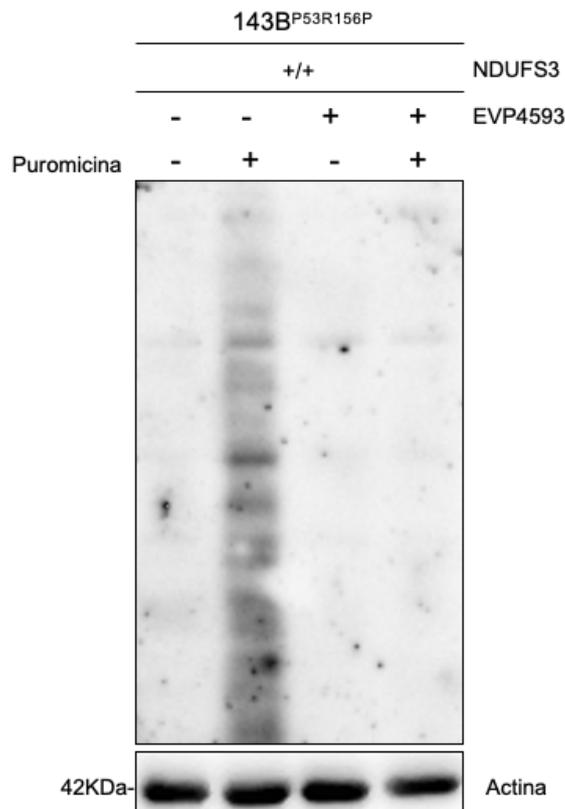


Figura 33 Saggio di sintesi proteica *de novo* valutato mediante Western Blotting in linee cellulari 143B NDUFS3+/+, cresciute in 5mM di glucosio con e senza EVP 4593, per 24 ore. La β -actina è stata utilizzata come controllo di caricamento delle proteine.

I dati preliminari ottenuti dalle curve di proliferazione della linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} hanno permesso di avanzare l'ipotesi riguardo al ruolo citoprotettivo da parte della proteina p53 wild-type nel rallentare il collasso metabolico. Per verificare questa ipotesi, il saggio di sintesi proteica è stato eseguito anche nelle linee HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53-/-} e nelle rispettive controparti singeniche con un CI funzionale. Come si può osservare in **Fig.34**, la combinazione sinergica del danno funzionale al CI e della condizione in basso glucosio induce un abbattimento della sintesi proteica nella linea HCT116^{p53-/-}, ma solo un parziale decremento nella linea HCT116^{p53+/+}. Questo risultato rafforza l'ipotesi riguardo il ruolo citoprotettivo di p53. Inoltre, l'assemblaggio e quindi la funzionalità del CI è determinante affinché la sintesi proteica avvenga. Infatti, non si osservano alterazioni dei livelli proteici globali nelle linee HCT116^{NDUFS3+/+}, indipendentemente dallo stato genetico della proteina p53.

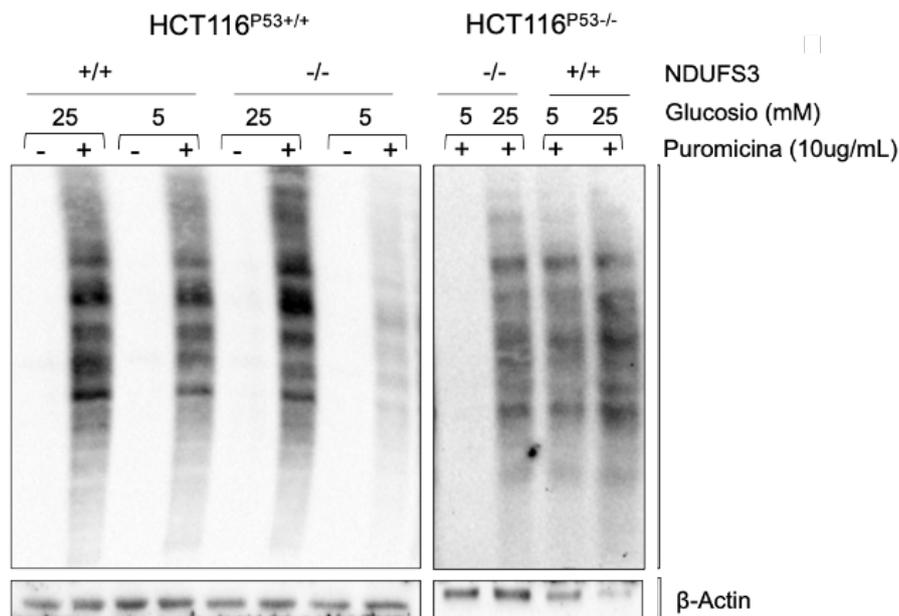


Figura 34 Saggio di sintesi proteica de novo valutato mediante Western Blotting in linee cellulari HCT116 P53+/+ e P53-/- (NDUFS3+/+ e NDUFS3-/-), cresciute in 25mM e 5mM di glucosio. La β -actina è stata utilizzata come controllo di caricamento delle proteine.

In accordo con i dati finora ottenuti è possibile assumere che le cellule nulle o mutate per la proteina p53 mostrino una maggiore sensibilità al danno indotto sul CI associato alla carenza di glucosio, contrariamente alla linea p53 wild-type, la quale è in grado di resistere e rallentare il collasso metabolico. Questo risultato è in linea con lo studio condotto da Buzzai et al. [118] in cui si valuta l'effetto del farmaco metformina sulla crescita tumorale di linee cellulari isogeniche di cancro del colon, HCT116^{p53+/+} e HCT116^{p53-/-}. In presenza di condizioni fisiologiche di glucosio (5mM), il trattamento con metformina inibisce selettivamente la crescita tumorale degli xenograft di HCT116^{p53-/-} suggerendo una diversa capacità di adattamento al danno della catena respiratoria mitocondriale in base allo stato genetico dell'oncosoppressore *TP53*.

Complessivamente, è ragionevole ipotizzare che l'auxotrofia da aspartato, un hallmark metabolico delle cellule tumorali con un danno al CI, possa causare un blocco della sintesi proteica inducendo un collasso metabolico nelle linee cellulari con una p53 mutata o nulla. Viceversa, le linee cellulari caratterizzate dalla presenza di una p53 wild-type potrebbero aggirare l'auxotrofia da aspartato attraverso vie alternative resistendo al collasso metabolico.

5.7 Modelli singenici ricapitolano una diversa sensibilità all'inibizione del CI dipendentemente dallo stato genetico di *TP53*

L'ipotesi avanzata sul ruolo della proteina p53 wild-type, nel sostenere la crescita tumorale, nasce dal confronto di dati di linee di origine diversa, mesenchimale (143B) ed epiteliale (HCT e OV90). Per verificare se sia esclusivamente lo stato di p53 a differenziare la capacità di adattamento, in seguito al danno del CI associato alla condizione di basso glucosio, sono state create linee isogeniche, dove lo stato genetico (e proteico) di *TP53* è diverso nello stesso background nucleare.

La creazione di modelli stabili con un diverso stato di *TP53* è stata realizzata a partire dalla linea cellulare HCT116^{NDUFS3^{-/-}}, KO per il gene *TP53*, utilizzando il vettore retrovirale pMSCVpuro in modo da favorire l'integrazione dell'inserito di interesse nel genoma cellulare.

Specificatamente, sono state generate le tre linee isogeniche, HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{-/-}}, HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{+/+}}, ed HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53R156P}, attraverso tre infezioni, utilizzando separatamente i seguenti tre costrutti: pMSCV_vuoto; pMSCV_*TP53* wild-type; pMSCV_*TP53*c.467G>C (p53R156P).

Al termine della selezione clonale, i pool cellulari sono stati impiegati in esperimenti di valutazione della vitalità cellulare nell'arco delle 72h seguendo lo stesso approccio sperimentale precedentemente descritto ed in condizioni in basso glucosio. Come atteso, le linee HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53R156P} ed HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{-/-}} mostrano una maggiore sensibilità alla crisi energetica indotta dal danno funzionale al CI associata alla condizione di basso glucosio, con una riduzione, significativa già a partire dalle 18 ore, rispetto alla controparte HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{+/+}} (**Fig. 35A**).

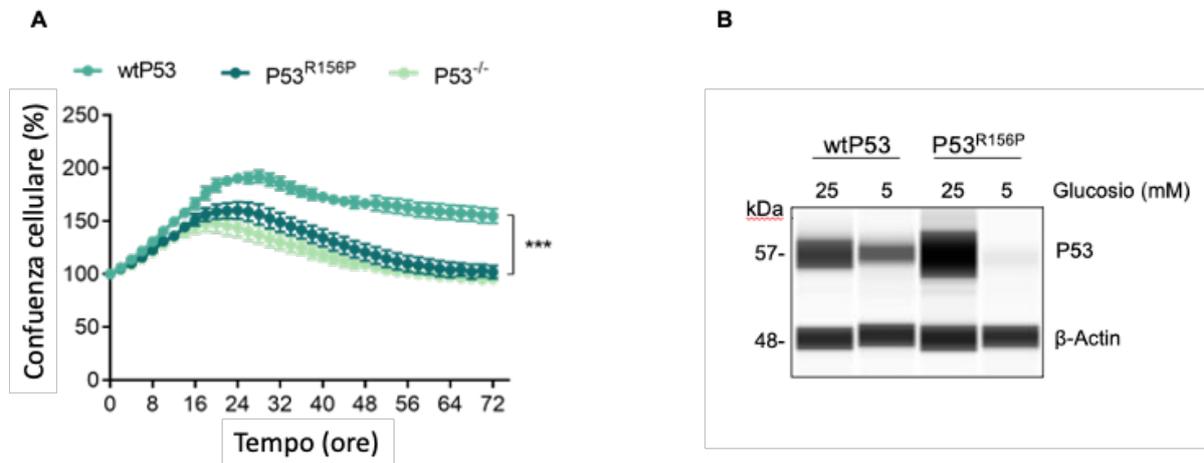


Figura 35 (A) Saggio di proliferazione IncuCyte nei tre modelli isogenici HCT116NDUFS3^{-/-} coltivati in un terreno DMEM alla concentrazione di 5mM di glucosio per 72h. La normalizzazione è stata eseguita sul T0 (indicato come 100%). I dati sono rappresentati come media \pm SD, (n=3). Per l'analisi statistica è stato applicato un T-test multiplo (***) $p < 0,001$. **(B)** Analisi dell'espressione di p53 nelle due linee isogeniche HCT116NDUFS3^{-/-}; p53^{R156P} e HCT116NDUFS3^{-/-}; p53^{+/+} coltivate in un terreno di coltura standard ed in basso glucosio per 24h utilizzando un sistema di elettroforesi capillare (WES).

Successivamente, è stata valutata l'espressione di p53 sia in condizioni di coltura standard (25mM) che in basso glucosio (5mM) nelle due linee isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{+/+}} e HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{R156P}}. L'ablazione del CI associata alla carenza di glucosio ricapitola il fenomeno di scomparsa della proteina esclusivamente in presenza di p53 mutata, non della proteina wild-type, i cui livelli non risentono di alcuna alterazione di espressione (**Fig.35B**).

Complessivamente, questi risultati supportano le osservazioni fatte precedentemente corroborando l'idea del ruolo di p53 wild-type nel sostenere la proliferazione cellulare in condizioni di danno funzionale al CI e carenza di glucosio. Inoltre, le linee cellulari isogeniche possono essere sfruttate come modello di validazione, utile nell'investigare eventuali differenze di comportamento cellulare che siano funzione dello stato di p53.

Uno degli obiettivi del seguente studio è l'identificazione dei meccanismi adattativi che si innescano in seguito all'inibizione del CI e carenza di glucosio in base allo stato genetico del più noto driver della tumorigenesi *TP53*. Le successive analisi sono state condotte utilizzando esclusivamente le linee cellulari isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{+/+}}, HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{R156P}} e HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{-/-}}.

5.8 Il ruolo di mTORC1 nella sintesi proteica

Durante la progressione tumorale, una grave disfunzione del CI determina inizialmente uno svantaggio per le cellule tumorali mantenendole in uno stato di bassa proliferazione simile a quello degli oncocitomi benigni [121]. Gli oncocitomi rappresentano un eccellente caso di studio in oncologia, in quanto sono tumori di fatto in cortocircuito caratterizzati da un fenotipo benigno a causa di vincoli metabolici, probabilmente derivanti dalla presenza di mutazioni patogene del mtDNA che codificano per subunità del CI [23,188]. Tuttavia, anche se ci si aspetta che il grave danno al CI causi una catastrofe metabolica e impedisca la progressione maligna, i tumori oncocitici persistono nel loro stato indolente e a crescita lenta, mostrando caratteristiche di quiescenza ma potenzialmente pericolose di chemioresistenza [189,190]. Infatti, le cellule tumorali con un danno funzionale al CI sono capaci di recuperare il loro stato proliferativo innescando meccanismi molecolari adattativi autonomi e non autonomi, come ad esempio l'attivazione del microambiente tumorale per sostenere la loro sopravvivenza [119,121]. Questo giustifica l'esistenza e la persistenza degli oncocitomi umani. Quindi, se da un lato è promettente identificare il CI come potenziale bersaglio farmacologico per nuove strategie terapeutiche antitumorali, dall'altro è importante approfondire quali possono essere i meccanismi adattativi che si innescano per compensare il danno bioenergetico.

In questo contesto, la cascata PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) /AKT (Protein kinase B) / mTOR (mechanistic target of rapamycin) rappresenta un meccanismo adattativo per promuovere la sopravvivenza cellulare e la proliferazione. L'alterazione di questa cascata è stata descritta in diversi tumori umani, ma anche in diversi processi fisiologici, come il metabolismo cellulare, la trascrizione, la traduzione, il ciclo cellulare, l'apoptosi, l'autofagia e il differenziamento cellulare [191]. In particolare, la serina/treonina protein chinasi mTOR agisce come principale sensore di nutrienti e ha un ruolo chiave nel metabolismo cellulare. mTOR forma due complessi strutturalmente e funzionalmente distinti, chiamati mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), che svolge la funzione di sensore di nutrienti ed energia e controlla il

processo di sintesi proteica, e mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2), coinvolto principalmente in proliferazione, sopravvivenza e migrazione cellulare [192]. Quando i nutrienti sono presenti e abbondanti la cascata di segnalazione di mTORC1 è attiva, e promuove processi anabolici come la biosintesi di proteine, nucleotidi e lipidi. Al contrario mTORC1 risulta inattivo quando la cellula si trova in condizione di scarsità di nutrienti o in risposta a una moltitudine di stress che causano il blocco della crescita. Pertanto, alterazioni che influenzano questa via di segnalazione possono essere correlate con diversi disordini patologici quali diabete, neurodegenerazione, invecchiamento, e cancro.

I dati finora ottenuti hanno evidenziato come le cellule nulle o mutate per la proteina p53 mostrino una maggiore sensibilità al danno funzionale del CI associato alla carenza di glucosio, contrariamente alla linea p53 wild-type che si mostra in grado di resistere e rallentare il collasso metabolico. È ragionevole ipotizzare che l'auxotrofia da aspartato, hallmark metabolico delle cellule tumorali con un danno al CI, possa causare un collasso metabolico associato all'abbattimento della sintesi proteica nelle linee cellulari con una p53 mutata o nulla. Allo stesso tempo, è noto che l'attività chinasi di mTORC1 regola la sintesi proteica e di conseguenza la proliferazione cellulare, ed essendo un sensore di nutrienti gioca un ruolo chiave nel metabolismo cellulare. Allo scopo di investigare un possibile coinvolgimento di questa cascata nel blocco della sintesi proteica, nelle linee cellulari isogeniche HCT116^{NDUFS3^{-/-}} sono stati valutati i livelli di espressione della fosforilazione di S6K1 (ribosomal protein S6 kinase beta-1) e 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1), i due principali substrati di mTORC1 coinvolti direttamente nell'attivazione del processo di sintesi proteica. S6K1 è una serina/treonina chinasi che fosforilando S6RP (S6 ribosomal protein), componente della subunità ribosomiale 40S, promuove la sintesi proteica; 4E-BP1, invece, è un repressore traduzionale che regola negativamente il complesso eIF-4E/G (eukaryotic initiation factor 4E/4G). Pertanto, quando 4E-BP1 è fosforilato, la sua attività risulta inibita, favorendo la formazione del complesso di inizio della traduzione e quindi la sintesi proteica (**Fig.36**).

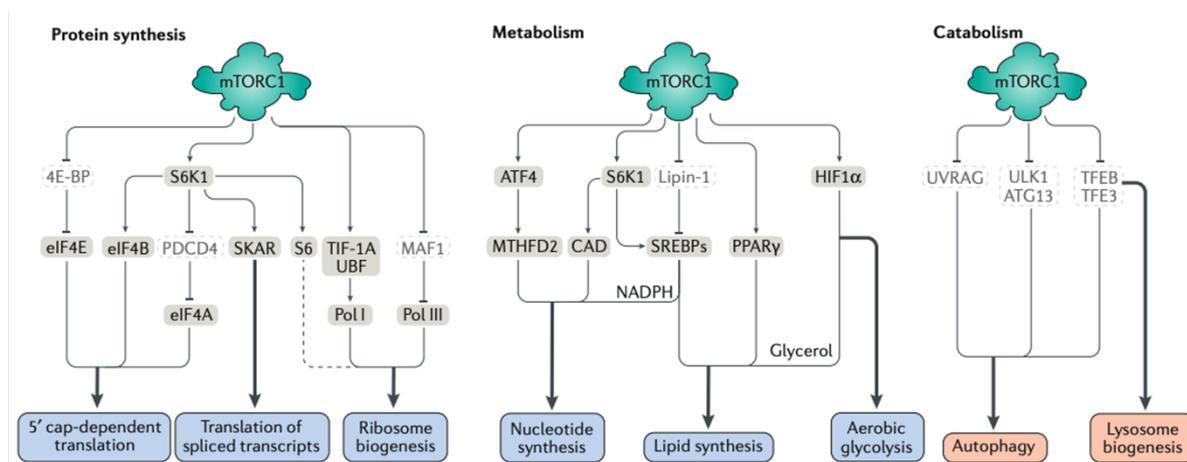


Figura 36 L'attivazione di mTORC1 promuove i processi anabolici che permettono la sintesi di proteine, lipidi, nucleotidi, nucleotidi e altre macromolecole mentre inibisce i processi catabolici, come l'autofagia e la biogenesi lisosomiale [191].

Il possibile coinvolgimento di mTORC1 è stato investigato in condizioni di coltura standard (25mM) e di basso glucosio (5mM). Nelle tre linee cellulari isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-} è possibile osservare diversi gradi di espressione delle fosforilazioni delle proteine S6K1 e 4E-BP1, dipendentemente dallo stato genetico di *TP53* (**Fig.37**). In condizioni basali, come anche dopo 6 ore di trattamento con basso glucosio, mTORC1 sembra essere attivo in tutte e tre le linee cellulari. Infatti, è possibile osservare la fosforilazione sia di S6RP sia di 4EBP. Dopo 6 ore di trattamento con basso glucosio, ma soprattutto dopo 17 ore, e quindi a tempi prolungati di stress metabolico, si osserva una marcata diminuzione dei livelli di fosforilazione di S6RP e di 4E-BP1, sia nella linea p53 mutata che nulla. Esclusivamente nella linea p53 wild-type, si osserva una continua attività del complesso di mTORC1, indice del fatto che i processi cellulari di sintesi proteica e proliferazione sono ancora attivi. Dunque, in accordo con i dati ottenuti, è possibile rafforzare l'ipotesi sul ruolo della proteina p53 wild type nel mostrare una minore sensibilità al danno indotto da difetti del CI associato alla carenza di glucosio.

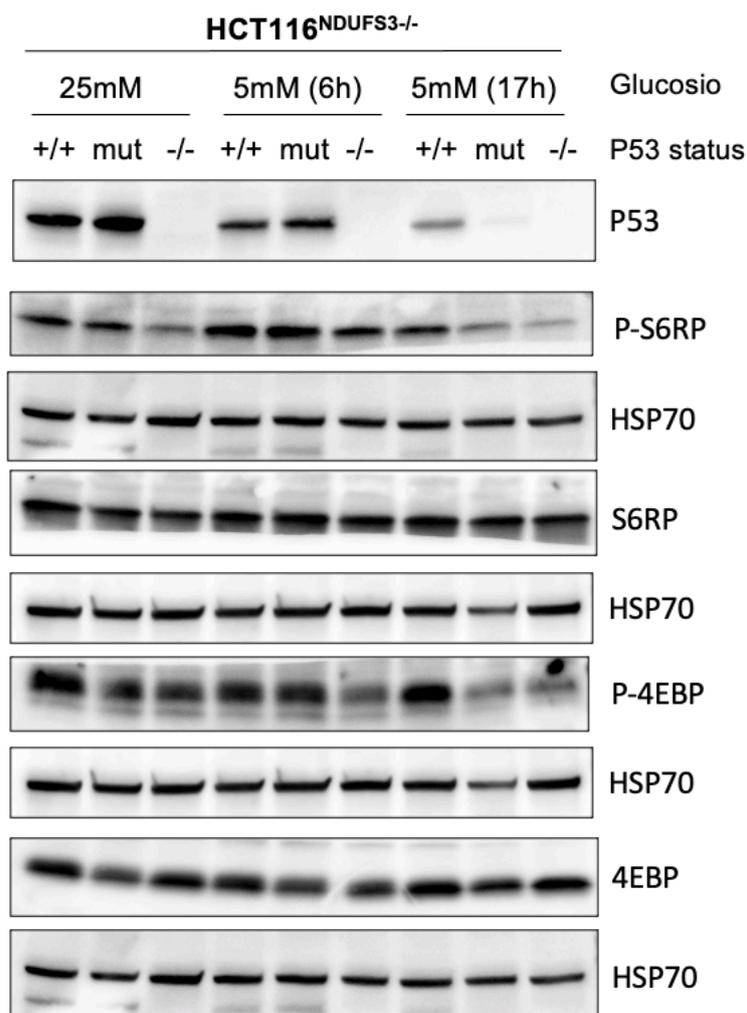


Figura 37 Valutazione dell'espressione proteica di P53, P-S6RP, S6RP, P-4EBP, 4EBP mediante western blot in linee cellulari HCT116 NDUFS3^{-/-} (n=1) per 6h e 17h in glucosio 25mM e 5mM. HSP70 è stata usata come controllo del caricamento delle proteine.

P53 è un fattore di trascrizione regolato in modo opposto da AMPK e mTORC1. Sebbene AMPK fosforili p53 sulla Ser15 per renderla attiva e quindi stabilizzarla [102], mTORC1 inibisce per vie indirette questa fosforilazione (**Fig. 38**). Infatti, mTORC1 fosforila la subunità $\alpha 4$ della fosfatasi PP2A (proteina fosfatasi 2A), attivandola per de-fosforilare la fosfo-Ser15 e destabilizzare p53 [193,194]. Inoltre, AMPK fosforila direttamente MDMX sulla Ser342, proteggendo così p53 dall'ubiquitinazione [195]. Quindi, due proteine diverse, nelle stesse condizioni di stress metabolico, causato dal danno funzionale del CI associato alla carenza di glucosio, potrebbero agire negativamente e/o positivamente sul grado di fosforilazione della proteina p53 wild-type. Ciò dimostra che esiste una

comunicazione reciproca tra i pathway di segnalazione, influenzando le risposte adattative innescate.

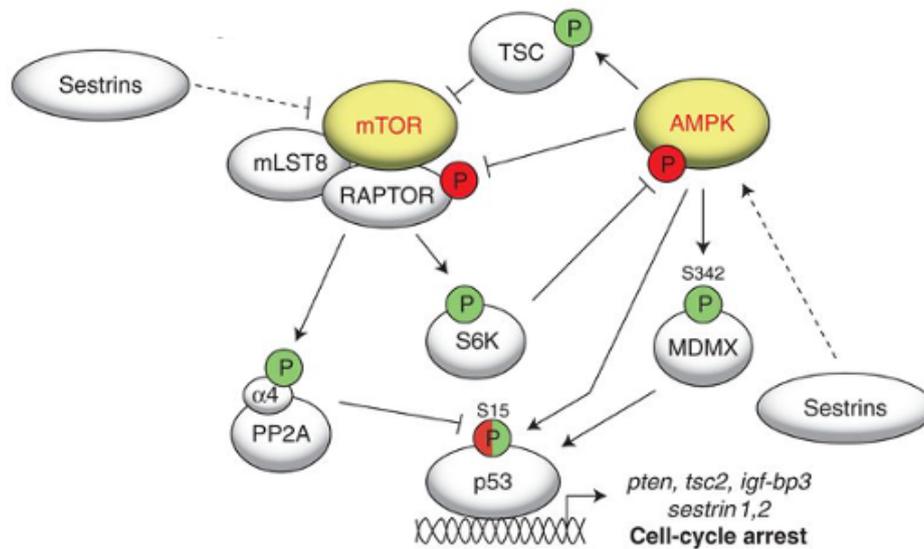


Figura 38 Rappresentazione schematica dell'interazione tra mTORC1, AMPK e p53 [196].

5.9 P53 wild-type supera l'auxotrofia da aspartato indotta dal danno funzionale del CI

I dati finora descritti hanno evidenziato quanto le cellule nulle o mutate per la proteina p53 mostrino una maggiore sensibilità al danno funzionale del CI associato alla carenza di glucosio. Contrariamente, la linea p53 wild-type è in grado di resistere e rallentare il collasso metabolico. È stato ipotizzato che l'auxotrofia da aspartato possa causare un blocco della sintesi proteica indirizzando le linee cellulari con una p53 mutata o nulla verso un collasso metabolico. A supporto di questa ipotesi, l'inibizione dell'attività di mTORC1 potrebbe mediare il blocco della sintesi proteica nelle cellule HCT116^{NDUFS3^{-/-}}; p53^{-/-} e HCT116^{NDUFS3^{-/-}; p53^{R156P}}. Anche se un danno funzionale del CI rende le cellule auxotrofe da aspartato (vedi sezione 5.4), quelle caratterizzate da una p53 wild-type potrebbero aggirare l'auxotrofia a questo amminoacido attraverso vie alternative resistendo al collasso metabolico.

Come mostrato precedentemente, la misurazione in spettrometria di massa dei livelli intracellulari di aspartato nei modelli privi del CI (HCT116^{NDUFS3-/-}) conferma una riduzione significativa rispetto alla controparte singenica con un CI funzionale (HCT116^{NDUFS3+/+}) (vedi sezione 5.4). Anche se l'analisi conferma che un danno al CI rende le cellule auxotrofe per l'aspartato, non permette di apprezzare eventuali differenze dei livelli dell'aminoacido confrontando linee prive del CI ma con un diverso stato di *TP53*. Infatti, la misurazione dei livelli intracellulari dell'aminoacido è stata effettuata nelle 143B e nelle HCT parentali, rispettivamente caratterizzate da una p53 mutata e una p53-null. Quindi, allo scopo di verificare se i livelli di aspartato, tra linee prive del CI, possano variare in base allo stato genetico di *TP53*, la misurazione intracellulare di aspartato è stata ripetuta nelle linee singeniche HCT116^{NDUFS3-/-} (p53+/+; p53R156P). Siccome, contestualmente alle curve di crescita in basso glucosio e allo studio dell'attivazione dei substrati a valle di mTORC1, non si sono osservate differenze tra le HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} e le HCT116^{NDUFS3-/-p53-/-}, la linea p53 nulla è stata esclusa dalla misurazione dei livelli di aspartato intracellulari.

Inizialmente, la misurazione intracellulare di aspartato in spettrometria di massa, nelle linee cellulari singeniche, è stata eseguita in condizioni basali di glucosio. Il confronto tra le diverse linee ha mostrato una quantità statisticamente superiore dei livelli di aspartato nella linea p53 wild-type (**Fig.39**), suggerendo un ruolo della proteina nel sostenere la sintesi endogena di aspartato in presenza di un grave danno al CI. 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 dell'auxotrofia.

