Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Mediche Generali e Scienze dei Servizi

Ciclo XXXIII

Settore Concorsuale: 06/A1

Settore Scientifico Disciplinare: MED/03 Genetica Medica

TITOLO TESI

Meccanismi molecolari alla base dell'acquisizione della resistenza al cisplatino nel carcinoma ovarico: dalla staminalità al metabolismo dei lipidi.

Presentata da: Dr.ssa Lorena Marchio

Coordinatore Dottorato

Supervisore

Prof. Fabio Piscaglia

Prof. Giuseppe Gasparre

Sommario

Sommai	rio	1
Abstract	t	3
1. Inti	roduzione	4
1.1.	Metabolismo della cellula tumorale	4
1.2.	Il carcinoma ovarico	7
1.3.	Strategie terapeutiche in OC.	17
1.4.	Staminalità in OC	24
1.5.	Riprogrammazione metabolica nella chemioresistanza in OC	33
1.6.	mtDNA e chemioresistenza in OC	37
2. Scc	opo	44
3. Ma	iteriali e metodi	46
3.1.	Colture cellulari	46
3.2.	Coorte dei pazienti pre-chemioterapia e post-chemioterapia	47
3.3.	Estrazione DNA	47
3.4.	Sequenziamento mtDNA	48
3.5.	Analisi delle varianti del mtDNA	49
3.6.	PCR fluorescente	50
3.7.	Estrazione RNA	50
3.8.	Retrotrascrizione	50
3.9.	Real time PCR quantitativa (qRT-PCR)	51
3.10.	Saggio di vitalità	53
3.11.	Citofluorimetria	54
3.12.	Tempo di duplicazione cellulare	55
3.13.	Oxygen consumption rate (OCR)	55
3.14.	Misurazione parametri biochimici in citofluorimetria	56
3.15.	Saggio di formazione degli sferoidi	57
3.16.	Analisi di espressione genica differenziale	58
3.17.	Analisi delle vie metaboliche	58
3.18.	Statistica	58
4. Ris	ultati e discussione	59
4.1.	Generazione di linee di carcinoma ovarico resistenti al CDDP	59
4.2.	Gli alti livelli di espressione dei trasportatori ABC come possibile meccanismo di sopravvivenza.	68
4.3. glicoli	Le linee chemioresistenti mostrano una riprogrammazione metabolica verso il metabolismo itico	. 75

	4.4.	Effetto del trattamento cronico con CDDP sul ciclo cellulare.	79
	4.5.	L'effetto del CDDP sulle mutazioni del mtDNA	83
	4.6.	Le linee chemioresistenti acquisiscono un fenotipo staminale	98
	4.7. coinvo	Alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità correlano con la sovraespressione dei geni Iti nel mantenimento dell'omeostasi del metabolismo lipidico1	11
	4.8.	Le linee resistenti mostrano un'attivazione della via di PPAR