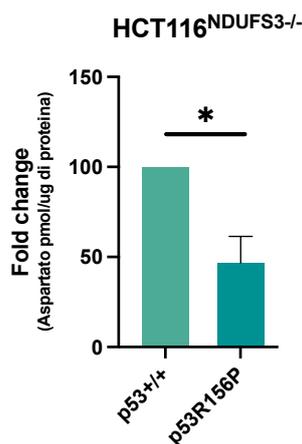


Figura 39 Misurazione dei livelli di aspartato intracellulare in spettrometria di massa (HPLC) nelle linee isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-; p53R156P} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 30 min. I dati sono rappresentati come media \pm SD [NDUFS3^{-/-}; p53R156P (n=4) e NDUFS3^{-/-}; p53^{+/+} (n=4)]. 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).

L'aspartato può essere prodotto a partire dall' α -KG tramite due diverse vie biosintetiche: una ossidativa e una riduttiva [44]. In assenza del CI, il ciclo di Krebs si arresta o è fortemente rallentato e le cellule innescano un ciclo parziale e invertito per promuovere la carbossilazione riduttiva e generare ossalacetato (OAA) [32]. In questi casi è probabile che la sintesi di aspartato avvenga a livelli minimi poiché, in seguito ad un difetto del CI, l'OAA è limitato, come anche la disponibilità del pool di NAD⁺.

Infatti, sebbene sia stato dimostrato che le cellule tumorali con severe disfunzioni sul CI siano dipendenti dalla glicolisi aerobia per sostenere la proliferazione [30], è stato osservato che cellule tumorali con difetti nella catena di trasporto degli elettroni possono indurre una riprogrammazione metabolica verso la carbossilazione riduttiva dipendente da glutammina come meccanismo di adattamento alternativo per sostenere i processi anaplerotici [175]. La GLS idrolizza la glutammina in glutammato, favorendo le reazioni anaplerotiche e la produzione del potenziale riducente NADPH. In particolare, è stato dimostrato che la GLS2, localizzata nella membrana mitocondriale interna, è un target della proteina p53 [170]. In questo scenario, le cellule HCT116 p53^{+/+} potrebbero utilizzare maggiormente la glutammina, promuovere la via della carbossilazione riduttiva per compensare il blocco della via ossidativa e rallentare così il collasso metabolico indotto dal danno funzionale del CI e dalla carenza di glucosio. Secondo

questa ipotesi una maggiore quantità di glutamina potrebbe riflettersi con una maggiore quantità di glutammato e verosimilmente di aspartato (**Fig.40**). Infatti, siccome la glutammato-ossalacetato transaminasi (GOT1) usa glutammato per sintetizzare aspartato e α -KG, la sintesi di aspartato potrebbe essere favorita contestualmente alla presenza di una proteina p53 wild-type.

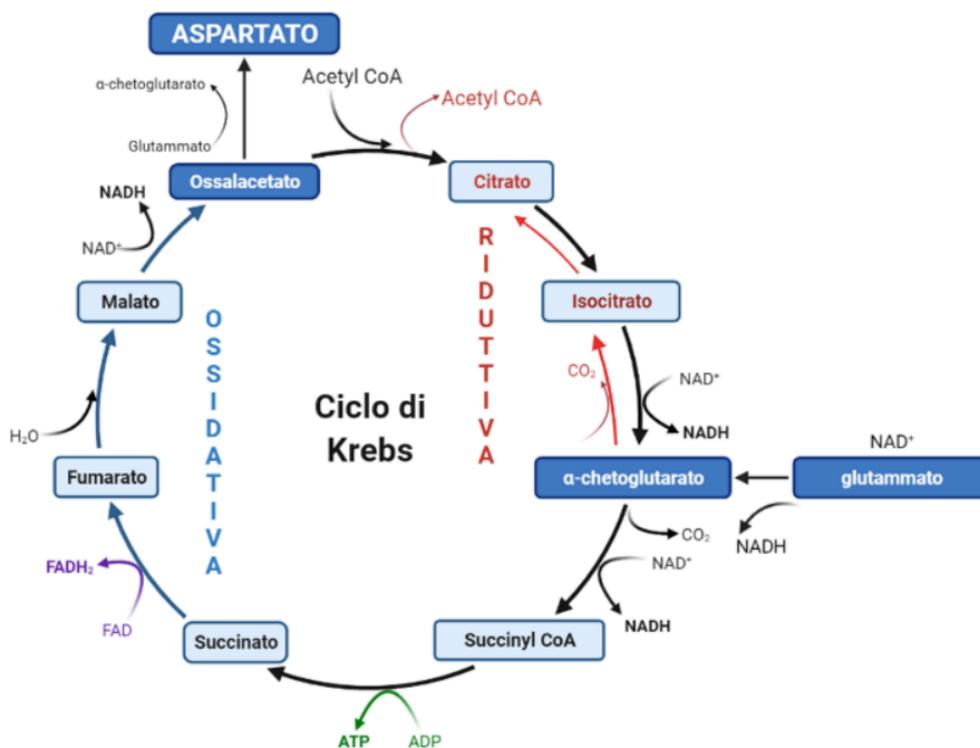


Figura 40 Rappresentazione schematica delle vie cruciali del ciclo di Krebs per la biosintesi di aspartato da glutamina.

Nella panoramica di un contesto metabolico così dinamico è ragionevole pensare che il pool di aspartato, seppur ridotto, sia continuamente utilizzato per supportare la sintesi proteica cellulare in presenza di una proteina p53 wild-type.

Allo scopo di apprezzare una differenza, in collasso metabolico, nella quantità di aspartato tra le linee con p53 wild type e p53 mutata, la misurazione dei livelli di aspartato nelle linee HCT116 è stata effettuata anche a tempi prolungati in basso glucosio. Inoltre, i livelli intracellulari di aspartato, tramite spettrometria di massa, sono stati misurati nello stesso intervallo di tempo in cui si era precedentemente osservato un

diverso stato di attivazione del complesso di mTORC1 tra le due linee cellulari. Contrariamente a quanto atteso, a tempi prolungati di basso glucosio, la quota intracellulare di aspartato nelle HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} risulta significativamente maggiore rispetto alle HCT116^{NDUFS3-/-p53+/+}, (**Fig.41**).

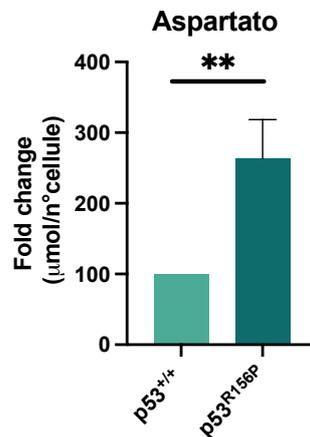


Figura 41 Misurazione dei livelli di aspartato intracellulare in spettrometria di massa (HPLC) nelle linee isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-; p53^{R156P}} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53^{+/+}} coltivate in terreno 5mM di glucosio per 21 ore. I dati sono rappresentati come media \pm SD [NDUFS3-/-; p53R156P (n=4) e NDUFS3-/-; p53+/+ (n=4) e normalizzati su numero di cellule ($\mu\text{mol}/\text{cell}$). L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (* $p < 0,05$).

Dunque, nelle linee con una p53 mutata, l'aspartato è stranamente maggiore. In carenza di glucosio e in una fase di un blocco della sintesi proteica mTORC1-dipendente, lo sono anche gli altri aminoacidi (**Fig.42**).

L'aumento dei livelli intracellulari di aspartato, come anche quelli di altri aminoacidi, nella linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53R156P} in condizioni di carenza di glucosio supporta i dati relativi al blocco della sintesi proteica in questa linea. Infatti, in un contesto in cui il complesso di mTORC1 non è attivo e di conseguenza la sintesi proteica è bloccata, si assiste ad un accumulo intracellulare di aminoacidi. Inoltre, la misurazione della quota intracellulare di aspartato nelle linee HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} e HCT116^{NDUFS3-/-p53+/+} supporta l'ipotesi di una p53 wild-type in grado di compensare il danno energetico associato alla restrizione di glucosio sfruttando l'aspartato disponibile, garantendo la traduzione delle proteine e rallentando il collasso metabolico.

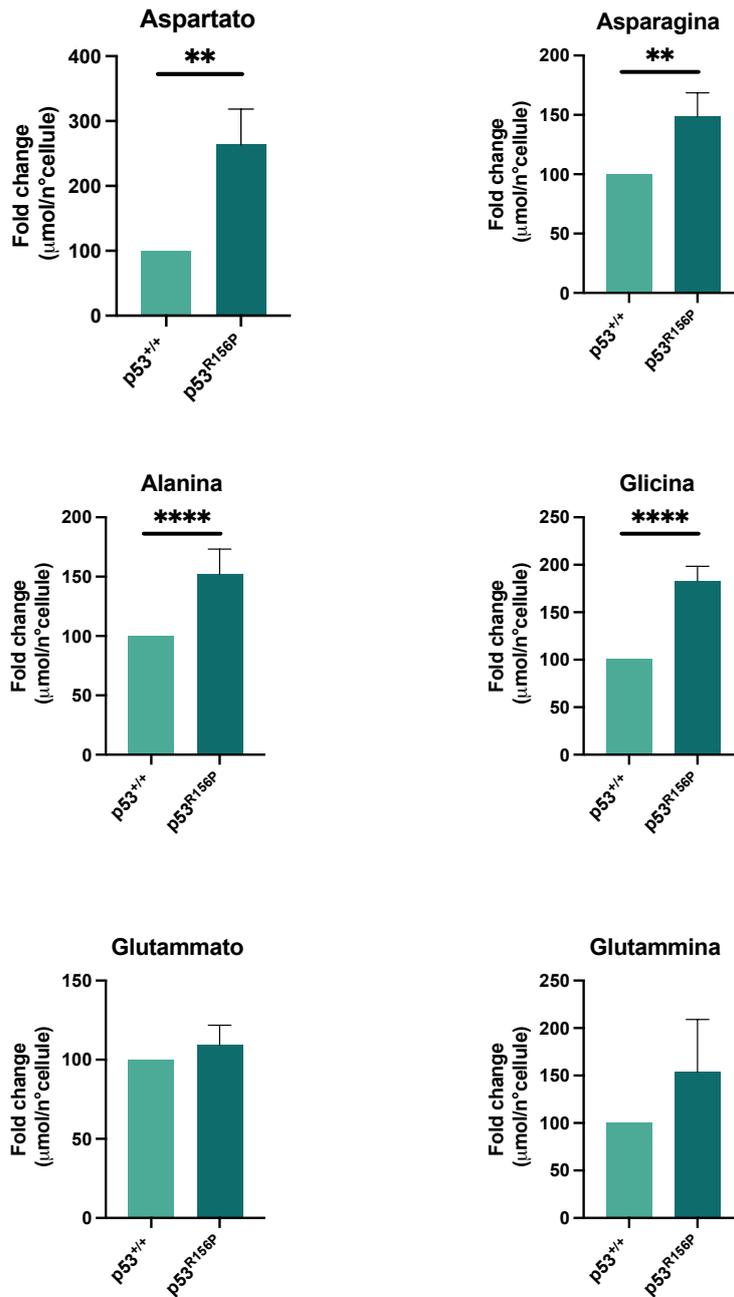


Figura 42 Misurazione dei livelli degli aminoacidi intracellulari in spettrometria di massa (HPLC) nelle linee isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-; p53R156P} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} coltivate in terreno 5mM di glucosio per 21 ore. I dati sono rappresentati come media \pm SD [NDUFS3-/-; p53R156P (n=4) e NDUFS3-/-; p53+/+ (n=4)] e normalizzati numero di cellule ($\mu\text{mol}/\text{cellule}$). L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (* $p < 0,05$).

Per escludere che una maggiore quantità di aspartato nelle cellule HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} sia un accumulo dovuto al blocco della sintesi proteica ma associato ad una minore capacità di sintesi, sono stati analizzati i rapporti tra la quantità di altri metaboliti, α -KG, citrato e glutammato, coinvolti nella biosintesi dell'aspartato.

Il rapporto tra α -KG e citrato risulta essere significativamente più basso (**Fig.43 A**), suggerendo una carbossilazione riduttiva della glutammina più lenta nelle linee mutate, essendo molto dispendiosa dal punto di vista energetico.

Inoltre, anche il rapporto tra α -KG e glutammato risulta essere significativamente più basso nelle HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} rispetto alla controparte p53 wild-type (**Fig.43 B**). Poichè la GOT1 usa glutammato per sintetizzare aspartato e α -KG, il calo del rapporto tra α -KG e glutammato evidenzia un blocco della sintesi di aspartato nelle linee HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P}.

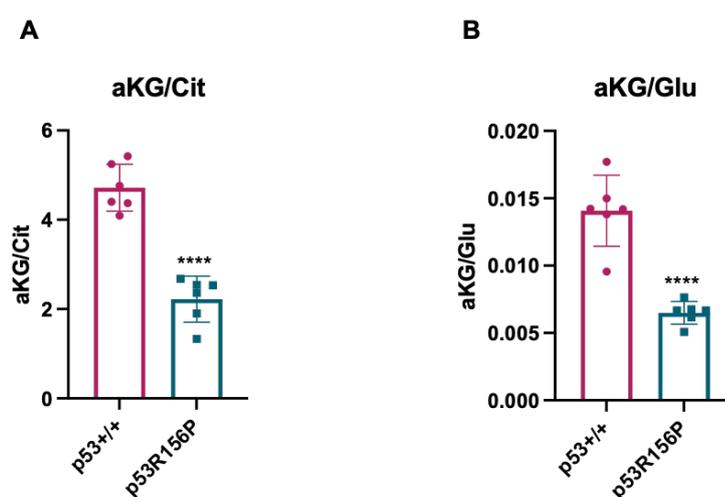


Figura 43 A) Rapporti di α -KG/Citrato e **B)** α -KG/Glutammato nelle linee isogeniche HCT116^{NDUFS3-/-; p53R156P} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} coltivate in un terreno alla concentrazione di 5mM di glucosio per 21 ore. I dati sono rappresentati come media \pm SD [NDUFS3^{-/-}; p53R156P (n=6) e NDUFS3^{-/-}; p53+/+ (n=6)]. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (*p<0,05).

I rapporti dei livelli dei metaboliti rivelano che la sintesi dell'aspartato, in condizioni di danno funzionale al CI e di carenza di glucosio, è bloccata nelle HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} in misura maggiore alla controparte con una p53 wild-type. Nelle cellule normali GOT1 utilizza aspartato e α -KG per produrre ossalacetato e glutammato. Poiché la reazione catalizzata da GOT1 è bidirezionale, il calo dei livelli di aspartato potrebbe consentire all'enzima GOT1 di invertire il flusso, in modo da generare aspartato anziché consumarlo [197]. Potrebbe essere che la p53 wild-type promuova la sintesi di aspartato in via GOT1 dipendente, rallentando il collasso metabolico. Inoltre, nello scenario di un blocco della catena di trasporto degli elettroni, l'enzima GOT1 deve avere una fonte di

OAA per generare aspartato. Per compensare il blocco della via ossidativa, le cellule p53 wild-type potrebbero promuovere la carbossilazione riduttiva della glutammina, una delle principali fonti di citrato. Successivamente, il trasportatore mitocondriale del citrato (SLC25A1) potrebbe trasportare il citrato nel citosol, dove l'enzima ATP citrato liasi lo scinde in Acetil Co-A e OAA. Quest'ultimo, una volta rientrato nei mitocondri ritorna disponibile per la sintesi di aspartato.

La misurazione dei metaboliti α -KG, glutammato e citrato, e dei relativi rapporti, sarà ripetuta in condizioni basali per valutare se il blocco della sintesi di aspartato nella linea HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} è una conseguenza del blocco della sintesi proteica oppure è dipendente esclusivamente dallo stato di p53.

5.10 P53 wild type sostiene la fosforilazione ossidativa in presenza di disfunzioni del CI

Il ciclo di Krebs è la via metabolica in cui confluiscono le vie del catabolismo dei carboidrati, dei lipidi, e delle proteine. Specificatamente, il ciclo di Krebs si caratterizza come via anfibolica partecipando sia ai processi catabolici sopracitati che a processi anabolici quali la fornitura di precursori amminoacidici, fra cui l'ossalacetato (OAA), necessario per la sintesi dell'aspartato.

In assenza del CI, il ciclo di Krebs è arrestato o fortemente rallentato e le cellule si affidano ad un ciclo parziale e invertito per promuovere la carbossilazione riduttiva e generare OAA. In questi casi è probabile che la sintesi di aspartato avvenga a livelli minimi poiché, in seguito ad un difetto del CI, l'OAA è limitato, come anche la disponibilità del pool di NAD⁺.

I dati riportati finora, tuttavia, sembrano suggerire un ruolo della proteina p53 wild-type nel superare il deficit del CI sostenendo la sintesi di aspartato attraverso la carbossilazione riduttiva della glutammina oppure promuovendo la sintesi di OAA tramite il braccio ossidativo del ciclo di Krebs. Questo potrebbe spiegare la maggiore

capacità delle cellule tumorali nulle per il CI e con una proteina p53 wild-type di sopravvivere in condizioni stringenti di glucosio. Lo studio condotto da Matoba et al., [116] ha dimostrato che il consumo di ossigeno (una misura della respirazione aerobica) è inferiore in mitocondri epatici di topi p53-nulli rispetto ai topi p53 wild-type. Inoltre, una riduzione del consumo di ossigeno si osserva anche nelle cellule umane HCT116 p53^{-/-} rispetto alle cellule HCT116 p53^{+/+}, dove nelle cellule p53 nulle aumenta la produzione di lattato. Questi dati indicano che la perdita di p53 determina uno spostamento metabolico dalla respirazione aerobica alla produzione di ATP glicolitico. Inoltre, due studi precedenti avevano stabilito una relazione tra il metabolismo del glucosio e p53. È stato dimostrato che l'inibizione della glicolisi per mezzo di deprivazione del glucosio funge da segnale per la fosforilazione e l'attivazione della proteina [198].

L'anello mancante che collega p53 alla respirazione aerobica potrebbe essere *SCO2*, identificato inizialmente da un'analisi di trascrittomico come gene regolato da p53, che codifica per una subunità necessaria per l'assemblaggio del complesso IV (CIV) [116].

A valle di queste considerazioni è stato quindi valutato se *SCO2* potesse essere il bersaglio esclusivo della p53 wild-type promuovendo, almeno in parte, la fosforilazione ossidativa e la sintesi di aspartato, e favorendo la sopravvivenza cellulare in condizioni di stress energetico e nutritivo. Specificatamente, i livelli di espressione di *SCO2* sono stati valutati nei modelli singenici HCT116^{NDUFS3^{-/-}} (p53^{-/-}; p53^{+/+}; p53R156P). Ciò ha permesso di evidenziare un'espressione differenziale del trascritto di interesse in base allo stato genetico di *TP53* in condizioni di basso glucosio.

L'esperimento è stato condotto ponendo le HCT116^{NDUFS3^{-/-}} (p53^{-/-}; p53^{+/+}; p53R156P), sia in alto (25mM) che in basso glucosio (5mM) per 9 ore, in modo tale da poter apprezzare differenze di espressione di *SCO2* in presenza sia della p53 wild-type che mutata. Di nota, la valutazione del trascritto non è stata eseguita in condizioni di collasso metabolico, in quanto un tempo così prolungato in basso glucosio potrebbe non essere idoneo per apprezzare eventuali differenze tra la p53 wild-type e quella mutata nel transattivare *SCO2*.

Come si osserva in **Fig.44 A** esclusivamente nella linee cellulari HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+}, caratterizzate quindi da una proteina p53 wild type, dopo 9 ore in basso glucosio si osserva un aumento dell'espressione di *SCO2* rispetto alla condizione basale. Questo non si verifica per le linee HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} ed HCT116^{NDUFS3-/-p53-/-}. Inoltre, questo risultato non sembra essere associato ad un aumento oppure ad una diminuzione del consumo di glucosio, essendo quest'ultimo paragonabile tra le HCT116^{NDUFS3-/-p53+/+} ed HCT116^{NDUFS3-/-p53-/-}, e persino leggermente inferiore nelle HCT116^{NDUFS3-/-p53R156P} (**Fig.44 B-C**).

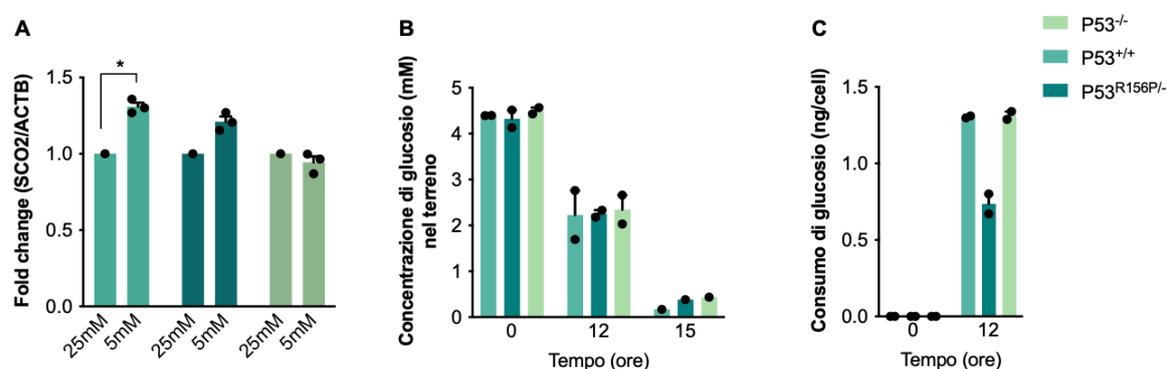


Figura 44 A) Valutazione dei livelli di espressione di *TP53* mediante qRT-PCR in linee cellulari singeniche HCT116^{NDUFS3-/-} (P53+/+, P53-/- e P53R156P) cresciute in glucosio 25mM e 5mM per 9h (n=3). I dati sono espressi come fold change e normalizzati sui livelli relativi di *TP53* in condizioni di 25mM di glucosio e rappresentati come media±SEM. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a variabili indipendenti (*p<0,05). **B)** Concentrazione di glucosio extracellulare misurata nel mezzo di coltura di cellule HCT116^{NDUFS3-/-} (P53+/+, P53-/- e P53R156P) cresciute in terreno con glucosio 5mM per 0, 12 e 15 ore. I dati (media±SEM; n=2) sono espressi in millimolare (mM). **C)** Consumo di glucosio misurato su terreno di coltura di cellule HCT116^{NDUFS3-/-} (P53+/+, P53-/- e P53R156P) cresciute in terreno con glucosio 5mM per 0 e 12 ore. I dati (media±SEM; n=2) sono espressi come ng di glucosio consumato per cellula.

Gli hotspot mutazionali più noti e caratterizzati di p53 (p.R175H, p.R181H, p.R249S, p.R273H) sembrano indurre il metabolismo glicolitico [111,174], ma alcune mutazioni identificate sono di significato biologico ancora ignoto, come ad esempio quella di nostro interesse (p.R156P). Molte mutazioni di p53 causano cambiamenti conformazionali del dominio di legame del DNA della proteina riducendo la sua capacità di legame ai promotori dei suoi geni bersaglio [199].

Verosimilmente, la mutazione p.R156P, che ricade nel dominio di legame al DNA della proteina, potrebbe compromettere la transattivazione del gene bersaglio *SCO2*.

Inoltre, studi recenti *in vivo* di mutanti di p53 con difetti di acetilazione hanno rivelato che quest'ultima regola in modo differenziato la funzione di p53 nell'arresto del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella senescenza. Ad esempio, la perdita dell'acetilazione sulla K117 nella p53 murina (corrispondente al sito K120 della p53 umana) sopprime specificamente la transattivazione dei bersagli genici pro-apoptotici di p53. La presenza di p53K117R non permette l'innescamento dell'apoptosi mediata da p53, ma mantiene le funzioni di arresto del ciclo cellulare e senescenza di p53. Inoltre, la perdita dell'acetilazione in tre siti (p53KR: K117, K161 e K162) nel dominio di legame al DNA di p53 sopprime l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi e la senescenza mediati da p53. Allo stesso tempo i modelli murini p53KR non sviluppano tumori ad insorgenza precoce, indicando che l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi e la senescenza dipendenti da p53 non sono assolutamente necessari per la soppressione tumorale mediata da p53. Tuttavia, i topi p53KR mantengono la capacità di modulare il metabolismo energetico e di ridurre le specie reattive dell'ossigeno (ROS) regolando i geni metabolici bersaglio di p53 *in vivo* [200]. Questi studi da un lato dimostrano che le funzioni canoniche di p53 nell'arresto del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella senescenza non sono essenziali per la soppressione del tumore, dall'altro mettono in discussione la visione prevalente di come le lesioni di p53 promuovano il cancro umano. 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.

Inoltre, è stato dimostrato che la p53 promuove l'autofagia in condizioni di stress nutrizionale [201], suggerendo che, oltre al suo ruolo pro-apoptotico, la p53 favorisce la sopravvivenza in alcune circostanze specifiche. Circa la metà dei tumori è caratterizzata dalla presenza di una p53 wild-type e se e come la p53 wild-type nelle cellule tumorali risponda ai microambienti tumorali per favorire la sopravvivenza non è ben compreso. Uno studio recente ha dimostrato un ruolo protettivo della p53 wild-type nelle cellule di melanoma attraverso la sovraregolazione del miR-149* [202].

Alla luce di quanto emerge dalla letteratura e dai dati mostrati finora nel seguente studio, è ragionevole ipotizzare che la presenza di p53 wild-type potrebbe favorire la sopravvivenza e la persistenza di cellule tumorali. Viceversa, la presenza di p53 mutata (p.R156P), con la perdita delle funzioni canoniche della forma wild-type, in alcuni contesti potrebbe sfavorire la crescita delle cellule tumorali.

SCO2 è un regolatore positivo della fosforilazione ossidativa, per cui è verosimile ipotizzare che la transattivazione di questo target avvenga quando la cellula risente di un calo energetico, al fine di ripristinare i livelli di ATP o rialzare il rapporto ATP/AMP. Inoltre, il calo del rapporto ATP/AMP attiva la chinasi AMPK, la quale può attivare p53 sul residuo Ser15. Quindi, l'aumento dei livelli del trascritto del gene *SCO2*, in condizioni stringenti di glucosio, potrebbe essere dipendente dalla presenza di una proteina p53 wild-type, fosforilata e quindi attiva.

Siccome l'aumento del trascritto di *SCO2* si osserva dopo 9 ore in basso glucosio, è ragionevole supporre che la p53 wild-type sia attiva già a tempi più precoci.

In accordo con quanto ipotizzato, la p53 wild-type risulta fosforilata sulla serina 15 dopo 6 ore di trattamento con basso glucosio (**Fig. 45**). Inoltre, i livelli di p53 wild-type fosforilata, e quindi attiva, sono maggiori rispetto alla controparte p53 mutata (p.R156P). Infatti, dalle relative analisi densitometriche, la proteina p53 mutata in basso glucosio risulta parzialmente fosforilata, e quindi parzialmente attiva, nonostante i livelli della proteina totale sono superiori ai corrispettivi livelli della p53 wild-type.

La fosforilazione in Ser-15 potrebbe dipendere dalla capacità della p53 mutata di adottare uno stato conformazionale simile a quello della p53 wild-type. Probabilmente, la mutazione p.R156P causa un ripiegamento della proteina, rendendo meno accessibile il sito di fosforilazione in Ser15 e riflettendosi a valle con un'attività parziale della proteina.

Inoltre, i livelli di fosforilazione di AMPK sono comparabili nella linea cellulare p53 wild-type, indipendentemente dalla concentrazione di glucosio, supportando un'attivazione della chinasi associata al danno funzionale del CI. Viceversa, la linea

cellulare p53 mutata è più sensibile alla combinazione del danno energetico e nutrizionale, mostrando un trend di aumento di AMPK-P in condizioni di basso glucosio rispetto alla condizione di glucosio standard.

AMPK è un noto sensore energetico e di conseguenza è presumibile che la sua attivazione sia conseguente alla combinazione del danno sul CI e di carenza di glucosio. Contestualmente, solo le cellule p53 wild-type riuscirebbero ad aggirare il collasso metabolico in seguito all'attivazione di AMPK (**Fig. 40**).

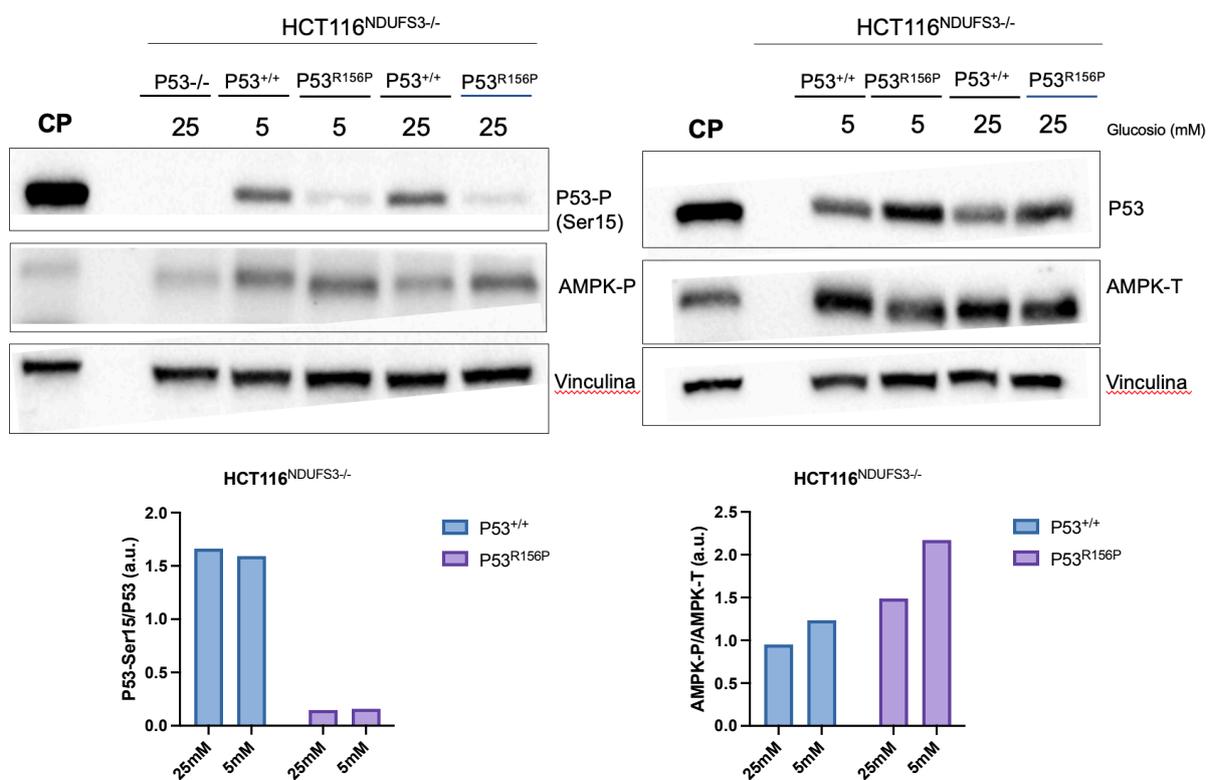


Figura 45 Valutazione dell'espressione proteica di P53, P53-P, AMPK-T, AMPK-P mediante Western Blot in linee cellulari HCT116 NDUFS3-/- (p53^{-/-}, p53^{+/+}; p53^{R156P}) per 6h in glucosio 5mM. La linea cellulare HCT116^{NDUFS3-/-} p53^{+/+} trattata con cisplatino rappresenta il controllo positivo (CP). Le relative densitometrie sono state calcolate con ImageJ. Dato preliminare (N=1).

Quindi, lo stress nutrizionale contestualmente ad un deficit del CI attiverrebbe la proteina chinasi AMPK, la quale una volta attiva e quindi fosforilata, potrebbe attivare la proteina p53 fosforilandola in serina 15. L'attivazione di p53 promuoverebbe il metabolismo ossidativo transattivando *SCO2*, recuperando parzialmente la fosforilazione ossidativa e rallentando il collasso metabolico delle cellule tumorali.

Il ruolo pro-ossidativo della proteina p53 wild-type potrebbe riflettersi con un' aumentata capacità respiratoria delle cellule, nonostante il danno funzionale del CI. Tuttavia, la misurazione della capacità respiratoria delle cellule prive del CI e con una proteina p53 wild-type non è valutabile attraverso la misura della respirazione aerobica con il Seahorse. Il CI è il primo, nonché più grande, enzima della fosforilazione ossidativa. La maggior parte degli equivalenti riducenti sotto forma di NADH, il più abbondante nella cellula, arrivano al CI, conosciuto anche come NADH deidrogenasi. Di fatto, la misurazione della respirazione mitocondriale produce una linea piatta (dati non mostrati), essendoci un difetto dell'enzima, indipendentemente dal background genetico di p53. Come saggio alternativo, pertanto, si è valutata l'attività spettrofotometrica dei complessi respiratori II, III e IV isolati nelle linee cellulari HCT116^{NDUFS3-/-; p53-/-} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+}.

Confrontando l'attività di ogni singolo complesso tra la linea HCT116^{NDUFS3-/-; p53-/-} e HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} non si osservano variazioni nelle attività dei complessi II e III (CII e CIII), mentre l'attività del CIV risulta significativamente aumentata (di circa 3 volte) nelle cellule HCT116^{NDUFS3-/-; p53+/+} (**Fig.46**). Complessivamente, questo saggio suggerisce una maggiore attività del CIV in presenza della proteina p53 e lascia supporre che potrebbe essere il complesso respiratorio maggiormente influenzato. Questo sarebbe in accordo su quanto già riportato in letteratura su come p53 regoli positivamente la sintesi del fattore di assemblaggio del complesso IV della citocromo c ossidasi 2 (SCO2) [116]. Contestualmente ad un danno funzionale del CI, il trasferimento di elettroni può avvenire grazie alla stabilità dei complessi II-III-IV. Quindi, in una condizione di danno al CI associato alla carenza di glucosio, la presenza di una proteina p53 wild-type, che trasattiva SCO2, favorirebbe la stabilità del CIV e quindi la respirazione mitocondriale, garantendo un vantaggio proliferativo alle cellule tumorali.

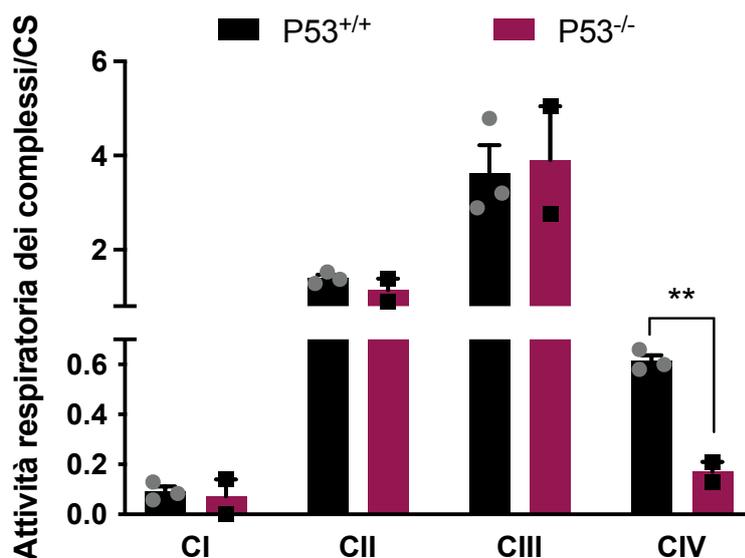


Figura 46 Misura spettrofotometrica dell'attività dei complessi respiratori in cellule HCT116^{NDUFS3-/-P53-/-} e HCT116^{NDUFS3-/-P53+/+}. I dati (media±SEM; n=3) sono normalizzati sull'attività della citrato sintasi (CS).

Allo scopo di valutare se la forma mutata di p53 (p.R156P) fosse coinvolta nella regolazione dell'espressione del gene *SCO2*, o se lo fosse esclusivamente la p53 wild-type, è stato eseguito un saggio di luciferasi.

I saggi reporter di luciferasi dimostrano che esclusivamente quando si trasfetta la p53 wild-type si osserva un aumento significativo dell'attività di luciferasi (luminescenza), indicando così una capacità di transattivazione della p53 wild-type sul promotore di *SCO2* contenente la p53RE. Al contrario, l'attività di luciferasi non mostra variazioni in seguito alle co-trasfezioni con i vettori contenenti i mutanti di p53 (**Fig.47**).

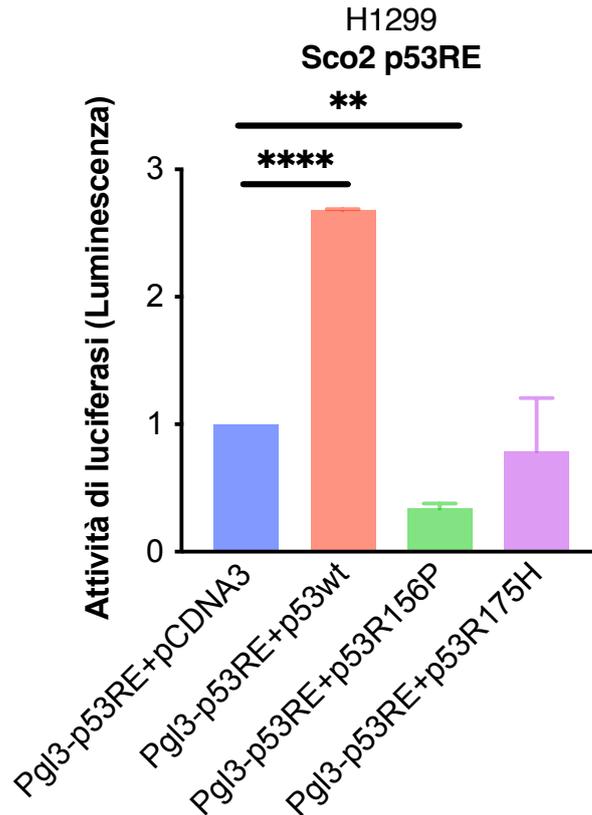


Figura 47 Saggio della luciferasi. Effetto di p53wt, p53R156P, p53H175R sull'attività trascrizionale di Sco2-p53REs. Le cellule p53-null H1299p53^{-/-} sono state co-trasfettate con una trasfezione transiente con il vettore vuoto pcDNA3 o vettori di p53, p53R156P, p53H175R. I dati rappresentano la media di almeno tre esperimenti indipendenti e sono indicati come media \pm SD. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (* $p < 0,05$).

La mutazione R156P non è una mutazione ben caratterizzata, a differenza della R175H che rappresenta l'hotspot mutazionale più frequente tra quelli noti di p53. Infatti, la p53-R175H ha la più alta frequenza nei pazienti affetti da cancro sia nel database TCGA che nel database delle mutazioni somatiche IARC TP53 (**Tabella 7**). Sebbene perda la funzione transattivante della p53 wild-type, la p53-R175H può legarsi a sequenze di DNA di altri geni e transattivarne la loro espressione [203]. p53-R175H, p53-R248Q e p53-R273H possono indurre la traslocazione di GLUT1 sulla membrana cellulare attraverso l'aumento dell'espressione delle piccole GTPasi RhoA e ROCK, promuovendo l'effetto Warburg, il che significa che le cellule tumorali generano energia affidandosi alla glicolisi aerobica invece della fosforilazione ossidativa [174]. Nel tumore della testa e del collo, in condizioni di deprivazione di glucosio, p53-P151S, p53-R175H, p53-

G245C e p53-R282W si localizzano nel citoplasma e inibiscono la fosforilazione e l'attivazione di AMPK, reprimendo la glicolisi aerobica. Pertanto, le p53 mutanti inducono l'effetto Warburg per promuovere la crescita tumorale inibendo la fosforilazione di AMPK [204].

TCGA Database		IARC TP53 Somatic Mutations Database	
Mutants	Percentage in TP53 Mutant Cases	Mutants	Percentage in TP53 Mutant Cases
Missense TP53 R175H	3.69%	Missense R175H	4.21%
Missense TP53 R248Q	2.88%	Missense R248Q	3.28%
Missense TP53 R273C	2.80%	Missense R273H	2.97%
Missense TP53 R273H	2.25%	Missense R248W	2.65%
Missense TP53 R248W	2.19%	Missense R273C	2.45%
Missense TP53 R282W	2.05%	Missense R282W	2.10%
Stop Gained TP53 R213 *	1.78%	Missense G245S	1.58%
Missense TP53 Y220C	1.60%	Missense R249S	1.52%
Stop Gained TP53 R196 *	1.30%	Missense Y220C	1.39%
Missense TP53 G245S	1.05%	Stop Gained TP53 R213 ¹ *	1.14%

¹ * represents the termination codon.

Tabella 7 | 10 mutanti TP53 più frequenti. I dati sono stati ottenuti dal database TCGA e dal database delle mutazioni somatiche TP53 dello IARC.

Alla luce degli studi riportati in letteratura, il mutante p.R175H avendo perso la canonica funzione della proteina p53 wild-type e acquisito nuove funzioni pro-oncogeniche, potrebbe non transattivare il gene pro-ossidativo *SCO2*. La scelta di confrontare i due mutanti (p.R175H e p.R156P) nel saggio di luciferasi aiuta a prevedere se il mutante d'interesse (p-R156P), non essendo ancora caratterizzato, possa avere un ruolo analogo al noto hotspot mutazionale (p-R175H).

Il risultato del saggio della luciferasi da un lato conferma quanto ipotizzato sul ruolo del mutante p.R175H, il quale potrebbe spingere verso un fenotipo Warburg, dall'altro presuppone che il mutante p.R156P possa avere un ruolo analogo a quello di p.R175H. Ciò non esclude la presenza di altri hot-spot mutazionali di p53, diversi da quelli utilizzati in questo saggio, in grado di legare il promotore del gene d'interesse.

Per mimare le condizioni sperimentali finora descritte, secondo la quale la p53 wild-type compensa un danno funzionale del CI in condizioni di carenza di glucosio, i saggi di luciferasi sono stati ripetuti, con modalità analoghe a quelle descritte sopra, nelle linee HCT116(NDUFS3+/+; P53+/+) sia in condizioni di glucosio standard (25mM) che in

carezza di glucosio (5mM) e trattate con il rotenone per mimare il danno funzionale sul CI.

I risultati ottenuti dai saggi di luciferasi mostrano che in condizioni basali, la p53 wild-type è in grado di transattivare il promotore di SCO2, a differenza dei due mutanti p.R156P e p.R175H, a supporto di quanto osservato precedentemente (**Fig.48**). In condizioni di basso glucosio, invece, in un background nucleare con una p53 wild-type, la p53 endogena determina un'attività di transattivazione del promotore SCO2. In seguito alla trasfezione del vettore con la p53 wild-type, aumenta anche la quantità di luminescenza emessa dalla luciferasi e quindi la capacità di transattivazione. Al contrario, i mutanti di p53 non hanno la capacità di transattivare il promotore del gene SCO2 in condizioni stringenti di glucosio. Infatti, i livelli di luminescenza rilevati nei mutanti sono comparabili a quelli rilevati co-trasfettando il vettore di espressione vuoto, dove presumibilmente l'aumento dell'attività di luciferasi è da attribuire alla sola attività della p53 endogena.

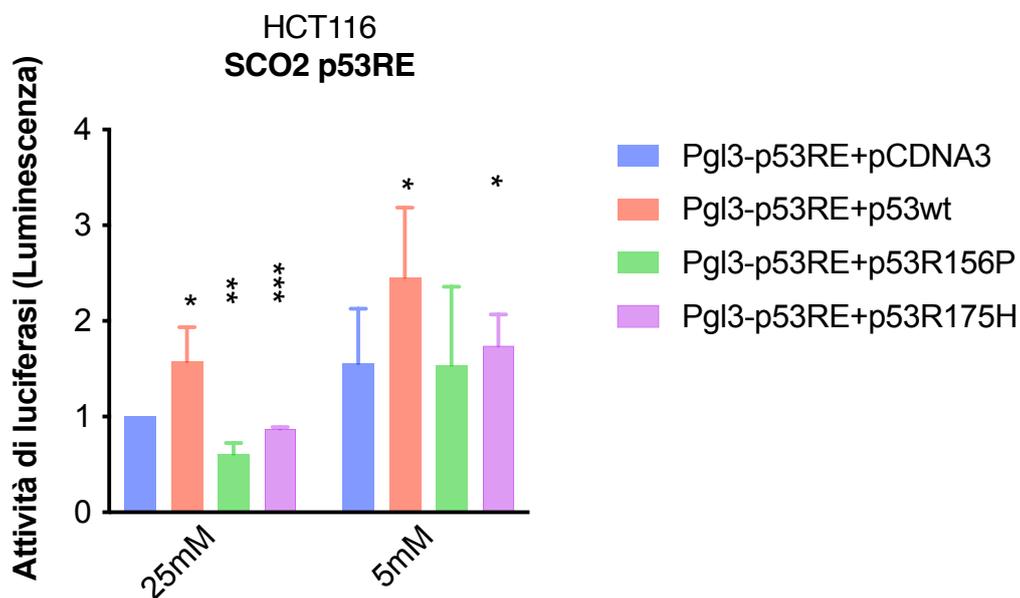


Figura 48 Saggio della luciferasi. Effetto di p53wt, p53R156P, p53H175R sull'attività trascrizionale di Sco2-p53REs in condizioni di glucosio standard (25mM) e di basso glucosio (5mM). Le cellule HCT116p53wt, trattate con Rotenone, sono state co-trasfettate con una trasfezione transiente con il vettore vuoto pcDNA3 o vettori di p53, p53R156P, p53H175R. I dati rappresentano la media di almeno tre esperimenti indipendenti e sono mostrati con \pm SD. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (* $p < 0,05$) utilizzando come controllo le cellule trasfettate con il vettore vuoto e coltivate in condizioni di 25mM.

Una conclusione chiara e inequivocabile di questi esperimenti è che la p53 wild-type regola i livelli della proteina SCO2. È discutibile se ciò avvenga attraverso l'attivazione trascrizionale diretta di *SCO2*.

Allo scopo di dimostrare che la regolazione della p53 sul promotore di *SCO2* avvenga tramite un'interazione diretta, tra la proteina p53 e il gene *SCO2*, è stato eseguito un saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).

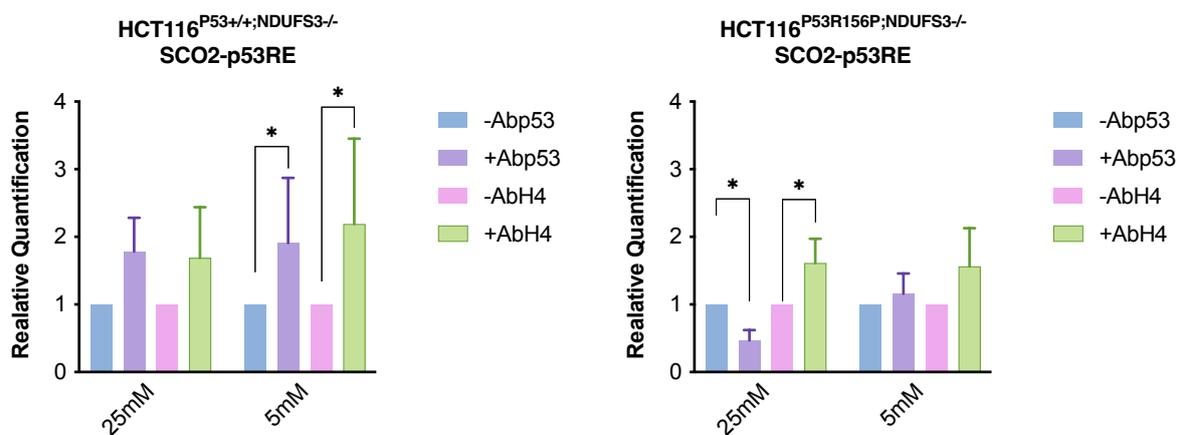


Figura 49 Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). Reclutamento di p53 e dell'istone H4 acetilato alle p53RE presenti nel gene *SCO2* mediante saggio ChIP, in glucosio 25mM (HG) e glucosio 5mM (LG). La cromatina cross-linked è stata estratta dalle linee HCT116^{P53+/+;NDUFS3-/-} e HCT116^{P53R156P;NDUFS3-/-} e immunoprecipitata con gli anticorpi indicati. Il materiale immunoprecipitato è stato amplificato utilizzando primer specifici per Sco2-p53RE. I primer specifici per il promotore di interleuchina-10 sono stati utilizzati come controllo negativo. L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a campioni indipendenti (*p<0,05) utilizzando come controllo l'immunoprecipitato a meno dell'utilizzo dell'anticorpo p53 e/o H4.

Coerentemente ai saggi di luciferasi, il saggio ChiP (**Fig.49**) indica che, in condizioni di basso glucosio, esclusivamente la p53 wild type è in grado di occupare la regione regolatoria con altrettanto aumento dell'acetilazione dell'istone H4. Viceversa, le cellule con una p53 mutata (p.R156P) non transattivano *SCO2* a causa di una perdita della proprietà chimico-fisica e quindi potrebbero non essere in grado di compensare la fosforilazione ossidativa.

Dopo decenni di ricerche, il ruolo di p53 nel controllare specifiche risposte in maniera univoca non è ancora compreso e nel trattamento oncologico diventa quindi

fondamentale la stratificazione dei pazienti sulla base di un accurato profilo genetico del tumore. Attualmente, al momento della diagnosi circoscritta allo stato di p53, i pazienti vengono classificati in wild type e mutanti p53; tuttavia, potrebbe essere necessario un sistema di classificazione basato ad esempio sulla classe funzionale del mutante. Si può immaginare che questo tipo di classificazione della p53 mutante possa anche rivelare nuove dipendenze e vulnerabilità terapeutiche. Non di meno, la presenza di una proteina p53 wild-type potrebbe inficiare l'efficacia di una terapia mirata ad inibire la funzionalità del CI nel trattamento oncologico.

In questo contesto, i risultati riportati nel seguente studio da un lato approfondiscono il meccanismo d'azione, l'efficacia, e la specificità di potenziali farmaci mirati ad indurre un danno funzionale al CI mitocondriale al fine di ampliare la finestra terapeutica nel trattamento oncologico, dall'altro identificano possibili meccanismi adattativi all'inibizione del CI in presenza di una proteina p53 wild-type, indirizzando l'approccio dell'utilizzo di inibitori del CI in tumori p53 mutati.

5.11 Colture 3D *ex vivo* di SF-HGSOC in perfusione ricapitolano il fenotipo tumorale

La ricerca sul cancro e lo sviluppo di protocolli terapeutici si basano tradizionalmente sull'uso di linee cellulari tumorali consolidate e di modelli animali per saggi *in vitro* e *in vivo*. Sebbene questi approcci abbiano portato ad un gran numero di risultati clinicamente significativi [205], sono emersi anche limiti e svantaggi. Ad esempio, il modello *in vitro* potrebbe non rispecchiare le caratteristiche *in vivo*, poiché la pressione selettiva consente di far proliferare solo le cellule più aggressive, con conseguente perdita di eterogeneità del tumore [206]. Modelli più sofisticati e avanzati, ancora più adatti alla ricerca traslazionale sul cancro, sono gli xenotrapianti tumorali derivati da pazienti (PDX), ottenuti iniettando cellule tumorali primarie o piccoli pezzi di campioni tumorali di origine umana per via sottocutanea in topi. Sebbene questo sistema sia più fedele all'eterogeneità del tumore e apparentemente conservi i profili di espressione genica del tumore originale [207], è ancora ostacolato da diverse limitazioni. In

particolare, i modelli PDX non riescono a ricapitolare il microambiente tumorale umano (TME), comprese le interazioni tra il tumore e il sistema immunitario e il tumore con la matrice extracellulare circostante, che sono sempre più riconosciute come fondamentali per la progressione del tumore e la formazione di metastasi [206,208] e per migliorare la risposta delle cellule tumorali al trattamento farmacologico.

In questo scenario, la tecnologia dei bioreattori riveste una particolare importanza. Nello specifico, i bioreattori basati sulla perfusione sono stati utilizzati per oltre un decennio nel campo dello studio della rigenerazione dei tessuti muscolo-scheletrici [209–211] e hanno condotto alla generazione di tessuti cartilaginei autologhi che possono essere utilizzati per la ricostruzione dei tessuti danneggiati [212,213].

Negli ultimi anni, il bioreattore a perfusione U-CUP sta mostrando risultati incoraggianti nella generazione di modelli tumorali tridimensionali complessi utilizzando linee cellulari e primarie coltivate su supporti spugnosi. La coltura basata sulla perfusione supera una delle principali limitazioni della coltura statica, ovvero il trasporto di massa limitato, che comporta una diffusione ridotta e non uniforme di ossigeno e di sostanze nutritive all'interno del tessuto, compromettendone la crescita e la vitalità cellulare. Più recente, lo U-CUP è stato utilizzato per la coltura *ex vivo* di tessuti tumorali. Rispetto alla coltura in statico, all'interno del bioreattore, il flusso di perfusione favorisce l'apporto di più sostanze nutritive e ossigeno al tessuto, con conseguente aumento della sopravvivenza di tutte le cellule del microambiente tumorale, quindi delle cellule tumorali, dei linfociti e delle cellule stromali. Quindi, oltre alla somiglianza strutturale con i campioni originali e alla qualità del tessuto, un modello 3D ideale permetterebbe di preservare il più possibile l'eterogeneità del microambiente tumorale.

Alla luce dei dati mostrati finora, ottenuti sia dagli studi *in vitro* che *in vivo*, il passo successivo è stato quello di valutare se l'utilizzo dei bioreattori possa essere un modello preclinico affidabile per approfondire lo studio degli inibitori del CI. Inoltre, siccome i tumori con una p53 mutata si sono mostrati più sensibili all'inibizione del CI e alle condizioni di basso glucosio, sono stati sfruttati modelli 3D *ex vivo* ottenuti a partire da tessuti di carcinoma ovarico sieroso ad alto grado (HGSOC) caratterizzati da mutazioni in p53. In questo scenario, l'identificazione dei candidati responsivi ad una terapia metabolica permetterebbe una stratificazione dei tumori nei più noti driver della

tumorigenesi, assumendo una particolare importanza nell'ambito della medicina personalizzata.

L'HGSOC è il sottotipo più aggressivo tra i tumori ovarici ed è caratterizzato da un'alta frequenza (96%) di mutazioni del gene *TP53* [214]. In tutto il mondo, l'HGSOC è l'ottava causa di morte per cancro nelle donne [215], delle quali oltre l'80% presenta una malattia avanzata (stadio III-IV), con una sopravvivenza a 5 anni di circa il 25% [216].

Una raccolta di tumori ovarici è stata istituita a partire dal 2012 presso l'Unità Operativa di Genetica Medica del Policlinico di Sant'Orsola IRCCS di Bologna attraverso lo studio MiPEO (Mitocondri nei meccanismi di Progressione dei carcinomi Endometriale ed Ovarico) approvato dal Comitato Etico Indipendente dell'Ospedale S. Orsola-Malpighi (107/2011/U/Tess). I criteri di inclusione ed esclusione hanno permesso di ottenere una collezione orientata alla malattia, finalizzata all'esplorazione della biologia dei campioni. Grazie ad un lavoro di gruppo coordinato, è stata effettuata una raccolta adeguata in cui i campioni biologici sono stati curati in termini di manipolazione sterile, trasporto e conservazione adeguati, aliquote e congelamento precisi e riproducibili, oltre ad un sistema di identificazione adeguato e alla registrazione dei dati clinici. Inoltre, negli ultimi anni, questa collezione ha dato vita ad una serie di progetti di ricerca, comitati etici, collaborazioni nazionali e internazionali che hanno coinvolto l'esperienza multidisciplinare di chirurghi ginecologi, genetisti, biologi e ingegneri. Infatti, gli esperimenti volti a testare gli inibitori del CI in un modello tumorale *ex vivo* sono stati eseguiti presso il Dipartimento di Biomedicina dell'Ospedale Universitario di Basilea (Svizzera), nell'ambito di una collaborazione con i laboratori Ovarian Cancer Research e Tissue Engineering. Lo studio si è incentrato sull'utilizzo di tessuti congelati (*slow frozen*) sia di tumori primari che di metastasi omentali di pazienti affette da HGSOC.

La prima parte dello studio ha previsto un confronto tra il tessuto fresco e il tessuto *slow frozen* (SF) derivati dalla stessa paziente. Il tessuto SF è un tessuto che ha subito un congelamento graduale in FBS e DMSO (10%), conservato per almeno una settimana ad una temperatura di -80° per poi essere trasferito in azoto liquido.

Il piano sperimentale, composto da diverse fasi, è illustrato in **Fig. 50**. I tessuti freschi costituiti da piccoli pezzi (*chunk*) di 2x2x2 mm, in parte sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina per avere un controllo del tumore fresco; i restanti chunks sono stati congelati lentamente (SF). La prima serie di esperimenti preliminari è basata sulla raccolta di tumori primari dell'ovaio freschi e di metastasi omentali con l'obiettivo di verificare se la morfologia del tessuto tumorale in U-CUP fosse preservata fino a 5 giorni di coltura. Il tempo di coltura è stato scelto sia sulla base di un tempo precedentemente utilizzato per generare una coltura primaria perfusa di tumore alla mammella [217] che sulla base della durata dei trattamenti *in vitro* con gli inibitori, e quindi 72 ore.

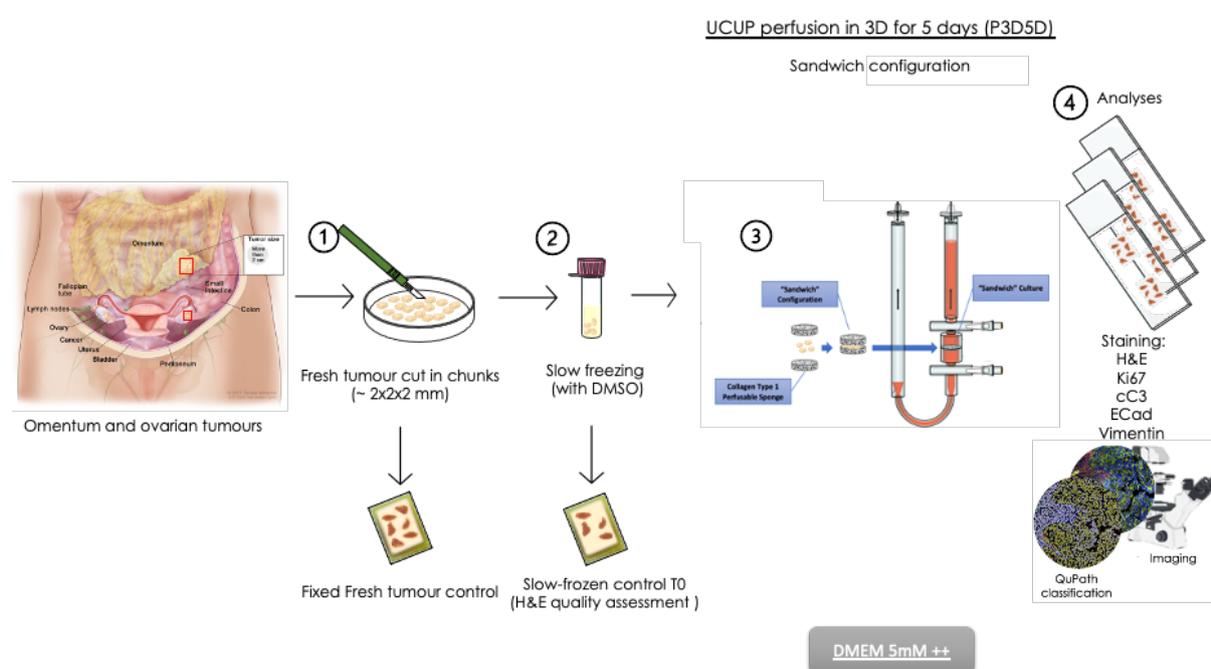


Figura 50 Rappresentazione schematica del piano sperimentale. 1) Tessuto Fresco 2) Tessuto congelato lentamente (*slow frozen*); 3) Configurazione con lo scaffold; 4) Tessuti HGSOc, primari o metastatici, sono inclusi in paraffina. Successivamente, sezioni di 4µm sono tagliate al microtomo e colorate per H&E e IF. T0 (immediatamente dopo lo scongelamento); P3D (perfuso-3D).

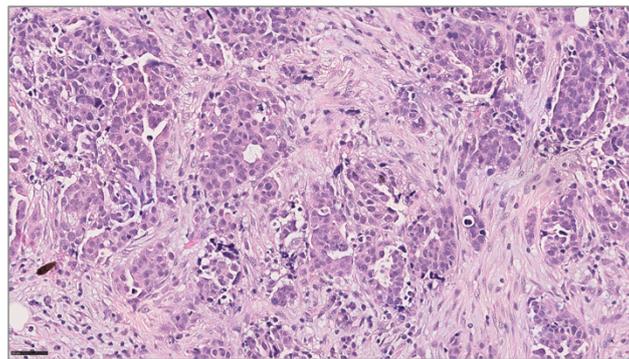
Complessivamente, le colture di tessuti di HGSOc, sia primari che metastatici in perfusione, preservano l'eterogeneità delle componenti cellulari del tumore ovarico epiteliale (**Fig.51A**). Inoltre, il tessuto SF sembra ricapitolare il fenotipo del tessuto fresco, seppure con una riduzione significativa ($p < 0.01$) dell'area tumorale (**Fig.51B**). Infatti, nonostante la percentuale di cellule tumorali residue nel tessuto SF sia inferiore rispetto

al tessuto fresco, si riesce ad ottenere una percentuale di area tumorale maggiore del 20%, quindi il tumore è ben preservato e analizzabile al termine della coltura.

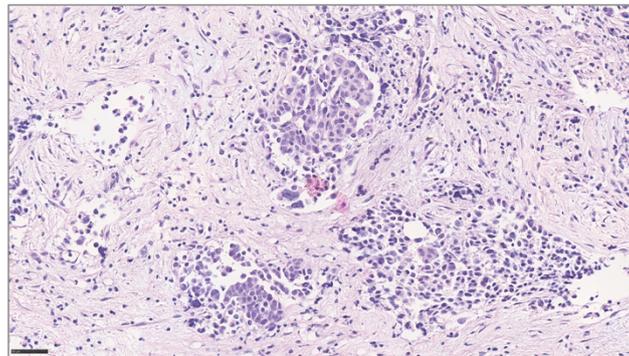
Il congelamento lento potrebbe causare una distorsione del tessuto tumorale, dovuta alla formazione di cristalli di ghiaccio, effetto ben noto come "*swiss cheese*", in misura variabile, a seconda del grado e delle dimensioni dei cristalli. Questa potrebbe essere una possibile causa alla base della diminuzione dell'area totale della biopsia e/o dell'area tumorale.

A

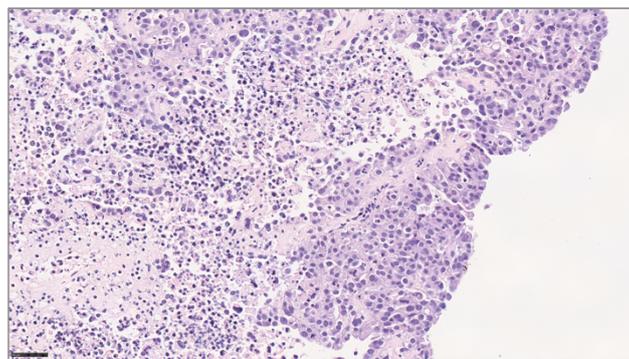
Tumore fresco (F2x2x2)



Tumore slow frozen (SF D0)



Tumore slow frozen perfuso (D5)



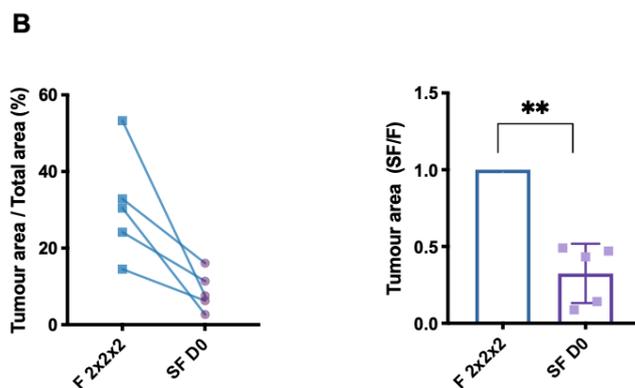


Figura 51 A) Colorazione H&E rappresentativa di HGSOc di tessuto fresco (F2x2x2), congelati lentamente (slow frozen-SF D0) e coltivati in perfusione per 5 giorni (D5). Sono mostrati gli ingrandimenti al microscopio 40x. Barra di scala 500 μm **B)** Quantificazione dell'area epiteliale normalizzata sull'area totale dei tessuti freschi (F2x2x2) e dei tessuti scongelati al giorno 0 (SFD0) (sx) (n=5); Grafico dei rapporti tra l'area tumorale del tessuto scongelato al D0 e il corrispettivo tessuto tumorale fresco (n=5). L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a variabili indipendenti (**p<0,01).

La possibilità di generare modelli 3D di cancro epiteliale ovarico vitali, proliferanti e strutturati a partire da tessuti congelati consente di superare le limitazioni legate alla manipolazione in tempi ristretti dei tessuti freschi e alla loro disponibilità limitata ai laboratori in prossimità delle sale chirurgiche. Inoltre, nell'era della medicina personalizzata, la possibilità di utilizzare campioni di tumore congelati come validi modelli preclinici consentirebbe di approfondire i meccanismi responsabili della sensibilità di un particolare tumore a un trattamento innovativo, indipendentemente dal momento del prelievo e dal luogo di raccolta del campione. La possibilità di utilizzare campioni congelati, oltre a quelli freschi, aumenterebbe anche la disponibilità dei campioni e consentirebbe di eseguire studi retrospettivi.

Il passo successivo è stato investigare quanto il congelamento e la successiva perfusione del tessuto possano influenzare la vitalità delle cellule tumorali, attraverso una valutazione quantitativa di cellule proliferanti e apoptotiche.

Allo scopo di confrontare la proliferazione cellulare tumorale nei tessuti freschi, nei corrispettivi SF e nei SF successivamente perfusi, è stata investigata l'espressione di Ki67, un antigene nucleare presente in tutte le fasi del ciclo cellulare ma assente nella fase G0 e diffusamente utilizzato per valutare l'indice di proliferazione di un tumore. Il Ki67 è stato determinato tramite immunofluorescenza (**Fig.52A**) per poi essere quantificato

attraverso QuPath, un software per analisi di vetrini istologici utilizzato per la patologia digitale. Seppure in quantità diverse, sia i tessuti freschi che quelli SF e SF perfusi sono caratterizzati da cellule in attiva proliferazione. In via del tutto preliminare, nonostante la capacità proliferativa delle cellule sottoposte al processo di congelamento venga ridotta in maniera significativa rispetto al tessuto fresco ($p < 0,01$, **Fig.51B**), quando il tessuto viene coltivato in perfusione recupera l'attività proliferativa, probabilmente perché esposto ad un ambiente favorevole, riportando la percentuale di cellule in attiva proliferazione ad un valore paragonabile a quello del tessuto fresco (**Fig. 52B**).

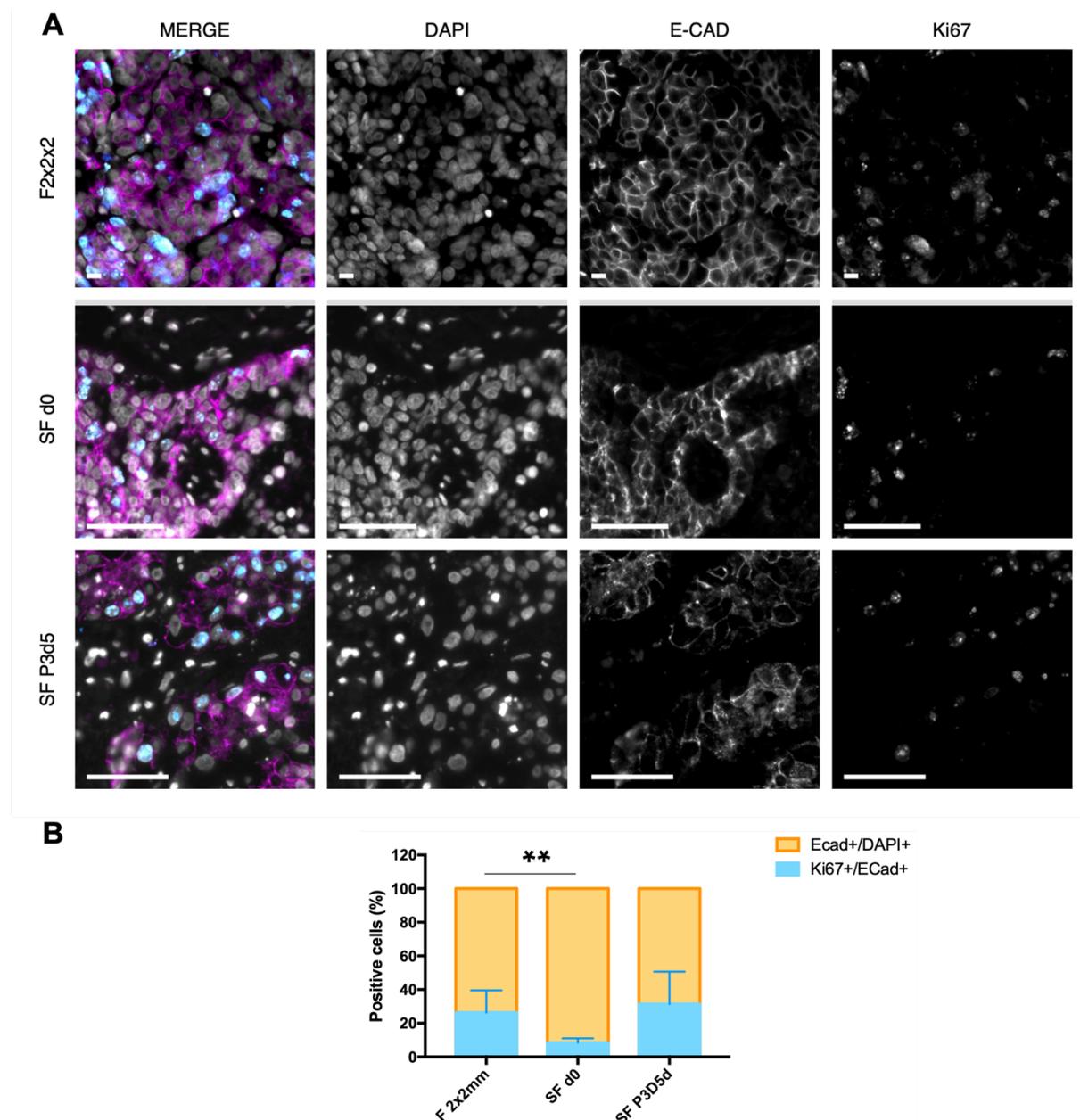


Figura 52 A) Immagini rappresentative di immunofluorescenza al 40x per i seguenti marcatori: DAPI, E-CAD e Ki67 rispettivamente nei tessuti freschi (F2x2x2), scongelati al giorno 0 (SFd0) e dei tessuti congelati coltivati in perfusione dopo 5 giorni (SF P3d5). **B)** Quantificazione della % di cellule positive per l'antigene

Ki67 normalizzata sulla % delle cellule positive per il marker E-CAD (n=2). Barra di scala 100 μm . L'analisi statistica è stata eseguita applicando un t-test a variabili indipendenti (**p<0,01).

Inoltre, nei tessuti freschi, nei corrispettivi SF e nei SF successivamente perfusi è stata valutata la distribuzione e la quantità delle cellule apoptotiche attraverso la rilevazione della forma attiva della caspasi 3 (cleaved. Caspase 3, cC3). Il meccanismo cellulare dell'apoptosi è diverso da altre forme di morte cellulare perché prevede l'attivazione e la scissione delle caspasi, che sono presenti nella cellula in forma inattiva come pro-caspasi. Nello specifico, la caspasi 3 attiva degrada diverse proteine cellulari ed è responsabile dei cambiamenti morfologici e della frammentazione del DNA durante l'apoptosi [218].

I risultati preliminari sulla quantificazione della percentuale delle cellule apoptotiche epiteliali non mostrano alcun trend di riduzione o di aumento tra il tessuto tumorale fresco e il tessuto slow frozen; quindi, il congelamento non danneggia la qualità del tessuto di partenza in termini di attivazione di apoptosi. (**Fig.53A-B**). Inoltre, i livelli di positività della caspasi 3 attiva sono comparabili anche confrontando il tessuto congelato con il corrispettivo perfuso (**Fig.53A-B**), escludendo che la perfusione possa aumentare la quantità di cellule apoptotiche.

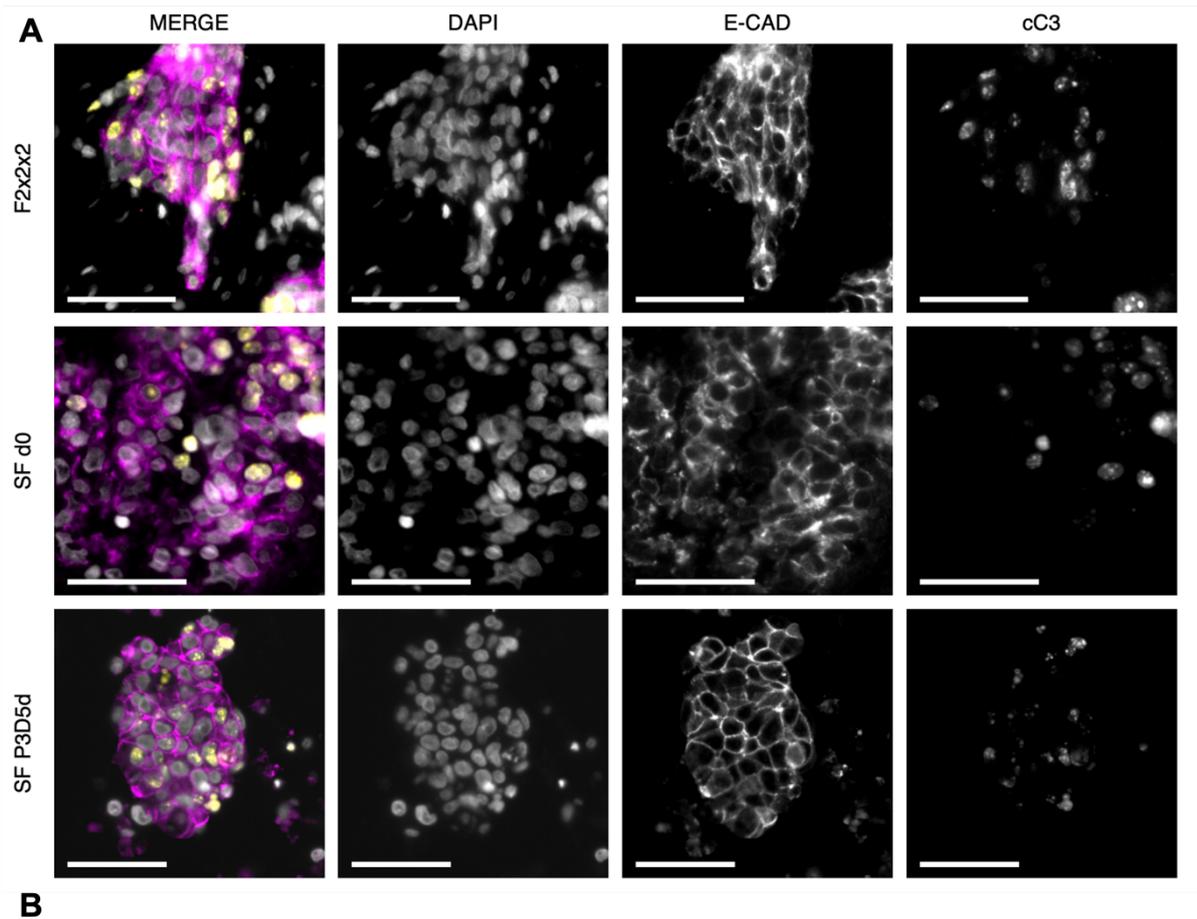


Figura 53 A) Immagini rappresentative di immunofluorescenza al 40x per i seguenti marcatori: DAPI, E-CAD e cC3 rispettivamente nei tessuti freschi (F2x2x2), scongelati al giorno 0 (SFd0) e dei tessuti congelati coltivati in perfusione dopo 5 giorni (SF P3d5). **B)** Quantificazione della % di cellule positive per l'antigene cC3 normalizzata sulla % delle cellule positive per il marker E-CAD (n=2).

Complessivamente, le analisi preliminari ottenute dalla valutazione della proliferazione e dell'apoptosi incoraggiano l'utilizzo di un sistema in perfusione e rendono candidabile il modello slow frozen per lo studio degli inibitori del CI.

Come già anticipato, all'interno del bioreattore, il flusso di perfusione spinge il mezzo di coltura attraverso due dischi di collagene perfondibili (scaffold). Al fine di valutare se

lo scaffold potesse influenzare la qualità e la quantità del tessuto tumorale, per ogni condizione di coltura sono state utilizzate due configurazioni diverse, con e senza scaffold. I chunks sono stati perfusi in U-CUP per 5 giorni, al termine dei quali sono state eseguite diverse analisi che permettessero di ottenere informazioni necessarie sulla vitalità del tessuto ed in generale di ottimizzare il sistema.

L'esperimento ha previsto l'utilizzo di tessuti tumorali, di diversa origine, di tre pazienti con carcinoma sieroso ad alto grado (n=1 ovaio, n=2 metastasi omentale). Indipendentemente dal tessuto tumorale di partenza, l'analisi istologica rivela come sia la componente epiteliale che quella stromale siano preservate, con una morfologia comparabile al giorno 0 in assenza di scaffold (**Fig.54A**). In generale, in assenza di scaffold il tessuto non sembra essere compromesso dal punto di vista qualitativo, preservando la tipica architettura ghiandolare e papillare dei tumori di HGSOc.

In parallelo, grazie all'utilizzo di QuPath, è stata calcolata una percentuale dell'area tumorale relativa rispetto all'area totale del tessuto. Osservando le quantificazioni dell'area tumorale degli omenti, la perfusione in assenza di scaffold sembra favorire il mantenimento dell'area tumorale. Il tumore primario, e quindi l'ovaio, invece, mostra una riduzione (**Fig.54B**).

Un possibile ostacolo all'individuazione di una efficace terapia individuale, basata su un approccio di medicina di precisione, si trova nell'eterogeneità tumorale, con porzioni diverse della massa neoplasica che possibilmente differiscono per caratteristiche e risposta al trattamento. In generale, in un contesto di elevata disomogeneità fra tumori e di eterogeneità intrinseca intra-tumorale (dove inoltre non è possibile effettuare una stima dell'area tumorale dello specifico chunk usato nel bioreattore prima della coltura) una numerosità maggiore rispetto quella attualmente disponibile sarà necessaria per trarre le opportune conclusioni biologiche circa l'effetto di determinate condizioni di coltura e/o di un determinato trattamento.

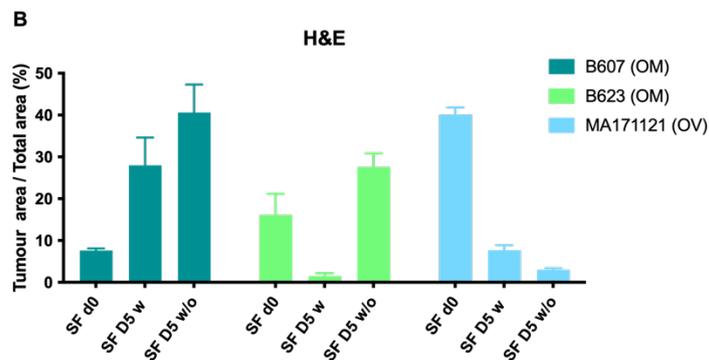
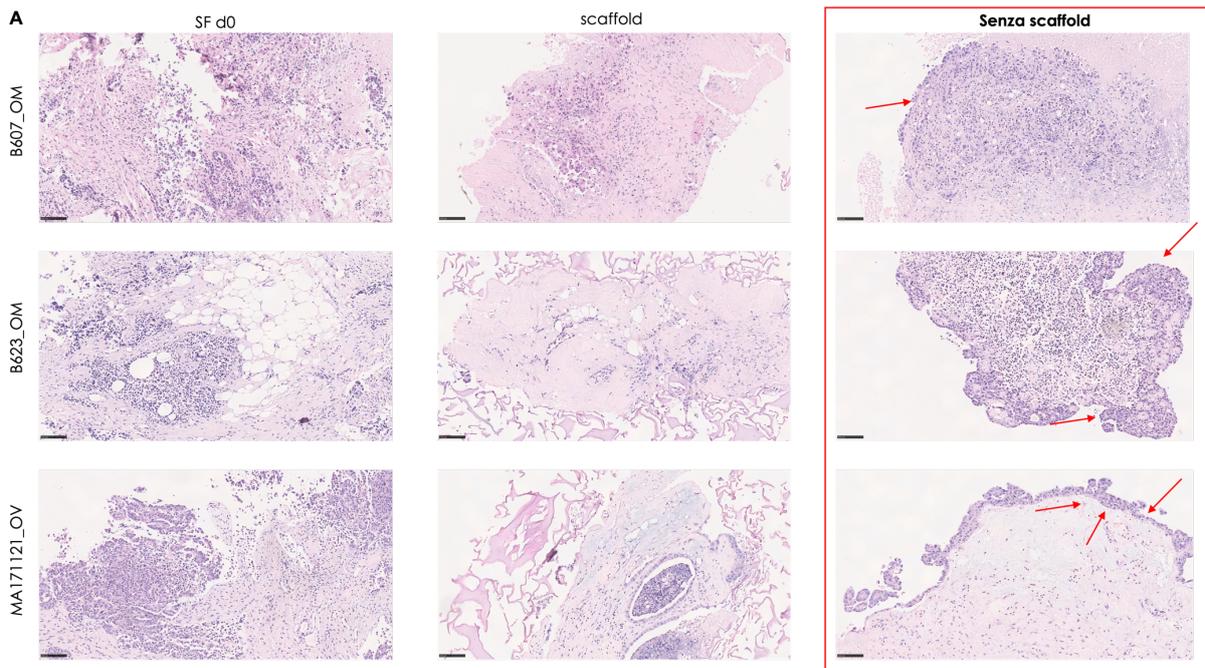


Figura 54 A) Immagini rappresentative H&E di biopsie HGSOc di tre donatori diversi. Le immagini al 40x sono rappresentative della configurazione tumorale con lo scaffold e senza scaffold. **B)** Quantificazione dell'area tumorale epiteliale. I grafici rappresentano il rapporto percentuale fra l'area tumorale epiteliale e l'area totale del chunk determinate attraverso il software QuPath. I tre donatori considerati, due con campioni di metastasi di omento (OM) ed uno con un campione primario di tumore ovarico (OV) sono rappresentati individualmente. Per ogni donatore e per ogni condizione sono stati utilizzati 3-4 chunk differenti. I risultati sono espressi come media + DS. I campioni al giorno 0 (SF d0) si sono considerati come controllo. SF= slow frozen; D5= perfusione al giorno 5; w= perfusione con scaffold di collagene w/o=senza scaffold di collagene.

Lo scopo di utilizzare lo scaffold è quello di favorire la coltura del tessuto tumorale in modo da fornire un supporto fisico alle cellule che lo compongono, le quali eventualmente potrebbero ripopolarlo. Nelle analisi eseguite in presenza dello scaffold non è stato possibile osservare alcun tentativo di "ancoraggio" delle cellule del tessuto allo scaffold (**Fig. 55**) e, in generale, indipendentemente dalla quantità della componente tumorale preservata, l'assenza dello scaffold sembra migliorare la qualità e la quantità del tessuto. Infatti, come è possibile osservare dalle immagini rappresentative (**Fig.55**), i due dischi di collagene sembrano comprimere i vari pezzi tumorali, con il rischio di

creare un danno meccanico e di conseguenza degli artefatti all'interno del tessuto e di ridurre la componente epiteliale, diversamente da quanto succede senza scaffold.

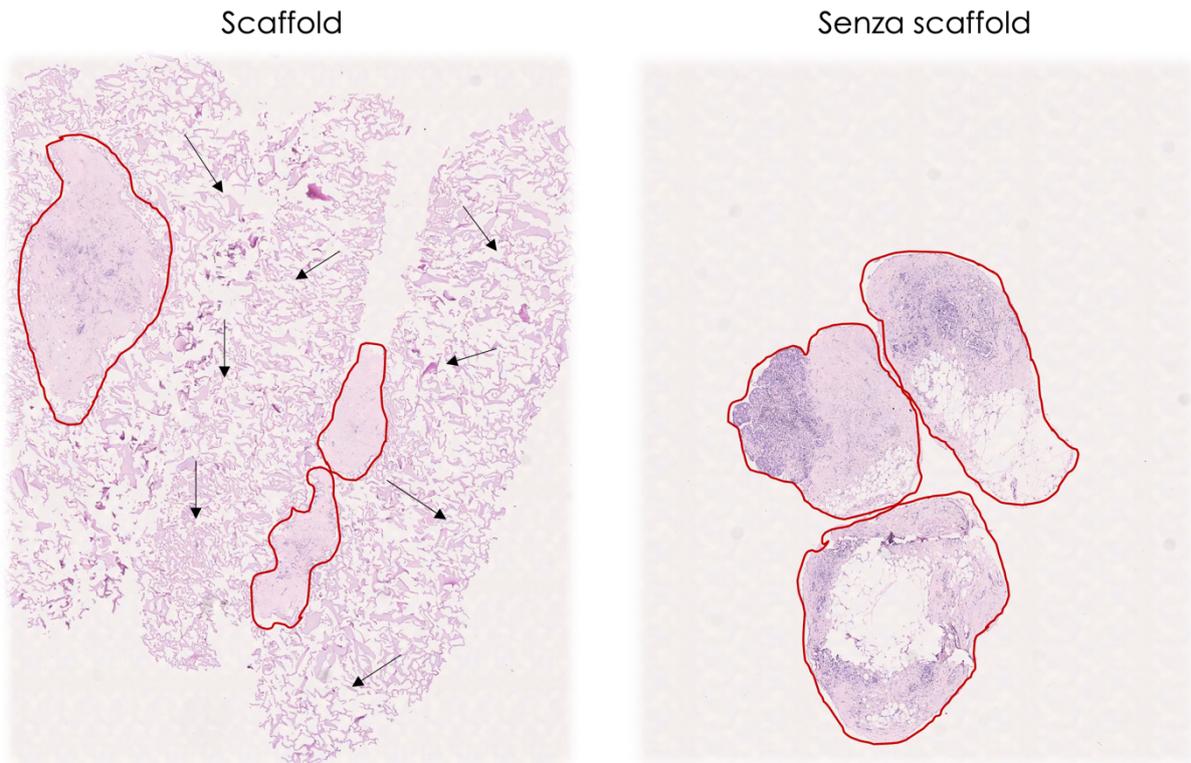


Figura 55 Immagini rappresentative H&E della configurazione tumorale con lo scaffold (sinistra) e senza scaffold (destra). Le linee rosse delimitano i tessuti tumorali coltivati in perfusione per 5 giorni. Le frecce indicano lo scaffold.

Un vantaggio dell'utilizzo della U-CUP consiste nello studiare contemporaneamente sia la componente epiteliale, verosimilmente tumorale, sia quella stromale. Sebbene la prima parte di questo studio di ottimizzazione delle condizioni e i futuri esperimenti di efficacia degli inibitori del CI si concentreranno sulla componente epiteliale, è stata comunque valutata l'integrità della componente stromale attraverso la marcatura della Vimentina (VIM). La configurazione senza scaffold, sembra preservare la componente stromale, se confrontata a quella con scaffold (**Fig. 56**). Saranno però necessari ulteriori studi (i.e. marcatura del Ki67 e cC3) e aumentare la numerosità dei campioni per trarre delle conclusioni più solide sulla componente stromale.

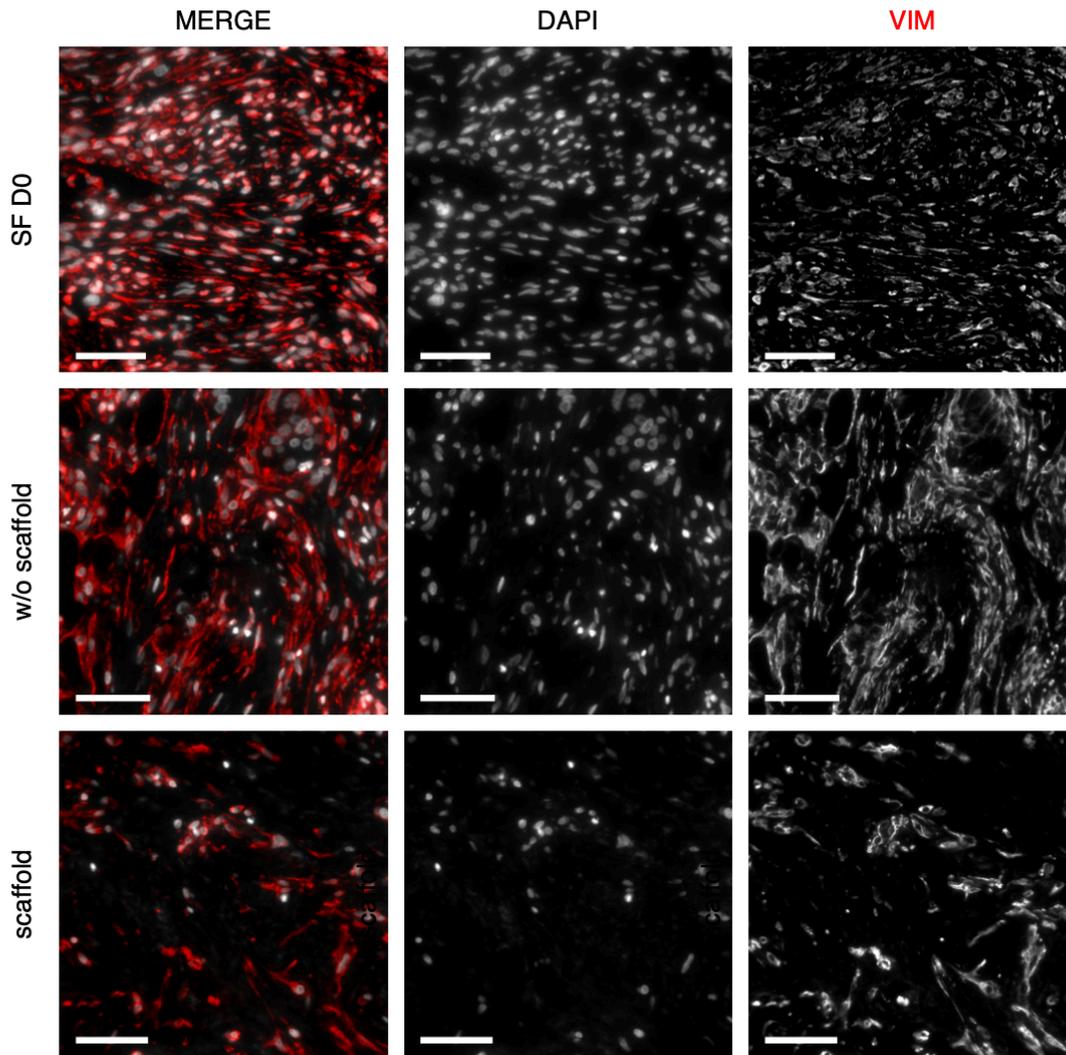


Figura 56 Immagini rappresentative di microscopia a fluorescenza. Il DAPI è stato usato per marcare i nuclei cellulari, la vimentina per marcare la componente stromale dei tessuti al giorno 0, o dopo 5 giorni di cultura in perfusione con o senza scaffold. N=2 Barra di scala 100 μm .

Complessivamente, la configurazione senza scaffold sembra preservare maggiormente la morfologia del modello tumorale 3D di SF-HGSOC (slow frozen - high grade serous ovarian cancer), facilitando anche la processazione dei campioni ed evitando un'eccessiva compressione del tessuto. Inoltre, l'utilizzo di un terreno con una concentrazione fisiologica di glucosio (DMEM 5mM glucosio), più adatta per testare farmaci con obiettivi associati al metabolismo, preserva l'integrità dei tessuti tumorali garantendo una morfologia comparabile a quella del tumore di origine al giorno 0.

5.12 Colture 3D *ex vivo* di SF-HGSOC in perfusione come valido modello preclinico per lo studio degli inibitori del CI

I modelli di coltura cellulare in 2D consentono solo un'indagine limitata dell'interazione cellula-cellula, mentre i costrutti tridimensionali (3D), come ad esempio gli sferoidi o gli organoidi, mancano di importanti componenti del microambiente tumorale, come l'architettura strutturale del tumore, i cambiamenti metabolici e le risposte attuate dal sistema immunitario. L'utilizzo di colture di tessuti tumorali in un sistema di coltura basato sulla perfusione potrebbe essere un'importante alternativa, in quanto consente di mantenere un microambiente tumorale intatto, favorendo l'ingresso del mezzo di coltura attraverso il tessuto, superando al contempo le limitazioni tipiche delle colture statiche come già precedentemente accennato.

Inoltre, un'altra sfida importante è lo screening dell'efficacia dei farmaci in modelli preclinici rappresentativi. Infatti, non esiste ancora la possibilità di eseguire uno screening terapeutico rapido, preciso e riproducibile su tessuti intatti, derivati da pazienti.

Al fine di migliorare le strategie di sperimentazione preclinica per potenziali terapie nel trattamento oncologico basate sull'utilizzo degli inibitori del CI, l'ultima parte dello studio si è focalizzato sul valutare se l'utilizzo di colture 3D in perfusione fosse un modello valido.

Il piano sperimentale è simile a quello descritto per l'ottimizzazione delle condizioni di coltura per l'utilizzo di un mezzo con concentrazioni fisiologiche di glucosio (**Fig.50**). Nello specifico sono state utilizzate biopsie di tumore primario e/o metastasi omentali di pazienti con diagnosi di HGSOC, trattate con gli inibitori del CI, EVP 4593 e metformina, utilizzando la configurazione 3D in assenza di scaffold (**Fig.57**).

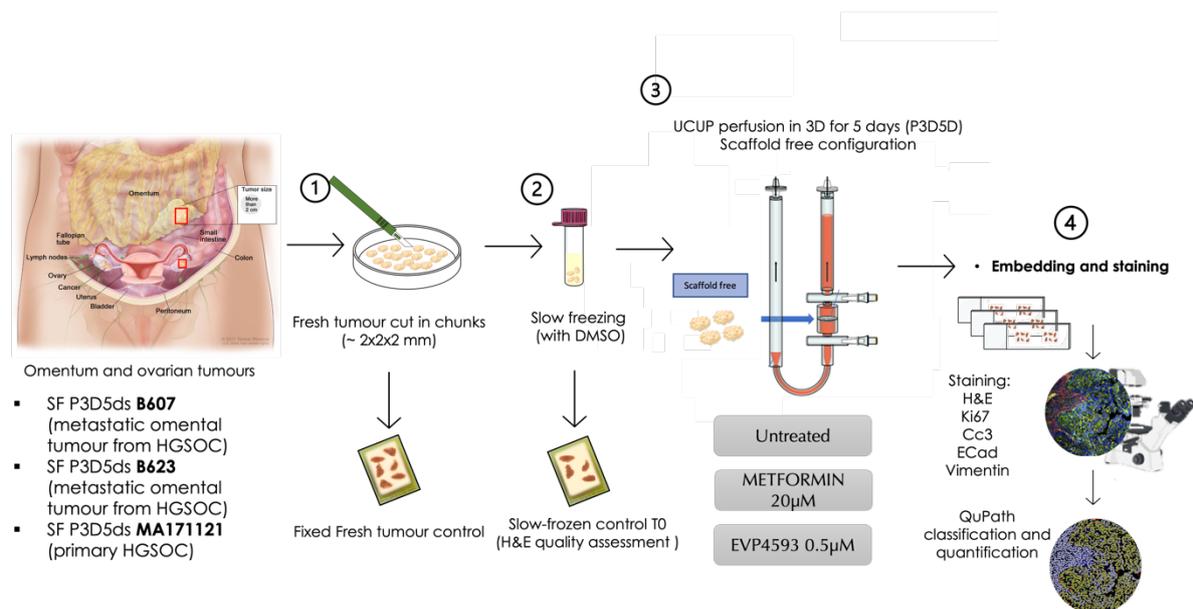


Figura 50 Rappresentazione schematica del piano sperimentale utilizzato per analizzare la coltura in perfusione come modello per la valutazione degli inibitori del CI. Tutte le attività sperimentali sono state effettuate, con n= 2 campioni di tumore metastatico da omento ed n=1 tumore primario ovarico, tramite i seguenti passaggi: 1) ottenimento del tessuto fresco da paziente e sminuzzamento in chunks con fissazione ed inclusione in paraffina del controllo fresco; 2) congelamento lento del tessuto (slow frozen) con soluzione di DMSO. I tessuti slow frozen sono stati poi scongelati prima dell'utilizzo in U-CUP. I controlli slow frozen al giorno 0 sono stati fissati ed inclusi in paraffina direttamente dopo lo scongelamento. 3) Coltura dei tessuti in perfusione in U-CUP per 5 giorni in configurazione senza scaffold e con l'aggiunta di Metformina 20 μM o di EVP4593 0.5 μM 4) Analisi sperimentale dei campioni: inclusione in paraffina, sezionamento in fette dello spessore di 4 μm s al microtomo e colorazioni H&E e IF. Le immagini acquisite sono state quantificate con il software QuPath.

Almeno 4 chunks di ogni biopsia tumorale (N=1 di ovaio e N=3 di omento), per ogni paziente, sono stati introdotti in un singolo bioreattore in perfusione per una durata di 5 giorni. Per ogni paziente sono stati testati gli inibitori EVP4593 e la metformina. La concentrazione di metformina utilizzata, per avvicinarci quanto più possibile alle condizioni *in vivo*, è stata 20 μM , corrispondente alla massima concentrazione della metformina misurata e tollerata in circolo dai pazienti affetti con diabete mellito di tipo II [219]. EVP4593 è un farmaco di nuova sintesi, per cui la concentrazione utilizzata (0,5 μM) deriva esclusivamente sulla base dei dati preclinici dei test 2D *in vitro* (vedi sezione 5.1).

Dalle analisi quantitative preliminari, supportate dalle rispettive immagini istologiche (**Fig.58A-C**), il trend di riduzione dell'area tumorale nei chunk trattati con EVP è netto per tutti e 4 i campioni (range di diminuzione da 8 a 2 volte del trattato con EVP rispetto

al non trattato). Il trend di riduzione è meno evidente nei chunk trattati con metformina, dove si apprezza una riduzione dell'area tumorale di 2 e 3 volte soltanto nei campioni di omento B623 e B607, rispettivamente. Un più modesto effetto della metformina potrebbe essere dovuto alla sua intrinseca minore potenza rispetto ad EVP (vedi sezione 5.1). Inoltre, la struttura idrofila della metformina rispetto ad EVP potrebbe renderne più difficile la distribuzione in un sistema 3D in cui la circolazione ematica non è riprodotta, da cui deriva la necessità di studi di biodistribuzione al fine di riprodurre nei sistemi in perfusione la disponibilità del farmaco osservata *in vivo*.

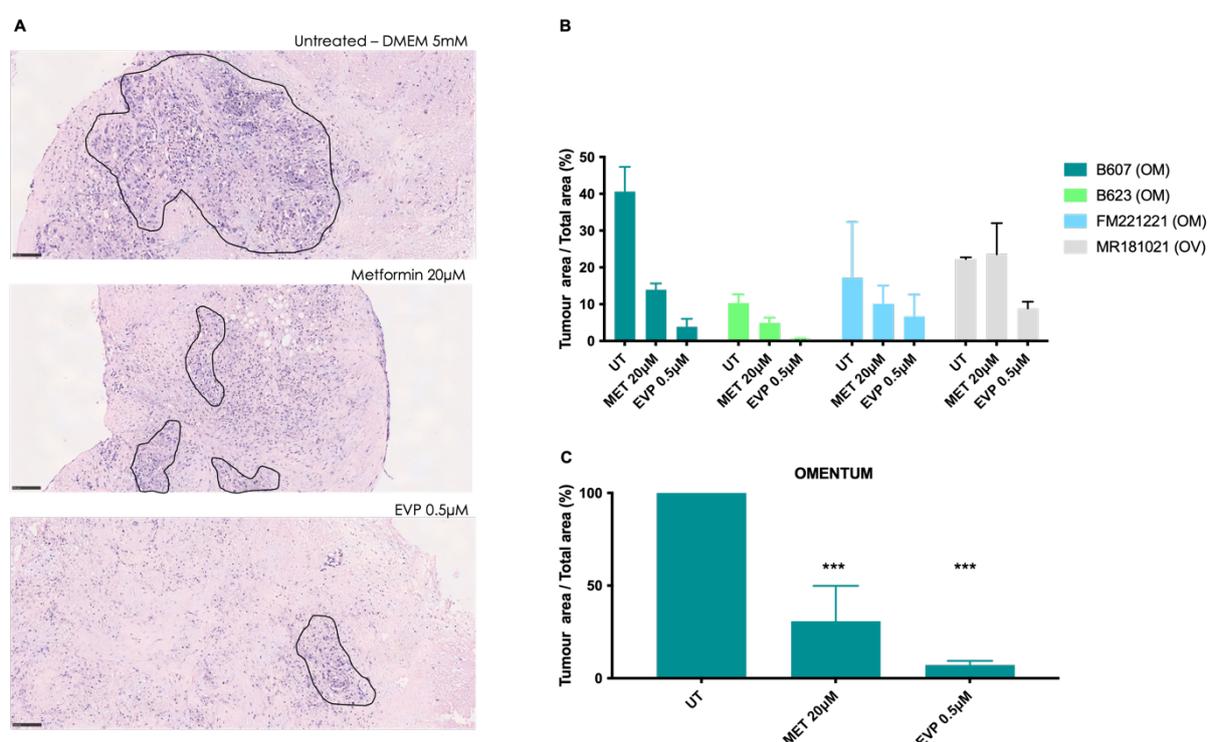


Figura 58 A) Immagini rappresentative, con colorazione H&E, di campioni di controllo (*Untreated*) sottoposti a perfusione in U-CUP per 5 giorni o con la somministrazione di Metformina 20 µM o di EVP4593 0.5 µM. Le immagini sono state acquisite con una magnificazione di 40X. Barra di scala = 100 µm. Le aree contraddistinte da una componente tumorale epiteliale sono indicate dalle linee nere. **B-C)** Quantificazione dell'area tumorale epiteliale in seguito al trattamento con inibitori del CI in U-CUP. I grafici rappresentano il rapporto fra l'area tumorale epiteliale e l'area totale del chunk determinate attraverso il software QuPath. **B)** I quattro donatori considerati, tre con campioni di metastasi di omento (OM) ed uno con un campione primario di tumore ovarico (OV) sono rappresentati individualmente. **C)** Percentuale di area tumorale normalizzata rispetto all'area del controllo non trattato (UT). I dati fanno riferimento ai valori medi dei tre donatori OM. I dati sono riportati come media + DS Statistica: one way Anova ($p^* < 0.05$)

Allo scopo di investigare se gli inibitori possano avere un effetto sulla proliferazione cellulare, è stata rilevata la positività per il Ki67. Dalle analisi quantitative, supportate

dalle rispettive immunofluorescenze (**Fig.59A-B**), nei 4 campioni considerati si osserva un trend di riduzione della percentuale delle cellule in attiva proliferazione nei chunk trattati con EVP rispetto al non trattato e, in particolare, il range di diminuzione va da 2 a 5 volte . Il trend di riduzione è meno evidente nei chunk trattati con metformina, dove si apprezza una riduzione dell'area tumorale minore di 2 volte soltanto nei campioni di omento B607, FM221221 e nell'ovaio MR181021.

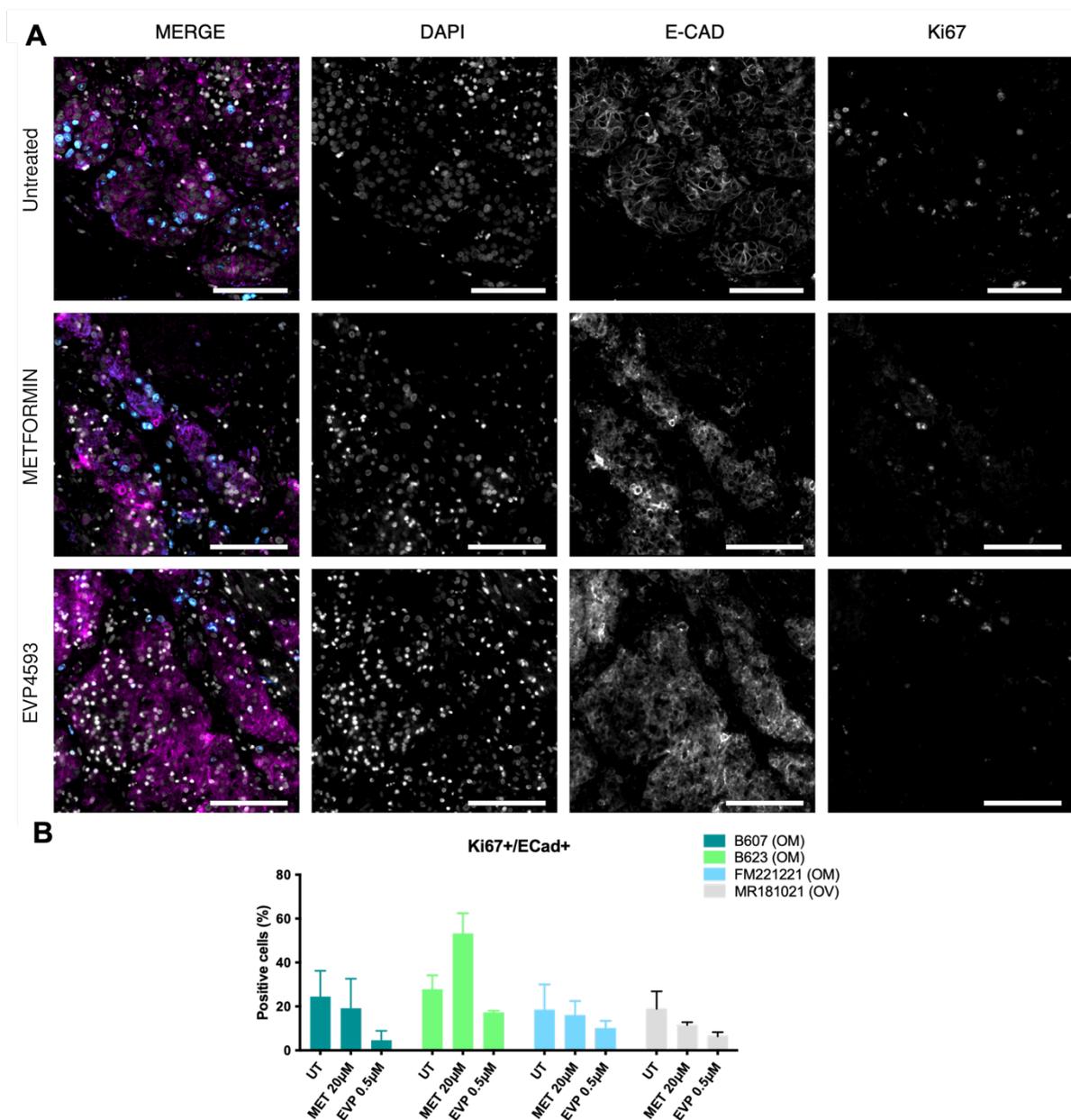


Figura 59 A) Valutazione dell'effetto degli inibitori del CI sulla proliferazione cellulare. Immagini rappresentative di microscopia a fluorescenza. Il DAPI è stato usato per marcare i nuclei cellulari, la E-cadherin (E-CAD) per marcare le cellule epiteliali tumorali, ed il Ki67 per marcare le cellule in proliferazione. Barra di scala 100 μm . **B)** Quantificazione del numero di cellule proliferanti in seguito al

trattamento con inibitori del CI in U-CUP. I grafici rappresentano la percentuale di cellule Ki67+ sul totale di cellule ECAD+ i.e. le cellule epiteliali tumorali. Le quantificazioni sono state fatte attraverso il software QuPath. I quattro donatori considerati, tre con campioni di metastasi di omento (OM) ed uno con un campione primario di tumore ovarico (OV) sono rappresentati individualmente. I dati sono riportati come media + DS.

Infine, allo scopo di investigare se gli inibitori possano indurre un effetto citotossico è stata rilevata la positività per la forma attiva della caspasi 3.

Dalle analisi quantitative, supportate dalle immunofluorescenze (**Fig.60A-B**), il trend di aumento della percentuale delle cellule apoptotiche nei chunk trattati con EVP si osserva in due campioni (range di aumento da 2 a 5 volte del trattato con EVP rispetto al non trattato). Contrariamente, il trend di aumento si osserva in un solo campione trattato con metformina (B623 - range di aumento di 2 volte del trattato con metformina rispetto al non trattato).

I dati dell'analisi *in vitro*, mostrati in questo lavoro, indicano che l'inibizione selettiva del CI mediata da EVP4593 sembra causare una riduzione della crescita delle cellule, corroborando l'idea che l'inibizione del CI causi un effetto antitumorale di tipo citostatico. Infatti, indipendentemente dal modello cellulare tumorale (ovarico - SKOV3, colonretto - HCT116 e melanoma murino - B16-F10), EVP4593, a differenza della metformina, non sembra indurre morte apoptotica attraverso l'attivazione della caspasi 3/7 in 2D, rispetto alle cellule non trattate con l'inibitore. L'utilizzo di EVP4593 in un modello 3D SF-HGSOC mostra, invece, una tendenza del tessuto epiteliale ad aumentare la propria percentuale di cellule apoptotiche. Seppur incoraggiante, saranno comunque necessarie ulteriori analisi per poter confermare e supportare questo dato.

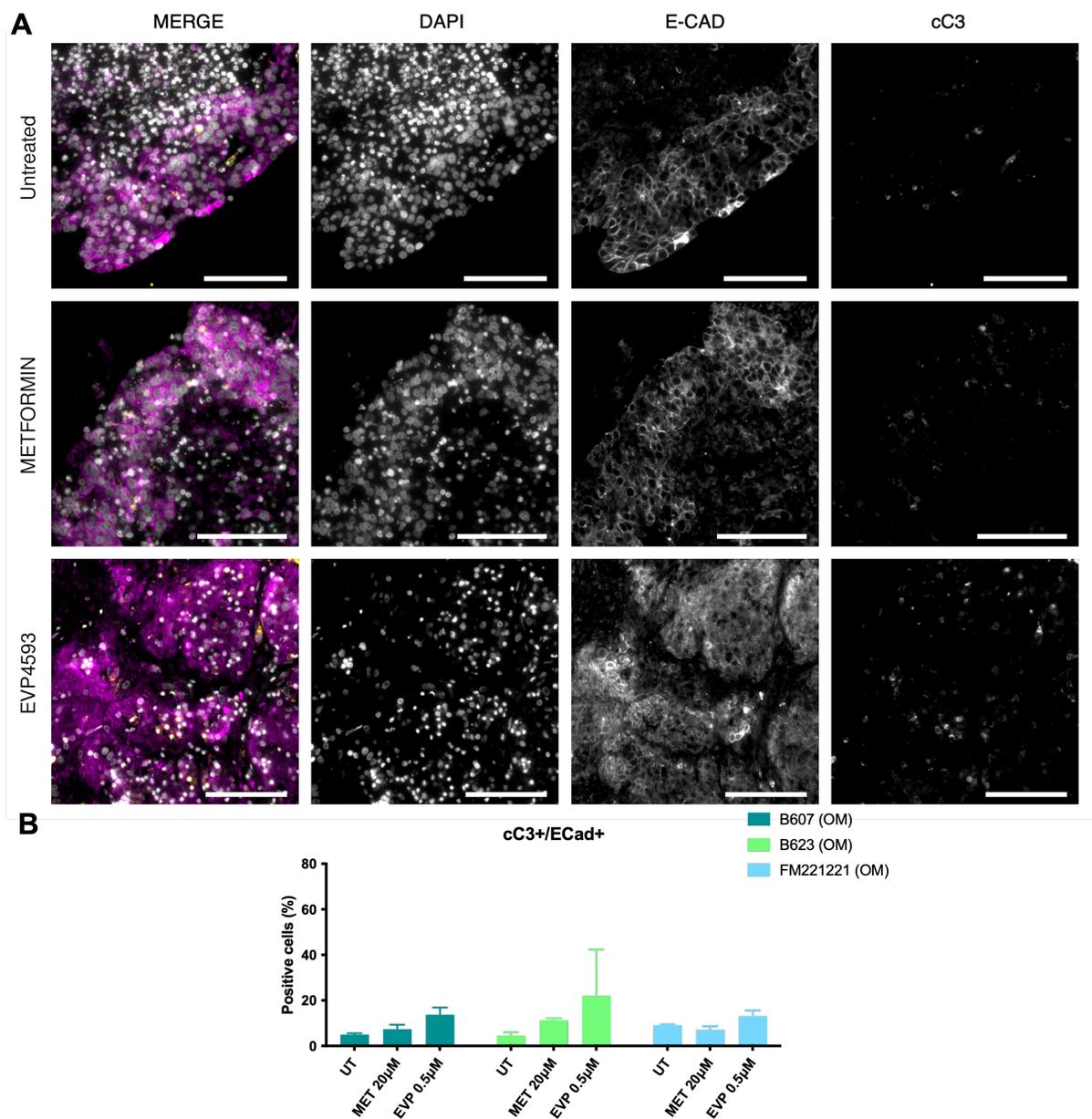


Figura 60 A) Valutazione dell'effetto degli inibitori del CI sulla citotossicità cellulare. Immagini rappresentative di microscopia a fluorescenza. Il DAPI è stato usato per marcare i nuclei cellulari, la E-cadherin (E-CAD) per marcare le cellule epiteliali tumorali, e la *cleaved Caspase 3* (cC3) per marcare le cellule apoptotiche. Barra di scala 100 μm . **B)** Quantificazione del numero di cellule apoptotiche in seguito al trattamento con inibitori del CI in U-CUP. I grafici rappresentano la percentuale di cellule cC3+ sul totale di cellule ECAD+ i.e. le cellule epiteliali tumorali. Le quantificazioni sono state fatte attraverso il software QuPath. I quattro donatori considerati, due con campioni di metastasi di omento (OM) ed uno con un campione primario di tumore ovarico (OV) sono rappresentati individualmente. I dati sono riportati come media + DS.

I dati preliminari confermano l'effetto antiproliferativo dell'inibitore specifico EVP 4593 osservato *in vitro* e *in vivo*, causando una riduzione dell'area tumorale del tumore primario e delle metastasi omentali di tessuti slow frozen di pazienti con HGSOV. Le concentrazioni utilizzate di EVP 4593 e della metformina permettono di speculare se la

loro efficacia antiproliferativa può associarsi all'inibizione specifica del CI. La concentrazione di EVP 4593 ($0.5 \mu\text{M}$) è stata scelta sulla base degli esperimenti *in vitro*; quindi, verosimilmente potrebbe inibire specificatamente l'attività del CI. L'ipotesi potrebbe essere confermata verificando se avvenga o meno l'inibizione del CI da parte del farmaco anche in un modello 3D. A differenza degli studi *in vitro*, dove è stato possibile valutare il tasso di consumo di ossigeno a specifiche concentrazioni di inibitore, in un sistema dinamico non è ancora possibile utilizzare lo stesso metodo. Il limite dal punto di vista tecnico è rappresentato dal Seahorse, uno strumento in grado di misurare il tasso di consumo di ossigeno da cellule in adesione, quindi sfruttando esclusivamente un modello 2D. Allo scopo di aggirare i limiti di esecuzione del saggio biochimico Seahorse in un modello 3D, si potrebbe ottenere una misura indiretta del blocco della respirazione mitocondriale, andando a studiare i meccanismi a valle dell'inibizione del CI, come l'attivazione della proteina AMPK.

La metformina è stata scelta come controllo dell'affidabilità del modello, essendo un farmaco in uso clinico. Gli studi *in vitro*, mostrati in questo studio, hanno rivelato l'effetto aspecifico della metformina se utilizzata nell'ordine del mM. La concentrazione utilizzata in U-CUP, essendo quella massima tollerata nel siero umano, è stata di $20 \mu\text{M}$, quindi lontana dagli intervalli di specificità osservati dagli studi *in vitro* (50mM). Infatti, verosimilmente, l'effetto antiproliferativo che si osserva nei modelli *ex vivo* di SF-HGSOC in perfusione potrebbe essere non dipendente dall'inibizione del CI. Nonostante resti ancora poco chiara la presenza e la distribuzione dei trasportatori OCTs nei tessuti tumorali, l'effetto di inibizione della respirazione nelle linee cellulari ovariche (SKOV3) in seguito al trattamento con la metformina, fa presupporre che il farmaco riesca ad entrare nelle cellule. Analogamente, i trasportatori OCTs potrebbero essere presenti nella componente epiteliale del carcinoma ovarico favorendo l'ingresso del farmaco nelle cellule. Alternativamente, la metformina potrebbe innescare altri meccanismi ancora poco conosciuti e inibire la crescita delle cellule tumorali.

L'ultima parte dello studio aveva come obiettivo quello di valutare se il modello 3D di tessuti tumorali *ex vivo* fosse utile per approfondire lo studio degli inibitori del CI. Indipendentemente dall'effetto biologico degli inibitori del CI, in termini di

proliferazione della componente epiteliale, l'utilizzo del modello 3D di tessuti tumorali *ex vivo* in perfusione è promettente per approfondire lo studio dei farmaci. La perfusione continua del campione aumenta la disponibilità dei componenti del terreno di coltura ai tessuti, come le sostanze nutritive, migliora l'apporto di ossigeno e la rimozione di CO₂, nonché la somministrazione del farmaco alle cellule tumorali. Lo screening di nuovi composti antitumorali impone di valutare la loro capacità di colpire la proliferazione delle cellule tumorali in un sistema biologico più vicino alla realtà *in vivo*. Le interazioni cellula-cellula in un modello più fedele al microambiente tumorale della realtà *in vivo* influenzano la sensibilità ai farmaci e ciò è stato dimostrato, ad esempio, nel caso di co-culture di sferoidi tumorali con cellule stromali sottoposte a test terapeutici [220]. Il modello qui descritto ha permesso, per la prima volta, di sfruttare i vantaggi della coltura basata sulla perfusione con l'obiettivo di generare un modello fedele di HGSOc a partire da tessuto congelato. Uno dei vantaggi dell'utilizzo del tessuto congelato è quello di riuscire ad approfondire i meccanismi responsabili della sensibilità di un particolare tumore a un trattamento innovativo, indipendentemente dal momento del prelievo e dal luogo di raccolta del campione.

Nel complesso, il modello 3D di SF-HGSOc *ex vivo* basato sulla perfusione è risultato essere uno strumento innovativo ed utile per proseguire ed approfondire lo studio di nuovi inibitori del CI.

6. CONCLUSIONI

L'importanza dell'OXPLOS nella progressione tumorale rende promettente l'esplorazione di strategie antitumorali mirate all'inibizione della respirazione mitocondriale. In questo contesto, il CI è oggi un bersaglio elettivo, grazie ai suoi molteplici ruoli quali il mantenimento dell'omeostasi redox, del metabolismo dell'aspartato e l'adattamento all'ipossia delle cellule tumorali [36,56]. Alle soglie di una rivoluzione nella terapia oncologica antimetabolica, diversi inibitori del CI si sono rivelati efficaci come agenti antitumorali [95,221], e hanno mostrato una tossicità selettiva contro le cellule resistenti all'ablazione degli oncogeni [222] e le cellule staminali del cancro [223]. Altri inibitori del CI sono in fase di sviluppo (i.e. AG311)

[224], mentre altri sono attualmente in fase di valutazione clinica (i.e. IACS – 010759) [92].

I risultati scaturiti da questo studio sottolineano l'importanza di sviscerare le questioni di specificità verso il CI, per evitare effetti collaterali che saranno inevitabili con un bersaglio così ubiquitario e fondamentale, ed anche le questioni di adattamento. Ad esempio, alla luce dei risultati ottenuti in questo studio, le concentrazioni della metformina solitamente utilizzate non abbattano la respirazione massima, motivo per cui gli effetti antiproliferativi osservati non possono essere associati esclusivamente all'inibizione del CI. Questo potrebbe spiegare i dati contrastanti ottenuti negli studi clinici sull'uso della metformina come farmaco antitumorale per diverse neoplasie [130,131,141–146].

La necessità di approfondire lo studio degli inibitori del CI nasce non solo perché questi farmaci saranno di largo utilizzo, ma anche perché molti oncogeni ed oncosoppressori regolano la riprogrammazione metabolica (i.e. *TP53*, *RAS*, *MYC*, *BRAF*). L'identificazione dei meccanismi adattativi all'inibizione del CI in base allo stato genetico di oncogeni e/o oncosoppressori, come quello investigato in questo lavoro (**Fig.61**), permetterebbe di prevenirli oppure di indirizzare le scelte terapeutiche in medicina di precisione. Questo approccio candiderebbe gli inibitori del CI ad essere utilizzati in terapie nell'ambito del trattamento oncologico. Un limite di questo studio è l'utilizzo degli inibitori come monoterapie, sebbene ci siano evidenze dell'effetto sinergico che possono avere quando sono identificati i meccanismi di adattamento [183].

In questo contesto, vista l'elevata eterogeneità metabolica dei tumori umani, poter testare la risposta ad un farmaco anti metabolico prima di prescriverlo rappresenta un vantaggio unico. Lo sviluppo di modelli tumorali preclinici a partire da campionamenti in estemporanea o post-chirurgia up front (al momento del trattamento primario), ottimizzato in questa tesi, offre tale vantaggio e facilita l'introduzione nella clinica di questa nuova classe di farmaci.

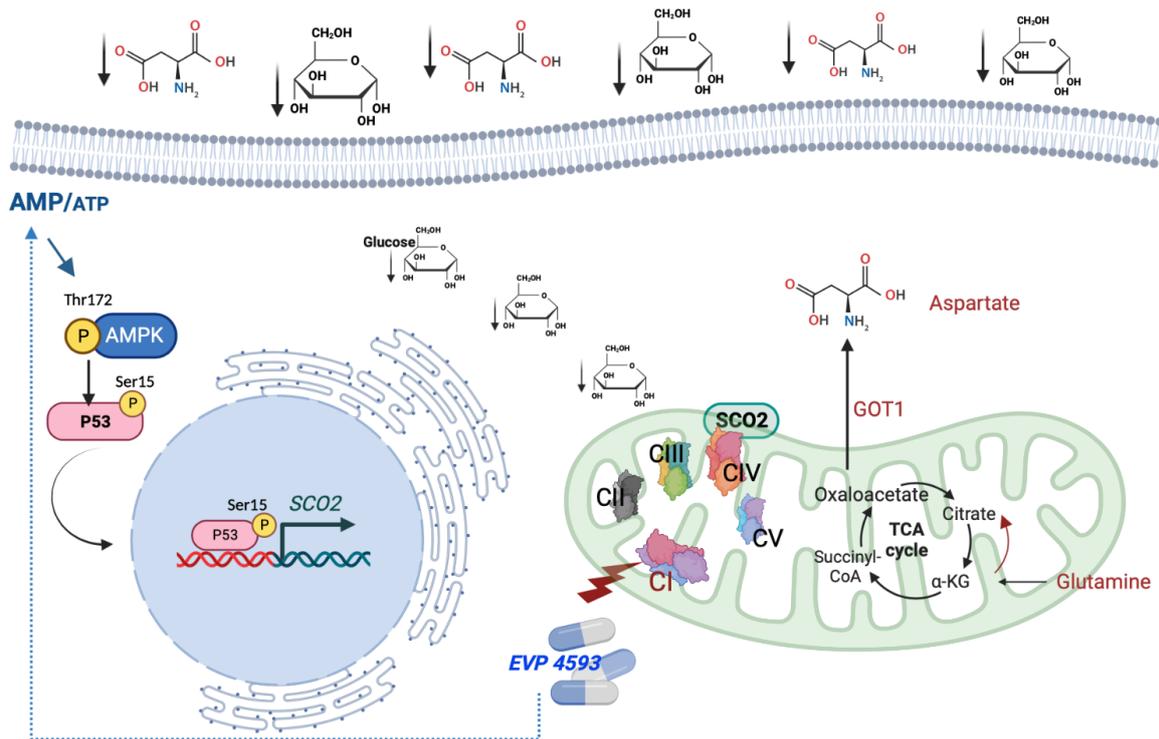


Figura 61 Rappresentazione schematica del ruolo svolto da p53 wild type nell'adattamento metabolico in condizioni di danno funzionale al CI e dalla carenza di glucosio.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
2. Phan, L.M.; Yeung, S.-C.J.; Lee, M.-H. Cancer Metabolic Reprogramming: Importance, Main Features, and Potentials for Precise Targeted Anti-Cancer Therapies. *Cancer Biol Med* **2014**, *11*, 1–19, doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
4. Koppenol, W.H.; Bounds, P.L.; Dang, C.V. Otto Warburg's Contributions to Current Concepts of Cancer Metabolism. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 325–337, doi:10.1038/nrc3038.
5. Deberardinis, R.J.; Sayed, N.; Ditsworth, D.; Thompson, C.B. Brick by Brick: Metabolism and Tumor Cell Growth. *Curr Opin Genet Dev* **2008**, *18*, 54–61, doi:10.1016/j.gde.2008.02.003.
6. Jones, R.G.; Thompson, C.B. Tumor Suppressors and Cell Metabolism: A Recipe for Cancer Growth. *Genes Dev* **2009**, *23*, 537–548, doi:10.1101/gad.1756509.
7. Ghanavat, M.; Shahrouzian, M.; Deris Zayeri, Z.; Banihashemi, S.; Kazemi, S.M.; Saki, N. Digging Deeper through Glucose Metabolism and Its Regulators in Cancer and Metastasis. *Life Sci* **2021**, *264*, 118603, doi:10.1016/j.lfs.2020.118603.
8. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314, doi:10.1126/science.123.3191.309.
9. Moldogazieva, N.T.; Mokhosoev, I.M.; Terentiev, A.A. Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, E862, doi:10.3390/cancers12040862.
10. Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E. Energy Metabolism in Tumor Cells. *FEBS J* **2007**, *274*, 1393–1418, doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.
11. Zong, W.-X.; Rabinowitz, J.D.; White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell* **2016**, *61*, 667–676, doi:10.1016/j.molcel.2016.02.011.
12. Smolková, K.; Plecítá-Hlavatá, L.; Bellance, N.; Benard, G.; Rossignol, R.; Ježek, P. Waves of Gene Regulation Suppress and Then Restore Oxidative Phosphorylation in Cancer Cells. *Int J Biochem Cell Biol* **2011**, *43*, 950–968, doi:10.1016/j.biocel.2010.05.003.
13. Halazonetis, T.D.; Gorgoulis, V.G.; Bartek, J. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* **2008**, *319*, 1352–1355, doi:10.1126/science.1140735.
14. Abbaszadeh, Z.; Çeşmeli, S.; Biray Avcı, Ç. Crucial Players in Glycolysis: Cancer Progress. *Gene* **2020**, *726*, 144158, doi:10.1016/j.gene.2019.144158.
15. Park, J.H.; Pyun, W.Y.; Park, H.W. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells* **2020**, *9*, E2308, doi:10.3390/cells9102308.
16. Gomes, A.S.; Ramos, H.; Soares, J.; Saraiva, L. P53 and Glucose Metabolism: An Orchestra to Be Directed in Cancer Therapy. *Pharmacol Res* **2018**, *131*, 75–86, doi:10.1016/j.phrs.2018.03.015.

17. Shaw, R.J.; Cantley, L.C. Ras, PI(3)K and MTOR Signalling Controls Tumour Cell Growth. *Nature* **2006**, *441*, 424–430, doi:10.1038/nature04869.
18. Li, Y.; Sun, X.-X.; Qian, D.Z.; Dai, M.-S. Molecular Crosstalk Between MYC and HIF in Cancer. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 590576, doi:10.3389/fcell.2020.590576.
19. Zhou, C.-H.; Zhang, X.-P.; Liu, F.; Wang, W. Modeling the Interplay between the HIF-1 and P53 Pathways in Hypoxia. *Sci Rep* **2015**, *5*, 13834, doi:10.1038/srep13834.
20. Lásche, M.; Emons, G.; Gründker, C. Shedding New Light on Cancer Metabolism: A Metabolic Tightrope Between Life and Death. *Front Oncol* **2020**, *10*, 409, doi:10.3389/fonc.2020.00409.
21. Nagao, A.; Kobayashi, M.; Koyasu, S.; Chow, C.C.T.; Harada, H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, E238, doi:10.3390/ijms20020238.
22. Tello, D.; Balsa, E.; Acosta-Iborra, B.; Fuertes-Yebra, E.; Elorza, A.; Ordóñez, Á.; Corral-Escariz, M.; Soro, I.; López-Bernardo, E.; Perales-Clemente, E.; et al. Induction of the Mitochondrial NDUFA4L2 Protein by HIF-1 α Decreases Oxygen Consumption by Inhibiting Complex I Activity. *Cell Metab* **2011**, *14*, 768–779, doi:10.1016/j.cmet.2011.10.008.
23. Pereira, L.; Soares, P.; Máximo, V.; Samuels, D.C. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Cancer Escape Purifying Selection and High Pathogenicity Mutations Lead to the Oncocytic Phenotype: Pathogenicity Analysis of Reported Somatic MtDNA Mutations in Tumors. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 53, doi:10.1186/1471-2407-12-53.
24. Ohta, S. Contribution of Somatic Mutations in the Mitochondrial Genome to the Development of Cancer and Tolerance against Anticancer Drugs. *Oncogene* **2006**, *25*, 4768–4776, doi:10.1038/sj.onc.1209602.
25. Formosa, L.E.; Dibley, M.G.; Stroud, D.A.; Ryan, M.T. Building a Complex Complex: Assembly of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Semin Cell Dev Biol* **2018**, *76*, 154–162, doi:10.1016/j.semcdb.2017.08.011.
26. Roestenberg, P.; Manjeri, G.R.; Valsecchi, F.; Smeitink, J.A.M.; Willems, P.H.G.M.; Koopman, W.J.H. Pharmacological Targeting of Mitochondrial Complex I Deficiency: The Cellular Level and Beyond. *Mitochondrion* **2012**, *12*, 57–65, doi:10.1016/j.mito.2011.06.011.
27. Chung, I.; Wright, J.J.; Bridges, H.R.; Ivanov, B.S.; Biner, O.; Pereira, C.S.; Arantes, G.M.; Hirst, J. Cryo-EM Structures Define Ubiquinone-10 Binding to Mitochondrial Complex I and Conformational Transitions Accompanying Q-Site Occupancy. *Nat Commun* **2022**, *13*, 2758, doi:10.1038/s41467-022-30506-1.
28. Gasparre, G.; Kurelac, I.; Capristo, M.; Iommarini, L.; Ghelli, A.; Ceccarelli, C.; Nicoletti, G.; Nanni, P.; De Giovanni, C.; Scotlandi, K.; et al. A Mutation Threshold Distinguishes the Antitumorigenic Effects of the Mitochondrial Gene MTND1, an Oncojanus Function. *Cancer Research* **2011**, *71*, 6220–6229, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1042.
29. Achilli, A.; Iommarini, L.; Olivieri, A.; Pala, M.; Hooshiar Kashani, B.; Reynier, P.; La Morgia, C.; Valentino, M.L.; Liguori, R.; Pizza, F.; et al. Rare Primary Mitochondrial DNA Mutations and Probable Synergistic Variants in Leber's

- Hereditary Optic Neuropathy. *PLoS One* **2012**, *7*, e42242, doi:10.1371/journal.pone.0042242.
30. Iommarini, L.; Calvaruso, M.A.; Kurelac, I.; Gasparre, G.; Porcelli, A.M. Complex I Impairment in Mitochondrial Diseases and Cancer: Parallel Roads Leading to Different Outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2013**, *45*, 47–63, doi:10.1016/j.biocel.2012.05.016.
 31. Rossignol, R.; Faustin, B.; Rocher, C.; Malgat, M.; Mazat, J.-P.; Letellier, T. Mitochondrial Threshold Effects. *Biochem J* **2003**, *370*, 751–762, doi:10.1042/BJ20021594.
 32. Garcia-Bermudez, J.; Baudrier, L.; La, K.; Zhu, X.G.; Fidelin, J.; Sviderskiy, V.O.; Papagiannakopoulos, T.; Molina, H.; Snuderl, M.; Lewis, C.A.; et al. Aspartate Is a Limiting Metabolite for Cancer Cell Proliferation under Hypoxia and in Tumors. *Nat Cell Biol* **2018**, *20*, 775–781, doi:10.1038/s41556-018-0118-z.
 33. Sharma, L.K.; Fang, H.; Liu, J.; Vartak, R.; Deng, J.; Bai, Y. Mitochondrial Respiratory Complex I Dysfunction Promotes Tumorigenesis through ROS Alteration and AKT Activation. *Hum Mol Genet* **2011**, *20*, 4605–4616, doi:10.1093/hmg/ddr395.
 34. Park, J.S.; Sharma, L.K.; Li, H.; Xiang, R.; Holstein, D.; Wu, J.; Lechleiter, J.; Naylor, S.L.; Deng, J.J.; Lu, J.; et al. A Heteroplasmic, Not Homoplasmic, Mitochondrial DNA Mutation Promotes Tumorigenesis via Alteration in Reactive Oxygen Species Generation and Apoptosis. *Hum Mol Genet* **2009**, *18*, 1578–1589, doi:10.1093/hmg/ddp069.
 35. Porcelli, A.M.; Ghelli, A.; Ceccarelli, C.; Lang, M.; Cenacchi, G.; Capristo, M.; Pennisi, L.F.; Morra, I.; Ciccarelli, E.; Melcarne, A.; et al. The Genetic and Metabolic Signature of Oncocytic Transformation Implicates HIF1alpha Destabilization. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 1019–1032, doi:10.1093/hmg/ddp566.
 36. Calabrese, C.; Iommarini, L.; Kurelac, I.; Calvaruso, M.A.; Capristo, M.; Lollini, P.-L.; Nanni, P.; Bergamini, C.; Nicoletti, G.; Giovanni, C.D.; et al. Respiratory Complex I Is Essential to Induce a Warburg Profile in Mitochondria-Defective Tumor Cells. *Cancer Metab* **2013**, *1*, 11, doi:10.1186/2049-3002-1-11.
 37. Bunik, V.I.; Buneeva, O.A.; Gomazkova, V.S. Change in Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Cooperative Properties Due to Dihydrolipoate and NADH. *FEBS Lett* **1990**, *269*, 252–254, doi:10.1016/0014-5793(90)81166-l.
 38. Selak, M.A.; Armour, S.M.; MacKenzie, E.D.; Boulahbel, H.; Watson, D.G.; Mansfield, K.D.; Pan, Y.; Simon, M.C.; Thompson, C.B.; Gottlieb, E. Succinate Links TCA Cycle Dysfunction to Oncogenesis by Inhibiting HIF-Alpha Prolyl Hydroxylase. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 77–85, doi:10.1016/j.ccr.2004.11.022.
 39. Mckenzie, M.; Ryan, M.T. Assembly Factors of Human Mitochondrial Complex I and Their Defects in Disease. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 497–502, doi:10.1002/iub.335.
 40. Gasparre, G.; Romeo, G.; Rugolo, M.; Porcelli, A.M. Learning from Oncocytic Tumors: Why Choose Inefficient Mitochondria? *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1807*, 633–642, doi:10.1016/j.bbabi.2010.08.006.
 41. King, M.P.; Attardi, G. Human Cells Lacking MtDNA: Repopulation with Exogenous Mitochondria by Complementation. *Science* **1989**, *246*, 500–503, doi:10.1126/science.2814477.

42. Harris, M. Pyruvate Blocks Expression of Sensitivity to Antimycin A and Chloramphenicol. *Somatic Cell Genet* **1980**, *6*, 699–708, doi:10.1007/BF01538969.
43. Howell, N.; Sager, R. Cytoplasmic Genetics of Mammalian Cells: Conditional Sensitivity to Mitochondrial Inhibitors and Isolation of New Mutant Phenotypes. *Somatic Cell Genet* **1979**, *5*, 833–845, doi:10.1007/BF01542645.
44. Sullivan, L.B.; Gui, D.Y.; Hosios, A.M.; Bush, L.N.; Freinkman, E.; Vander Heiden, M.G. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* **2015**, *162*, 552–563, doi:10.1016/j.cell.2015.07.017.
45. Iommarini, L.; Kurelac, I.; Capristo, M.; Calvaruso, M.A.; Giorgio, V.; Bergamini, C.; Ghelli, A.; Nanni, P.; De Giovanni, C.; Carelli, V.; et al. Different MtDNA Mutations Modify Tumor Progression in Dependence of the Degree of Respiratory Complex I Impairment. *Hum Mol Genet* **2014**, *23*, 1453–1466, doi:10.1093/hmg/ddt533.
46. Zhao, H.; Swanson, K.D.; Zheng, B. Therapeutic Repurposing of Biguanides in Cancer. *Trends Cancer* **2021**, *7*, 714–730, doi:10.1016/j.trecan.2021.03.001.
47. Herzig, S.; Shaw, R.J. AMPK: Guardian of Metabolism and Mitochondrial Homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19*, 121–135, doi:10.1038/nrm.2017.95.
48. Lei, Y.; Yi, Y.; Liu, Y.; Liu, X.; Keller, E.T.; Qian, C.-N.; Zhang, J.; Lu, Y. Metformin Targets Multiple Signaling Pathways in Cancer. *Chin J Cancer* **2017**, *36*, 17, doi:10.1186/s40880-017-0184-9.
49. Lu, C.-C.; Chiang, J.-H.; Tsai, F.-J.; Hsu, Y.-M.; Juan, Y.-N.; Yang, J.-S.; Chiu, H.-Y. Metformin Triggers the Intrinsic Apoptotic Response in Human AGS Gastric Adenocarcinoma Cells by Activating AMPK and Suppressing MTOR/AKT Signaling. *Int J Oncol* **2019**, *54*, 1271–1281, doi:10.3892/ijo.2019.4704.
50. Gwinn, D.M.; Shackelford, D.B.; Egan, D.F.; Mihaylova, M.M.; Mery, A.; Vasquez, D.S.; Turk, B.E.; Shaw, R.J. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol Cell* **2008**, *30*, 214–226, doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003.
51. Inoki, K.; Zhu, T.; Guan, K.-L. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* **2003**, *115*, 577–590, doi:10.1016/s0092-8674(03)00929-2.
52. The Oncojanus Paradigm of Respiratory Complex I - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29735924/> (accessed on 4 October 2022).
53. Iorio, M.; Umesh Ganesh, N.; De Luise, M.; Porcelli, A.M.; Gasparre, G.; Kurelac, I. The Neglected Liaison: Targeting Cancer Cell Metabolic Reprogramming Modifies the Composition of Non-Malignant Populations of the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13215447.
54. Aroldi, F.; Lord, S.R. Window of Opportunity Clinical Trial Designs to Study Cancer Metabolism. *Br J Cancer* **2020**, *122*, 45–51, doi:10.1038/s41416-019-0621-4.
55. Sukjoi, W.; Ngamkham, J.; Attwood, P.V.; Jitrapakdee, S. Targeting Cancer Metabolism and Current Anti-Cancer Drugs. *Adv Exp Med Biol* **2021**, *1286*, 15–48, doi:10.1007/978-3-030-55035-6_2.
56. Wheaton, W.W.; Weinberg, S.E.; Hamanaka, R.B.; Soberanes, S.; Sullivan, L.B.; Anso, E.; Glasauer, A.; Dufour, E.; Mutlu, G.M.; Budigner, G.S.; et al. Metformin

- Inhibits Mitochondrial Complex I of Cancer Cells to Reduce Tumorigenesis. *Elife* **2014**, *3*, e02242, doi:10.7554/eLife.02242.
57. Metabolic Determinants of Cancer Cell Sensitivity to Glucose Limitation and Biguanides | Nature Available online: <https://www.nature.com/articles/nature13110> (accessed on 6 February 2023).
 58. Pernicova, I.; Korbonits, M. Metformin--Mode of Action and Clinical Implications for Diabetes and Cancer. *Nat Rev Endocrinol* **2014**, *10*, 143–156, doi:10.1038/nrendo.2013.256.
 59. El-Mir, M.Y.; Nogueira, V.; Fontaine, E.; Avéret, N.; Rigoulet, M.; Leverve, X. Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 223–228, doi:10.1074/jbc.275.1.223.
 60. Scotland, S.; Saland, E.; Skuli, N.; de Toni, F.; Boutzen, H.; Micklow, E.; Sénégas, I.; Peyraud, R.; Peyriga, L.; Théodoro, F.; et al. Mitochondrial Energetic and AKT Status Mediate Metabolic Effects and Apoptosis of Metformin in Human Leukemic Cells. *Leukemia* **2013**, *27*, 2129–2138, doi:10.1038/leu.2013.107.
 61. Lonardo, E.; Cioffi, M.; Sancho, P.; Sanchez-Ripoll, Y.; Trabulo, S.M.; Dorado, J.; Balic, A.; Hidalgo, M.; Heeschen, C. Metformin Targets the Metabolic Achilles Heel of Human Pancreatic Cancer Stem Cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e76518, doi:10.1371/journal.pone.0076518.
 62. Ve, Z.; A, D.P.; H, M.; Td, M.; S, S.; J, S.; R, G.; S, C.; P, Z.; M, M.; et al. Reprogramming Metabolism with Metformin Improves Tumor Oxygenation and Radiotherapy Response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2013**, *19*, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1787.
 63. Deng, J.; Peng, M.; Wang, Z.; Zhou, S.; Xiao, D.; Deng, J.; Yang, X.; Peng, J.; Yang, X. Novel Application of Metformin Combined with Targeted Drugs on Anticancer Treatment. *Cancer Sci* **2019**, *110*, 23–30, doi:10.1111/cas.13849.
 64. Ashton, T.M.; McKenna, W.G.; Kunz-Schughart, L.A.; Higgins, G.S. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 2482–2490, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3070.
 65. Graham, G.G.; Punt, J.; Arora, M.; Day, R.O.; Doogue, M.P.; Duong, J.K.; Furlong, T.J.; Greenfield, J.R.; Greenup, L.C.; Kirkpatrick, C.M.; et al. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet* **2011**, *50*, 81–98, doi:10.2165/11534750-000000000-00000.
 66. Gormsen, L.C.; Sundelin, E.I.; Jensen, J.B.; Vendelbo, M.H.; Jakobsen, S.; Munk, O.L.; Hougaard Christensen, M.M.; Brøsen, K.; Frøkiær, J.; Jessen, N. In Vivo Imaging of Human ¹¹C-Metformin in Peripheral Organs: Dosimetry, Biodistribution, and Kinetic Analyses. *J Nucl Med* **2016**, *57*, 1920–1926, doi:10.2967/jnumed.116.177774.
 67. Vial, G.; Demaille, D.; Guigas, B. Role of Mitochondria in the Mechanism(s) of Action of Metformin. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2019**, *10*, 294, doi:10.3389/fendo.2019.00294.
 68. Shackelford, D.B.; Abt, E.; Gerken, L.; Vasquez, D.S.; Seki, A.; Leblanc, M.; Wei, L.; Fishbein, M.C.; Czernin, J.; Mischel, P.S.; et al. LKB1 Inactivation Dictates Therapeutic Response of Non-Small Cell Lung Cancer to the Metabolism Drug Phenformin. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 143–158, doi:10.1016/j.ccr.2012.12.008.

69. Yuan, P.; Ito, K.; Perez-Lorenzo, R.; Del Guzzo, C.; Lee, J.H.; Shen, C.-H.; Bosenberg, M.W.; McMahon, M.; Cantley, L.C.; Zheng, B. Phenformin Enhances the Therapeutic Benefit of BRAF(V600E) Inhibition in Melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 18226–18231, doi:10.1073/pnas.1317577110.
70. Important Role of the LKB1–AMPK Pathway in Suppressing Tumorigenesis in PTEN-Deficient Mice | Biochemical Journal | Portland Press Available online: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/412/2/211/44869/Important-role-of-the-LKB1-AMPK-pathway-in?redirectedFrom=fulltext> (accessed on 6 February 2023).
71. Phenformin, But Not Metformin, Delays Development of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma via Cell-Autonomous AMPK Activation - PMC Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6484776/> (accessed on 6 February 2023).
72. M, D.; J, J.; K, B.-M. A Comparative Study of the Lipophilicity of Metformin and Phenformin. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26216613.
73. Vasan, K.; Werner, M.; Chandel, N.S. Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metab* **2020**, *32*, 341–352, doi:10.1016/j.cmet.2020.06.019.
74. Madera, D.; Vitale-Cross, L.; Martin, D.; Schneider, A.; Molinolo, A.A.; Gangane, N.; Carey, T.E.; McHugh, J.B.; Komarck, C.M.; Walline, H.M.; et al. Prevention of Tumor Growth Driven by PIK3CA and HPV Oncogenes by Targeting MTOR Signaling with Metformin in Oral Squamous Carcinomas Expressing OCT3. *Cancer Prev Res (Phila)* **2015**, *8*, 197–207, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0348.
75. Appleyard, M.V.C.L.; Murray, K.E.; Coates, P.J.; Wullschleger, S.; Bray, S.E.; Kernohan, N.M.; Fleming, S.; Alessi, D.R.; Thompson, A.M. Phenformin as Prophylaxis and Therapy in Breast Cancer Xenografts. *Br J Cancer* **2012**, *106*, 1117–1122, doi:10.1038/bjc.2012.56.
76. Metformin: Historical Overview | SpringerLink Available online: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-017-4318-z> (accessed on 6 February 2023).
77. Kalender, A.; Selvaraj, A.; Kim, S.Y.; Gulati, P.; Brûlé, S.; Viollet, B.; Kemp, B.E.; Bardeesy, N.; Dennis, P.; Schlager, J.J.; et al. Metformin, Independent of AMPK, Inhibits MTORC1 in a Rag GTPase-Dependent Manner. *Cell Metab* **2010**, *11*, 390–401, doi:10.1016/j.cmet.2010.03.014.
78. Gui, D.Y.; Sullivan, L.B.; Luengo, A.; Hosios, A.M.; Bush, L.N.; Gitego, N.; Davidson, S.M.; Freinkman, E.; Thomas, C.J.; Vander Heiden, M.G. Environment Dictates Dependence on Mitochondrial Complex I for NAD⁺ and Aspartate Production and Determines Cancer Cell Sensitivity to Metformin. *Cell Metab* **2016**, *24*, 716–727, doi:10.1016/j.cmet.2016.09.006.
79. Zhou, X.; Chen, J.; Yi, G.; Deng, M.; Liu, H.; Liang, M.; Shi, B.; Fu, X.; Chen, Y.; Chen, L.; et al. Metformin Suppresses Hypoxia-Induced Stabilization of HIF-1 α through Reprogramming of Oxygen Metabolism in Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 873–884, doi:10.18632/oncotarget.6418.
80. Ismaiel, A.A.K.; Espinosa-Oliva, A.M.; Santiago, M.; García-Quintanilla, A.; Oliva-Martín, M.J.; Herrera, A.J.; Venero, J.L.; de Pablos, R.M. Metformin, besides

- Exhibiting Strong in Vivo Anti-Inflammatory Properties, Increases Mptp-Induced Damage to the Nigrostriatal Dopaminergic System. *Toxicol Appl Pharmacol* **2016**, *298*, 19–30, doi:10.1016/j.taap.2016.03.004.
81. Mummidi, S.; Das, N.A.; Carpenter, A.J.; Kandikattu, H.; Krenz, M.; Siebenlist, U.; Valente, A.J.; Chandrasekar, B. Metformin Inhibits Aldosterone-Induced Cardiac Fibroblast Activation, Migration and Proliferation in Vitro, and Reverses Aldosterone+salt-Induced Cardiac Fibrosis in Vivo. *J Mol Cell Cardiol* **2016**, *98*, 95–102, doi:10.1016/j.yjmcc.2016.07.006.
 82. Wang, C.; Liu, C.; Gao, K.; Zhao, H.; Zhou, Z.; Shen, Z.; Guo, Y.; Li, Z.; Yao, T.; Mei, X. Metformin Preconditioning Provide Neuroprotection through Enhancement of Autophagy and Suppression of Inflammation and Apoptosis after Spinal Cord Injury. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *477*, 534–540, doi:10.1016/j.bbrc.2016.05.148.
 83. Vancura, A.; Bu, P.; Bhagwat, M.; Zeng, J.; Vancurova, I. Metformin as an Anticancer Agent. *Trends Pharmacol Sci* **2018**, *39*, 867–878, doi:10.1016/j.tips.2018.07.006.
 84. Mallik, R.; Chowdhury, T.A. Metformin in Cancer. *Diabetes Res Clin Pract* **2018**, *143*, 409–419, doi:10.1016/j.diabres.2018.05.023.
 85. Faubert, B.; Boily, G.; Izreig, S.; Griss, T.; Samborska, B.; Dong, Z.; Dupuy, F.; Chambers, C.; Fuerth, B.J.; Viollet, B.; et al. AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth in Vivo. *Cell Metab* **2013**, *17*, 113–124, doi:10.1016/j.cmet.2012.12.001.
 86. Gong, J.; Kelekar, G.; Shen, J.; Shen, J.; Kaur, S.; Mita, M. The Expanding Role of Metformin in Cancer: An Update on Antitumor Mechanisms and Clinical Development. *Target Oncol* **2016**, *11*, 447–467, doi:10.1007/s11523-016-0423-z.
 87. Chandel, N.S.; Avizonis, D.; Reczek, C.R.; Weinberg, S.E.; Menz, S.; Neuhaus, R.; Christian, S.; Haegebarth, A.; Algire, C.; Pollak, M. Are Metformin Doses Used in Murine Cancer Models Clinically Relevant? *Cell Metab* **2016**, *23*, 569–570, doi:10.1016/j.cmet.2016.03.010.
 88. Elgendy, M.; Cirò, M.; Hosseini, A.; Weiszmann, J.; Mazzarella, L.; Ferrari, E.; Cazzoli, R.; Curigliano, G.; DeCensi, A.; Bonanni, B.; et al. Combination of Hypoglycemia and Metformin Impairs Tumor Metabolic Plasticity and Growth by Modulating the PP2A-GSK3 β -MCL-1 Axis. *Cancer Cell* **2019**, doi:10.1016/j.ccell.2019.03.007.
 89. Orecchioni, S.; Reggiani, F.; Talarico, G.; Mancuso, P.; Calleri, A.; Gregato, G.; Labanca, V.; Noonan, D.M.; Dallaglio, K.; Albini, A.; et al. The Biguanides Metformin and Phenformin Inhibit Angiogenesis, Local and Metastatic Growth of Breast Cancer by Targeting Both Neoplastic and Microenvironment Cells. *International Journal of Cancer* **2015**, *136*, E534–E544, doi:10.1002/ijc.29193.
 90. Kurelac, I.; Umesh Ganesh, N.; Iorio, M.; Porcelli, A.M.; Gasparre, G. The Multifaceted Effects of Metformin on Tumor Microenvironment. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2019**, doi:10.1016/j.semcdb.2019.05.010.
 91. Kunisada, Y.; Eikawa, S.; Tomonobu, N.; Domae, S.; Uehara, T.; Hori, S.; Furusawa, Y.; Hase, K.; Sasaki, A.; Udono, H. Attenuation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment by Metformin, a Type 2

- Diabetes Drug. *eBioMedicine* **2017**, *25*, 154–164, doi:10.1016/j.ebiom.2017.10.009.
92. Molina, J.R.; Sun, Y.; Protopopova, M.; Gera, S.; Bandi, M.; Bristow, C.; McAfoos, T.; Morlacchi, P.; Ackroyd, J.; Agip, A.-N.A.; et al. An Inhibitor of Oxidative Phosphorylation Exploits Cancer Vulnerability. *Nat Med* **2018**, *24*, 1036–1046, doi:10.1038/s41591-018-0052-4.
 93. Luna Yolba, R.; Visentin, V.; Hervé, C.; Chiche, J.; Ricci, J.; Méneyrol, J.; Paillasse, M.R.; Alet, N. EVT-701 Is a Novel Selective and Safe Mitochondrial Complex 1 Inhibitor with Potent Anti-tumor Activity in Models of Solid Cancers. *Pharmacol Res Perspect* **2021**, *9*, e00854, doi:10.1002/prp2.854.
 94. Ellinghaus, P.; Heisler, I.; Unterschemmann, K.; Haerter, M.; Beck, H.; Greschat, S.; Ehrmann, A.; Summer, H.; Flamme, I.; Oehme, F.; et al. BAY 87-2243, a Highly Potent and Selective Inhibitor of Hypoxia-Induced Gene Activation Has Antitumor Activities by Inhibition of Mitochondrial Complex I. *Cancer Med* **2013**, *2*, 611–624, doi:10.1002/cam4.112.
 95. Schöckel, L.; Glasauer, A.; Basit, F.; Bitschar, K.; Truong, H.; Erdmann, G.; Algire, C.; Hägebarth, A.; Willems, P.H.; Kopitz, C.; et al. Targeting Mitochondrial Complex I Using BAY 87-2243 Reduces Melanoma Tumor Growth. *Cancer Metab* **2015**, *3*, 11, doi:10.1186/s40170-015-0138-0.
 96. Basit, F.; van Oppen, L.M.; Schöckel, L.; Bossenbroek, H.M.; van Emst-de Vries, S.E.; Hermeling, J.C.; Grefte, S.; Kopitz, C.; Heroult, M.; Hgm Willems, P.; et al. Mitochondrial Complex I Inhibition Triggers a Mitophagy-Dependent ROS Increase Leading to Necroptosis and Ferroptosis in Melanoma Cells. *Cell Death Dis* **2017**, *8*, e2716, doi:10.1038/cddis.2017.133.
 97. Marciano, R.; Prasad, M.; Levy, T.; Tzadok, S.; Leprivier, G.; Elkabets, M.; Rotblat, B. High-Throughput Screening Identified Compounds Sensitizing Tumor Cells to Glucose Starvation in Culture and VEGF Inhibitors In Vivo. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, E156, doi:10.3390/cancers11020156.
 98. Krishnathas, R.; Bonke, E.; Dröse, S.; Zickermann, V.; Nasiri, H.R. Identification of 4-N-[2-(4-Phenoxyphenyl)Ethyl]Quinazoline-4,6-Diamine as a Novel, Highly Potent and Specific Inhibitor of Mitochondrial Complex I. *Medchemcomm* **2017**, *8*, 657–661, doi:10.1039/c6md00655h.
 99. Tsai, J.-J.; Pan, P.-J.; Hsu, F.-T. Regorafenib Induces Extrinsic and Intrinsic Apoptosis through Inhibition of ERK/NF-KB Activation in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Oncol Rep* **2017**, *37*, 1036–1044, doi:10.3892/or.2016.5328.
 100. Petitjean, A.; Mathe, E.; Kato, S.; Ishioka, C.; Tavtigian, S.V.; Hainaut, P.; Olivier, M. Impact of Mutant P53 Functional Properties on TP53 Mutation Patterns and Tumor Phenotype: Lessons from Recent Developments in the IARC TP53 Database. *Hum Mutat* **2007**, *28*, 622–629, doi:10.1002/humu.20495.
 101. Khan, M.R.; Xiang, S.; Song, Z.; Wu, M. The P53-Inducible Long Noncoding RNA TRINGS Protects Cancer Cells from Necrosis under Glucose Starvation. *EMBO J* **2017**, *36*, 3483–3500, doi:10.15252/embj.201696239.
 102. Jones, R.G.; Plas, D.R.; Kubek, S.; Buzzai, M.; Mu, J.; Xu, Y.; Birnbaum, M.J.; Thompson, C.B. AMP-Activated Protein Kinase Induces a P53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Mol Cell* **2005**, *18*, 283–293, doi:10.1016/j.molcel.2005.03.027.

103. Reid, M.A.; Wang, W.-I.; Rosales, K.R.; Welliver, M.X.; Pan, M.; Kong, M. The B55 α Subunit of PP2A Drives a P53-Dependent Metabolic Adaptation to Glutamine Deprivation. *Mol Cell* **2013**, *50*, 200–211, doi:10.1016/j.molcel.2013.02.008.
104. Ensor, C.M.; Holtsberg, F.W.; Bomalaski, J.S.; Clark, M.A. Pegylated Arginine Deiminase (ADI-SS PEG20,000 Mw) Inhibits Human Melanomas and Hepatocellular Carcinomas in Vitro and in Vivo. *Cancer Res* **2002**, *62*, 5443–5450.
105. Krall, A.S.; Xu, S.; Graeber, T.G.; Braas, D.; Christofk, H.R. Asparagine Promotes Cancer Cell Proliferation through Use as an Amino Acid Exchange Factor. *Nat Commun* **2016**, *7*, 11457, doi:10.1038/ncomms11457.
106. Tajan, M.; Hock, A.K.; Blagih, J.; Robertson, N.A.; Labuschagne, C.F.; Kruiswijk, F.; Humpton, T.J.; Adams, P.D.; Vousden, K.H. A Role for P53 in the Adaptation to Glutamine Starvation through the Expression of SLC1A3. *Cell Metab* **2018**, *28*, 721-736.e6, doi:10.1016/j.cmet.2018.07.005.
107. Lowman, X.H.; Hanse, E.A.; Yang, Y.; Ishak Gabra, M.B.; Tran, T.Q.; Li, H.; Kong, M. P53 Promotes Cancer Cell Adaptation to Glutamine Deprivation by Upregulating Slc7a3 to Increase Arginine Uptake. *Cell Rep* **2019**, *26*, 3051-3060.e4, doi:10.1016/j.celrep.2019.02.037.
108. Ishikawa, K.; Takenaga, K.; Akimoto, M.; Koshikawa, N.; Yamaguchi, A.; Imanishi, H.; Nakada, K.; Honma, Y.; Hayashi, J.-I. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. *Science* **2008**, *320*, 661–664, doi:10.1126/science.1156906.
109. Ray, P.D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cell Signal* **2012**, *24*, 981–990, doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
110. Kohn, A.D.; Moon, R.T. Wnt and Calcium Signaling: Beta-Catenin-Independent Pathways. *Cell Calcium* **2005**, *38*, 439–446, doi:10.1016/j.ceca.2005.06.022.
111. Eriksson, M.; Ambroise, G.; Ouchida, A.T.; Lima Queiroz, A.; Smith, D.; Gimenez-Cassina, A.; Iwanicki, M.P.; Muller, P.A.; Norberg, E.; Vakifahmetoglu-Norberg, H. Effect of Mutant P53 Proteins on Glycolysis and Mitochondrial Metabolism. *Mol Cell Biol* **2017**, *37*, e00328-17, doi:10.1128/MCB.00328-17.
112. Polyak, K.; Xia, Y.; Zweier, J.L.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. A Model for P53-Induced Apoptosis. *Nature* **1997**, *389*, 300–305, doi:10.1038/38525.
113. Sablina, A.A.; Budanov, A.V.; Ilyinskaya, G.V.; Agapova, L.S.; Kravchenko, J.E.; Chumakov, P.M. The Antioxidant Function of the P53 Tumor Suppressor. *Nat Med* **2005**, *11*, 1306–1313, doi:10.1038/nm1320.
114. Trachootham, D.; Lu, W.; Ogasawara, M.A.; Nilsa, R.-D.V.; Huang, P. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 1343–1374, doi:10.1089/ars.2007.1957.
115. Bensaad, K.; Tsuruta, A.; Selak, M.A.; Vidal, M.N.C.; Nakano, K.; Bartrons, R.; Gottlieb, E.; Vousden, K.H. TIGAR, a P53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* **2006**, *126*, 107–120, doi:10.1016/j.cell.2006.05.036.
116. Matoba, S.; Kang, J.-G.; Patino, W.D.; Wragg, A.; Boehm, M.; Gavrilova, O.; Hurley, P.J.; Bunz, F.; Hwang, P.M. P53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science* **2006**, *312*, 1650–1653, doi:10.1126/science.1126863.

117. Madan, E.; Gogna, R.; Kuppusamy, P.; Bhatt, M.; Mahdi, A.A.; Pati, U. SCO2 Induces P53-Mediated Apoptosis by Thr845 Phosphorylation of ASK-1 and Dissociation of the ASK-1-Trx Complex. *Mol Cell Biol* **2013**, *33*, 1285–1302, doi:10.1128/MCB.06798-11.
118. Buzzai, M.; Jones, R.G.; Amaravadi, R.K.; Lum, J.J.; DeBerardinis, R.J.; Zhao, F.; Viollet, B.; Thompson, C.B. Systemic Treatment with the Antidiabetic Drug Metformin Selectively Impairs P53-Deficient Tumor Cell Growth. *Cancer Res* **2007**, *67*, 6745–6752, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4447.
119. Sollazzo, M.; De Luise, M.; Lemma, S.; Bressi, L.; Iorio, M.; Miglietta, S.; Milioni, S.; Kurelac, I.; Iommarini, L.; Gasparre, G.; et al. Respiratory Complex I Dysfunction in Cancer: From a Maze of Cellular Adaptive Responses to Potential Therapeutic Strategies. *FEBS J* **2021**, doi:10.1111/febs.16218.
120. Heishima, K.; Sugito, N.; Soga, T.; Nishikawa, M.; Ito, Y.; Honda, R.; Kuranaga, Y.; Sakai, H.; Ito, R.; Nakagawa, T.; et al. Petasin Potently Inhibits Mitochondrial Complex I-Based Metabolism That Supports Tumor Growth and Metastasis. *J Clin Invest* **2021**, *131*, e139933, doi:10.1172/JCI139933.
121. Kurelac, I.; Iommarini, L.; Vatrinet, R.; Amato, L.B.; De Luise, M.; Leone, G.; Girolimetti, G.; Umesh Ganesh, N.; Bridgeman, V.L.; Ombrato, L.; et al. Inducing Cancer Indolence by Targeting Mitochondrial Complex I Is Potentiated by Blocking Macrophage-Mediated Adaptive Responses. *Nat Commun* **2019**, *10*, 903, doi:10.1038/s41467-019-08839-1.
122. Provencher, D.M.; Lounis, H.; Champoux, L.; Tétrault, M.; Manderson, E.N.; Wang, J.C.; Eydoux, P.; Savoie, R.; Tonin, P.N.; Mes-Masson, A.M. Characterization of Four Novel Epithelial Ovarian Cancer Cell Lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2000**, *36*, 357–361, doi:10.1290/1071-2690(2000)036<0357:COFNEO>2.0.CO;2.
123. De Luise, M.; Sollazzo, M.; Lama, E.; Coadă, C.A.; Bressi, L.; Iorio, M.; Cavina, B.; D’Angelo, L.; Milioni, S.; Marchio, L.; et al. Inducing Respiratory Complex I Impairment Elicits an Increase in PGC1 α in Ovarian Cancer. *Sci Rep* **2022**, *12*, 8020, doi:10.1038/s41598-022-11620-y.
124. D’Angelo, L.; Astro, E.; De Luise, M.; Kurelac, I.; Umesh-Ganesh, N.; Ding, S.; Fearnley, I.M.; Gasparre, G.; Zeviani, M.; Porcelli, A.M.; et al. NDUFS3 Depletion Permits Complex I Maturation and Reveals TMEM126A/OPA7 as an Assembly Factor Binding the ND4-Module Intermediate. *Cell Rep* **2021**, *35*, 109002, doi:10.1016/j.celrep.2021.109002.
125. Grillo, G.; Licciulli, F.; Liuni, S.; Sbisà, E.; Pesole, G. PatSearch: A Program for the Detection of Patterns and Structural Motifs in Nucleotide Sequences. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 3608–3612, doi:10.1093/nar/gkg548.
126. Sbisà, E.; Catalano, D.; Grillo, G.; Licciulli, F.; Turi, A.; Liuni, S.; Pesole, G.; De Grassi, A.; Caratozzolo, M.F.; D’Erchia, A.M.; et al. P53FamTaG: A Database Resource of Human P53, P63 and P73 Direct Target Genes Combining in Silico Prediction and Microarray Data. *BMC Bioinformatics* **2007**, *8 Suppl 1*, S20, doi:10.1186/1471-2105-8-S1-S20.
127. Manfredonia, C.; Muraro, M.G.; Hirt, C.; Mele, V.; Governa, V.; Papadimitropoulos, A.; Däster, S.; Soysal, S.D.; Droessler, R.A.; Mechera, R.; et al. Maintenance of Primary Human Colorectal Cancer Microenvironment Using a

- Perfusion Bioreactor-Based 3D Culture System. *Adv Biosyst* **2019**, *3*, e1800300, doi:10.1002/adbi.201800300.
128. QuPath: Open Source Software for Digital Pathology Image Analysis | Scientific Reports Available online: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17204-5> (accessed on 31 October 2022).
 129. Coyle, C.; Cafferty, F.H.; Vale, C.; Langley, R.E. Metformin as an Adjuvant Treatment for Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Oncol* **2016**, *27*, 2184–2195, doi:10.1093/annonc/mdw410.
 130. Zheng, Y.; Zhu, J.; Zhang, H.; Liu, Y.; Sun, H. Metformin plus First-Line Chemotherapy versus Chemotherapy Alone in the Treatment of Epithelial Ovarian Cancer: A Prospective Open-Label Pilot Trial. *Cancer Chemother Pharmacol* **2019**, *84*, 1349–1357, doi:10.1007/s00280-019-03963-7.
 131. Higurashi, T.; Hosono, K.; Takahashi, H.; Komiya, Y.; Umezawa, S.; Sakai, E.; Uchiyama, T.; Taniguchi, L.; Hata, Y.; Uchiyama, S.; et al. Metformin for Chemoprevention of Metachronous Colorectal Adenoma or Polyps in Post-Polypectomy Patients without Diabetes: A Multicentre Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomised Phase 3 Trial. *Lancet Oncol* **2016**, *17*, 475–483, doi:10.1016/S1470-2045(15)00565-3.
 132. Martin, M.J.; Hayward, R.; Viros, A.; Marais, R. Metformin Accelerates the Growth of BRAF V600E-Driven Melanoma by Upregulating VEGF-A. *Cancer Discov* **2012**, *2*, 344–355, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0280.
 133. Zhu, Z.; Jiang, W.; Thompson, M.D.; McGinley, J.N.; Thompson, H.J. Metformin as an Energy Restriction Mimetic Agent for Breast Cancer Prevention. *J Carcinog* **2011**, *10*, 17, doi:10.4103/1477-3163.83043.
 134. Dowling, R.J.O.; Niraula, S.; Chang, M.C.; Done, S.J.; Ennis, M.; McCready, D.R.; Leong, W.L.; Escallon, J.M.; Reedijk, M.; Goodwin, P.J.; et al. Changes in Insulin Receptor Signaling Underlie Neoadjuvant Metformin Administration in Breast Cancer: A Prospective Window of Opportunity Neoadjuvant Study. *Breast Cancer Res* **2015**, *17*, 32, doi:10.1186/s13058-015-0540-0.
 135. Liu, X.; Romero, I.L.; Litchfield, L.M.; Lengyel, E.; Locasale, J.W. Metformin Targets Central Carbon Metabolism and Reveals Mitochondrial Requirements in Human Cancers. *Cell Metab* **2016**, *24*, 728–739, doi:10.1016/j.cmet.2016.09.005.
 136. Madiraju, A.K.; Qiu, Y.; Perry, R.J.; Rahimi, Y.; Zhang, X.-M.; Zhang, D.; Camporez, J.-P.G.; Cline, G.W.; Butrico, G.M.; Kemp, B.E.; et al. Metformin Inhibits Gluconeogenesis via a Redox-Dependent Mechanism in Vivo. *Nat Med* **2018**, *24*, 1384–1394, doi:10.1038/s41591-018-0125-4.
 137. Chung, I.; Serreli, R.; Cross, J.B.; Di Francesco, M.E.; Marszalek, J.R.; Hirst, J. Cork-in-Bottle Mechanism of Inhibitor Binding to Mammalian Complex I. *Sci Adv* **2021**, *7*, eabg4000, doi:10.1126/sciadv.abg4000.
 138. Bridges, H.R.; Jones, A.J.Y.; Pollak, M.N.; Hirst, J. Effects of Metformin and Other Biguanides on Oxidative Phosphorylation in Mitochondria. *Biochem. J.* **2014**, *462*, 475–487, doi:10.1042/BJ20140620.
 139. Thakur, S.; Daley, B.; Gaskins, K.; Vasko, V.V.; Boufraquech, M.; Patel, D.; Sourbier, C.; Reece, J.; Cheng, S.-Y.; Kebebew, E.; et al. Metformin Targets Mitochondrial Glycerophosphate Dehydrogenase to Control Rate of Oxidative

- Phosphorylation and Growth of Thyroid Cancer In Vitro and In Vivo. *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 4030–4043, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3167.
140. Pecinova, A.; Drahotka, Z.; Kovalcikova, J.; Kovarova, N.; Pecina, P.; Alan, L.; Zima, M.; Houstek, J.; Mracek, T. Pleiotropic Effects of Biguanides on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 7038603, doi:10.1155/2017/7038603.
 141. Wan, G.; Sun, X.; Li, F.; Wang, X.; Li, C.; Li, H.; Yu, X.; Cao, F. Survival Benefit of Metformin Adjuvant Treatment For Pancreatic Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem* **2018**, *49*, 837–847, doi:10.1159/000493214.
 142. Roy, S.; Malone, S.; Grimes, S.; Morgan, S.C. Impact of Concomitant Medications on Biochemical Outcome in Localised Prostate Cancer Treated with Radiotherapy and Androgen Deprivation Therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **2021**, *33*, 181–190, doi:10.1016/j.clon.2020.09.005.
 143. Pimentel, I.; Lohmann, A.E.; Ennis, M.; Dowling, R.J.O.; Cescon, D.; Elser, C.; Potvin, K.R.; Haq, R.; Hamm, C.; Chang, M.C.; et al. A Phase II Randomized Clinical Trial of the Effect of Metformin versus Placebo on Progression-Free Survival in Women with Metastatic Breast Cancer Receiving Standard Chemotherapy. *Breast* **2019**, *48*, 17–23, doi:10.1016/j.breast.2019.08.003.
 144. Brown, J.R.; Chan, D.K.; Shank, J.J.; Griffith, K.A.; Fan, H.; Szulawski, R.; Yang, K.; Reynolds, R.K.; Johnston, C.; McLean, K.; et al. Phase II Clinical Trial of Metformin as a Cancer Stem Cell-Targeting Agent in Ovarian Cancer. *JCI Insight* **2020**, *5*, 133247, doi:10.1172/jci.insight.133247.
 145. Skinner, H.; Hu, C.; Tsakiridis, T.; Santana-Davila, R.; Lu, B.; Erasmus, J.J.; Doemer, A.J.; Videtic, G.M.M.; Coster, J.; Yang, A.X.; et al. Addition of Metformin to Concurrent Chemoradiation in Patients With Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: The NRG-LU001 Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* **2021**, *7*, 1324–1332, doi:10.1001/jamaoncol.2021.2318.
 146. Marrone, K.A.; Zhou, X.; Forde, P.M.; Purtell, M.; Brahmer, J.R.; Hann, C.L.; Kelly, R.J.; Coleman, B.; Gabrielson, E.; Rosner, G.L.; et al. A Randomized Phase II Study of Metformin plus Paclitaxel/Carboplatin/Bevacizumab in Patients with Chemotherapy-Naïve Advanced or Metastatic Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* **2018**, *23*, 859–865, doi:10.1634/theoncologist.2017-0465.
 147. Bridges, H.R.; Blaza, J.N.; Yin, Z.; Chung, I.; Pollak, M.N.; Hirst, J. Structural Basis of Mammalian Respiratory Complex I Inhibition by Medicinal Biguanides 2022, 2022.08.09.503333.
 148. Ivana Kurelac*, Beatrice Cavina*, Manuela Sollazzo*, Stefano Miglietta, Agnese Fornasa, Monica De Luise, Maria Iorio, Eleonora Lama, Daniele Traversa, Hamid Razi Nasiri, Anna Ghelli, Francesco Musiani#, Anna Maria Porcelli#, Luisa Iommarini§ and Giuseppe Gasparre§# NDUFS3 Knockout Cancer Cells and Molecular Docking Reveal Specificity and Mode of Action of Anticancer Respiratory Complex I Inhibitors. *Open biology* **2022**.
 149. Fernandez-Vizarra, E.; Zeviani, M. Mitochondrial Disorders of the OXPHOS System. *FEBS Lett* **2021**, *595*, 1062–1106, doi:10.1002/1873-3468.13995.
 150. Betarbet, R.; Sherer, T.B.; MacKenzie, G.; Garcia-Osuna, M.; Panov, A.V.; Greenamyre, J.T. Chronic Systemic Pesticide Exposure Reproduces Features of Parkinson's Disease. *Nat Neurosci* **2000**, *3*, 1301–1306, doi:10.1038/81834.

151. Wang, Y.; An, H.; Liu, T.; Qin, C.; Sesaki, H.; Guo, S.; Radovick, S.; Hussain, M.; Maheshwari, A.; Wondisford, F.E.; et al. Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Reports* **2019**, *29*, 1511–1523.e5, doi:10.1016/j.celrep.2019.09.070.
152. Blandino, G.; Valerio, M.; Cioce, M.; Mori, F.; Casadei, L.; Pulito, C.; Sacconi, A.; Biagioni, F.; Cortese, G.; Galanti, S.; et al. Metformin Elicits Anticancer Effects through the Sequential Modulation of DICER and C-MYC. *Nat Commun* **2012**, *3*, 865, doi:10.1038/ncomms1859.
153. Menendez, J.A. Metformin: Sentinel of the Epigenetic Landscapes That Underlie Cell Fate and Identity. *Biomolecules* **2020**, *10*, E780, doi:10.3390/biom10050780.
154. Dias Lopes, N.M.; Marinello, P.C.; Sanches, L.J.; da Silva Brito, W.A.; Lovo-Martins, M.I.; Pinge-Filho, P.; Luiz, R.C.; Cecchini, R.; Cecchini, A.L. Patterns of Cell Death Induced by Metformin in Human MCF-7 Breast Cancer Cells. *Pathol Res Pract* **2020**, *216*, 153199, doi:10.1016/j.prp.2020.153199.
155. Tsai, H.-H.; Lai, H.-Y.; Chen, Y.-C.; Li, C.-F.; Huang, H.-S.; Liu, H.-S.; Tsai, Y.-S.; Wang, J.-M. Metformin Promotes Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma through the CEBPD-Induced Autophagy Pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 13832–13845, doi:10.18632/oncotarget.14640.
156. Mechanisms of Apoptosis Induction by Nucleoside Analogs | Oncogene Available online: <https://www.nature.com/articles/1207229> (accessed on 30 October 2022).
157. Sica, V.; Bravo-San Pedro, J.M.; Izzo, V.; Pol, J.; Pierredon, S.; Enot, D.; Durand, S.; Bossut, N.; Chery, A.; Souquere, S.; et al. Lethal Poisoning of Cancer Cells by Respiratory Chain Inhibition plus Dimethyl α -Ketoglutarate. *Cell Rep* **2019**, *27*, 820–834.e9, doi:10.1016/j.celrep.2019.03.058.
158. The Role of ROS in Tumour Development and Progression | Nature Reviews Cancer Available online: <https://www.nature.com/articles/s41568-021-00435-0> (accessed on 1 November 2022).
159. Janssens, V.; Goris, J.; Van Hoof, C. PP2A: The Expected Tumor Suppressor. *Current Opinion in Genetics & Development* **2005**, *15*, 34–41, doi:10.1016/j.gde.2004.12.004.
160. Mumby, M. PP2A: Unveiling a Reluctant Tumor Suppressor. *Cell* **2007**, *130*, 21–24, doi:10.1016/j.cell.2007.06.034.
161. Lambrecht, C.; Libbrecht, L.; Sagaert, X.; Pauwels, P.; Hoorne, Y.; Crowther, J.; Louis, J.V.; Sents, W.; Sablina, A.; Janssens, V. Loss of Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit B56 δ Promotes Spontaneous Tumorigenesis in Vivo. *Oncogene* **2018**, *37*, 544–552, doi:10.1038/onc.2017.350.
162. Haesen, D.; Abbasi Asbagh, L.; Derua, R.; Hubert, A.; Schrauwen, S.; Hoorne, Y.; Amant, F.; Waelkens, E.; Sablina, A.; Janssens, V. Recurrent PPP2R1A Mutations in Uterine Cancer Act through a Dominant-Negative Mechanism to Promote Malignant Cell Growth. *Cancer Res* **2016**, *76*, 5719–5731, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3342.
163. Downregulation of Mcl-1 through GSK-3 β Activation Contributes to Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells | Leukemia Available online: <https://www.nature.com/articles/leu2012180> (accessed on 2 November 2022).

164. Maurer, U.; Charvet, C.; Wagman, A.S.; Dejardin, E.; Green, D.R. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. *Molecular Cell* **2006**, *21*, 749–760, doi:10.1016/j.molcel.2006.02.009.
165. Kruiswijk, F.; Labuschagne, C.F.; Vousden, K.H. P53 in Survival, Death and Metabolic Health: A Lifeguard with a Licence to Kill. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2015**, *16*, 393–405, doi:10.1038/nrm4007.
166. Stine, Z.E.; Walton, Z.E.; Altman, B.J.; Hsieh, A.L.; Dang, C.V. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov* **2015**, *5*, 1024–1039, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0507.
167. Osthus, R.C.; Shim, H.; Kim, S.; Li, Q.; Reddy, R.; Mukherjee, M.; Xu, Y.; Wonsey, D.; Lee, L.A.; Dang, C.V. Dereglulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by C-Myc. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 21797–21800, doi:10.1074/jbc.C000023200.
168. Gao, P.; Tchernyshyov, I.; Chang, T.-C.; Lee, Y.-S.; Kita, K.; Ochi, T.; Zeller, K.I.; De Marzo, A.M.; Van Eyk, J.E.; Mendell, J.T.; et al. C-Myc Suppression of MiR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism. *Nature* **2009**, *458*, 762–765, doi:10.1038/nature07823.
169. Kandoth, C.; McLellan, M.D.; Vandin, F.; Ye, K.; Niu, B.; Lu, C.; Xie, M.; Zhang, Q.; McMichael, J.F.; Wyczalkowski, M.A.; et al. Mutational Landscape and Significance across 12 Major Cancer Types. *Nature* **2013**, *502*, 333–339, doi:10.1038/nature12634.
170. Suzuki, S.; Tanaka, T.; Poyurovsky, M.V.; Nagano, H.; Mayama, T.; Ohkubo, S.; Lokshin, M.; Hosokawa, H.; Nakayama, T.; Suzuki, Y.; et al. Phosphate-Activated Glutaminase (GLS2), a P53-Inducible Regulator of Glutamine Metabolism and Reactive Oxygen Species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 7461–7466, doi:10.1073/pnas.1002459107.
171. Hu, W.; Zhang, C.; Wu, R.; Sun, Y.; Levine, A.; Feng, Z. Glutaminase 2, a Novel P53 Target Gene Regulating Energy Metabolism and Antioxidant Function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 7455–7460, doi:10.1073/pnas.1001006107.
172. Kroemer, G.; Mariño, G.; Levine, B. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol Cell* **2010**, *40*, 280–293, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023.
173. Budanov, A.V.; Karin, M. P53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and MTOR Signaling. *Cell* **2008**, *134*, 451–460, doi:10.1016/j.cell.2008.06.028.
174. Zhang, C.; Liu, J.; Liang, Y.; Wu, R.; Zhao, Y.; Hong, X.; Lin, M.; Yu, H.; Liu, L.; Levine, A.J.; et al. Tumour-Associated Mutant P53 Drives the Warburg Effect. *Nat Commun* **2013**, *4*, 2935, doi:10.1038/ncomms3935.
175. Mullen, A.R.; Wheaton, W.W.; Jin, E.S.; Chen, P.-H.; Sullivan, L.B.; Cheng, T.; Yang, Y.; Linehan, W.M.; Chandel, N.S.; DeBerardinis, R.J. Reductive Carboxylation Supports Growth in Tumour Cells with Defective Mitochondria. *Nature* **2011**, *481*, 385–388, doi:10.1038/nature10642.
176. Cheng, T.; Sudderth, J.; Yang, C.; Mullen, A.R.; Jin, E.S.; Matés, J.M.; DeBerardinis, R.J. Pyruvate Carboxylase Is Required for Glutamine-Independent Growth of Tumor Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 8674–8679, doi:10.1073/pnas.1016627108.

177. Maddocks, O.D.K.; Berkers, C.R.; Mason, S.M.; Zheng, L.; Blyth, K.; Gottlieb, E.; Vousden, K.H. Serine Starvation Induces Stress and P53 Dependent Metabolic Remodeling in Cancer Cells. *Nature* **2013**, *493*, 542–546, doi:10.1038/nature11743.
178. Flöter, J.; Kaymak, I.; Schulze, A. Regulation of Metabolic Activity by P53. *Metabolites* **2017**, *7*, E21, doi:10.3390/metabo7020021.
179. Stambolsky, P.; Weisz, L.; Shats, I.; Klein, Y.; Goldfinger, N.; Oren, M.; Rotter, V. Regulation of AIF Expression by P53. *Cell Death Differ* **2006**, *13*, 2140–2149, doi:10.1038/sj.cdd.4401965.
180. Freed-Pastor, W.A.; Prives, C. Mutant P53: One Name, Many Proteins. *Genes Dev* **2012**, *26*, 1268–1286, doi:10.1101/gad.190678.112.
181. Muller, P.A.J.; Vousden, K.H. P53 Mutations in Cancer. *Nat Cell Biol* **2013**, *15*, 2–8, doi:10.1038/ncb2641.
182. Vettore, L.; Westbrook, R.L.; Tennant, D.A. New Aspects of Amino Acid Metabolism in Cancer. *Br J Cancer* **2020**, *122*, 150–156, doi:10.1038/s41416-019-0620-5.
183. Kurelac, I.; Iommarini, L.; Vatrinet, R.; Amato, L.B.; De Luise, M.; Leone, G.; Girolimetti, G.; Umesh Ganesh, N.; Bridgeman, V.L.; Ombrato, L.; et al. Inducing Cancer Indolence by Targeting Mitochondrial Complex I Is Potentiated by Blocking Macrophage-Mediated Adaptive Responses. *Nat Commun* **2019**, *10*, 903, doi:10.1038/s41467-019-08839-1.
184. Yarmolinsky, M.B.; Haba, G.L.D.L. INHIBITION BY PUROMYCIN OF AMINO ACID INCORPORATION INTO PROTEIN*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1959**, *45*, 1721–1729.
185. Database for mRNA Half-Life of 19 977 Genes Obtained by DNA Microarray Analysis of Pluripotent and Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells | DNA Research | Oxford Academic Available online: <https://academic.oup.com/dnaresearch/article/16/1/45/364974> (accessed on 18 October 2022).
186. Ross, A.B.; Langer, J.D.; Jovanovic, M. Proteome Turnover in the Spotlight: Approaches, Applications, and Perspectives. *Mol Cell Proteomics* **2021**, *20*, 100016, doi:10.1074/mcp.R120.002190.
187. L, C.; Ab, A.; Sk, G.; A, S.; K, L.-L.; R, H.-P. Protein Stability and Degradation in Health and Disease. *Advances in protein chemistry and structural biology* **2019**, *114*, doi:10.1016/bs.apcsb.2018.09.002.
188. Gasparre, G.; Porcelli, A.M.; Bonora, E.; Pennisi, L.F.; Toller, M.; Iommarini, L.; Ghelli, A.; Moretti, M.; Betts, C.M.; Martinelli, G.N.; et al. Disruptive Mitochondrial DNA Mutations in Complex I Subunits Are Markers of Oncocytic Phenotype in Thyroid Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 9001–9006, doi:10.1073/pnas.0703056104.
189. Guerra, F.; Perrone, A.M.; Kurelac, I.; Santini, D.; Ceccarelli, C.; Cricca, M.; Zamagni, C.; De Iaco, P.; Gasparre, G. Mitochondrial DNA Mutation in Serous Ovarian Cancer: Implications for Mitochondria-Coded Genes in Chemoresistance. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, e373-378, doi:10.1200/JCO.2012.43.5933.
190. Platinum-Induced Mitochondrial DNA Mutations Confer Lower Sensitivity to Paclitaxel by Impairing Tubulin Cytoskeletal Organization | Human Molecular Genetics | Oxford Academic Available online:

- <https://academic.oup.com/hmg/article/26/15/2961/3806851> (accessed on 2 November 2022).
191. Liu, G.Y.; Sabatini, D.M. MTOR at the Nexus of Nutrition, Growth, Ageing and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21*, 183–203, doi:10.1038/s41580-019-0199-y.
 192. Unni, N.; Arteaga, C.L. Is Dual MTORC1 and MTORC2 Therapeutic Blockade Clinically Feasible in Cancer? *JAMA Oncol* **2019**, *5*, 1564–1565, doi:10.1001/jamaoncol.2019.2525.
 193. Feng, Z. P53 Regulation of the IGF-1/AKT/MTOR Pathways and the Endosomal Compartment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a001057, doi:10.1101/cshperspect.a001057.
 194. Kong, M.; Fox, C.J.; Mu, J.; Solt, L.; Xu, A.; Cinalli, R.M.; Birnbaum, M.J.; Lindsten, T.; Thompson, C.B. The PP2A-Associated Protein Alpha4 Is an Essential Inhibitor of Apoptosis. *Science* **2004**, *306*, 695–698, doi:10.1126/science.1100537.
 195. He, G.; Zhang, Y.-W.; Lee, J.-H.; Zeng, S.X.; Wang, Y.V.; Luo, Z.; Dong, X.C.; Viollet, B.; Wahl, G.M.; Lu, H. AMP-Activated Protein Kinase Induces P53 by Phosphorylating MDMX and Inhibiting Its Activity. *Mol Cell Biol* **2014**, *34*, 148–157, doi:10.1128/MCB.00670-13.
 196. Hindupur, S.K.; González, A.; Hall, M.N. The Opposing Actions of Target of Rapamycin and AMP-Activated Protein Kinase in Cell Growth Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2015**, *7*, a019141, doi:10.1101/cshperspect.a019141.
 197. Birsoy, K.; Wang, T.; Chen, W.; Freinkman, E.; Abu-Remaileh, M.; Sabatini, D.M. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* **2015**, *162*, 540–551, doi:10.1016/j.cell.2015.07.016.
 198. Jones, R.G.; Plas, D.R.; Kubek, S.; Buzzai, M.; Mu, J.; Xu, Y.; Birnbaum, M.J.; Thompson, C.B. AMP-Activated Protein Kinase Induces a P53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Mol Cell* **2005**, *18*, 283–293, doi:10.1016/j.molcel.2005.03.027.
 199. Wong, K.B.; DeDecker, B.S.; Freund, S.M.; Proctor, M.R.; Bycroft, M.; Fersht, A.R. Hot-Spot Mutants of P53 Core Domain Evince Characteristic Local Structural Changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 8438–8442, doi:10.1073/pnas.96.15.8438.
 200. Li, T.; Kon, N.; Jiang, L.; Tan, M.; Ludwig, T.; Zhao, Y.; Baer, R.; Gu, W. Tumor Suppression in the Absence of P53-Mediated Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Senescence. *Cell* **2012**, *149*, 1269–1283, doi:10.1016/j.cell.2012.04.026.
 201. Tasdemir, E.; Maiuri, M.C.; Galluzzi, L.; Vitale, I.; Djavaheri-Mergny, M.; D’Amelio, M.; Criollo, A.; Morselli, E.; Zhu, C.; Harper, F.; et al. Regulation of Autophagy by Cytoplasmic P53. *Nat Cell Biol* **2008**, *10*, 676–687, doi:10.1038/ncb1730.
 202. MicroRNA-149*, a P53-Responsive MicroRNA, Functions as an Oncogenic Regulator in Human Melanoma | PNAS Available online: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1019312108> (accessed on 2 November 2022).

203. Chiang, Y.-T.; Chien, Y.-C.; Lin, Y.-H.; Wu, H.-H.; Lee, D.-F.; Yu, Y.-L. The Function of the Mutant P53-R175H in Cancer. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 4088, doi:10.3390/cancers13164088.
204. Zhou, G.; Wang, J.; Zhao, M.; Xie, T.-X.; Tanaka, N.; Sano, D.; Patel, A.A.; Ward, A.M.; Sandulache, V.C.; Jasser, S.A.; et al. Gain-of-Function Mutant P53 Promotes Cell Growth and Cancer Cell Metabolism via Inhibition of AMPK Activation. *Mol Cell* **2014**, *54*, 960–974, doi:10.1016/j.molcel.2014.04.024.
205. Lieu, C.H.; Tan, A.-C.; Leong, S.; Diamond, J.R.; Eckhardt, S.G. From Bench to Bedside: Lessons Learned in Translating Preclinical Studies in Cancer Drug Development. *J Natl Cancer Inst* **2013**, *105*, 1441–1456, doi:10.1093/jnci/djt209.
206. Patient-Derived Tumor Xenografts: Transforming Clinical Samples into Mouse Models | Cancer Research | American Association for Cancer Research Available online: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/73/17/5315/584301/Patient-Derived-Tumor-Xenografts-Transforming> (accessed on 2 November 2022).
207. Gould, S.E.; Junttila, M.R.; de Sauvage, F.J. Translational Value of Mouse Models in Oncology Drug Development. *Nat Med* **2015**, *21*, 431–439, doi:10.1038/nm.3853.
208. Mele, V.; Muraro, M.G.; Calabrese, D.; Pfaff, D.; Amatruda, N.; Amicarella, F.; Kvinlaug, B.; Bocelli-Tyndall, C.; Martin, I.; Resink, T.J.; et al. Mesenchymal Stromal Cells Induce Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Colorectal Cancer Cells through the Expression of Surface-Bound TGF- β . *Int J Cancer* **2014**, *134*, 2583–2594, doi:10.1002/ijc.28598.
209. Correia, A.L.; Bissell, M.J. The Tumor Microenvironment Is a Dominant Force in Multidrug Resistance. *Drug Resistance Updates* **2012**, *15*, 39–49, doi:10.1016/j.drug.2012.01.006.
210. Cerino, G.; Gaudiello, E.; Grussenmeyer, T.; Melly, L.; Massai, D.; Banfi, A.; Martin, I.; Eckstein, F.; Grapow, M.; Marsano, A. Three Dimensional Multi-Cellular Muscle-like Tissue Engineering in Perfusion-Based Bioreactors. *Biotechnol Bioeng* **2016**, *113*, 226–236, doi:10.1002/bit.25688.
211. Radisic, M.; Euloth, M.; Yang, L.; Langer, R.; Freed, L.E.; Vunjak-Novakovic, G. High-Density Seeding of Myocyte Cells for Cardiac Tissue Engineering. *Biotechnol Bioeng* **2003**, *82*, 403–414, doi:10.1002/bit.10594.
212. Santoro, R.; Olivares, A.L.; Brans, G.; Wirz, D.; Longinotti, C.; Lacroix, D.; Martin, I.; Wendt, D. Bioreactor Based Engineering of Large-Scale Human Cartilage Grafts for Joint Resurfacing. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8946–8952, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.009.
213. Sabatino, M.A.; Santoro, R.; Gueven, S.; Jaquiere, C.; Wendt, D.J.; Martin, I.; Moretti, M.; Barbero, A. Cartilage Graft Engineering by Co-Culturing Primary Human Articular Chondrocytes with Human Bone Marrow Stromal Cells. *J Tissue Eng Regen Med* **2015**, *9*, 1394–1403, doi:10.1002/term.1661.
214. Patch, A.-M.; Christie, E.L.; Etemadmoghadam, D.; Garsed, D.W.; George, J.; Fereday, S.; Nones, K.; Cowin, P.; Alsop, K.; Bailey, P.J.; et al. Whole-Genome Characterization of Chemoresistant Ovarian Cancer. *Nature* **2015**, *521*, 489–494, doi:10.1038/nature14410.
215. Oren, M.; Rotter, V. Mutant P53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a001107, doi:10.1101/cshperspect.a001107.

216. Visintin, I.; Feng, Z.; Longton, G.; Ward, D.C.; Alvero, A.B.; Lai, Y.; Tenthorey, J.; Leiser, A.; Flores-Saaib, R.; Yu, H.; et al. Diagnostic Markers for Early Detection of Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 1065–1072, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1569.
217. Wang, M.; Holmes, B.; Cheng, X.; Zhu, W.; Keidar, M.; Zhang, L.G. Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e73741, doi:10.1371/journal.pone.0073741.
218. McIlwain, D.R.; Berger, T.; Mak, T.W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, a008656, doi:10.1101/cshperspect.a008656.
219. Owen, M.R.; Doran, E.; Halestrap, A.P. Evidence That Metformin Exerts Its Anti-Diabetic Effects through Inhibition of Complex 1 of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Biochem J* **2000**, *348 Pt 3*, 607–614.
220. Redmond, J.; McCarthy, H.; Buchanan, P.; Levingstone, T.J.; Dunne, N.J. Advances in Biofabrication Techniques for Collagen-Based 3D in Vitro Culture Models for Breast Cancer Research. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *122*, 111944, doi:10.1016/j.msec.2021.111944.
221. Appleyard, M.V.C.L.; Murray, K.E.; Coates, P.J.; Wullschleger, S.; Bray, S.E.; Kernohan, N.M.; Fleming, S.; Alessi, D.R.; Thompson, A.M. Phenformin as Prophylaxis and Therapy in Breast Cancer Xenografts. *Br J Cancer* **2012**, *106*, 1117–1122, doi:10.1038/bjc.2012.56.
222. Viale, A.; Pettazzoni, P.; Lyssiotis, C.A.; Ying, H.; Sánchez, N.; Marchesini, M.; Carugo, A.; Green, T.; Seth, S.; Giuliani, V.; et al. Oncogene Ablation-Resistant Pancreatic Cancer Cells Depend on Mitochondrial Function. *Nature* **2014**, *514*, 628–632, doi:10.1038/nature13611.
223. Sancho, P.; Burgos-Ramos, E.; Tavera, A.; Bou Kheir, T.; Jagust, P.; Schoenhals, M.; Barneda, D.; Sellers, K.; Campos-Olivas, R.; Graña, O.; et al. MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab* **2015**, *22*, 590–605, doi:10.1016/j.cmet.2015.08.015.
224. Bastian, A.; Matsuzaki, S.; Humphries, K.M.; Pharaoh, G.A.; Doshi, A.; Zaware, N.; Gangjee, A.; Ihnat, M.A. AG311, a Small Molecule Inhibitor of Complex I and Hypoxia-Induced HIF-1 α Stabilization. *Cancer Lett* **2017**, *388*, 149–157, doi:10.1016/j.canlet.2016.11.040.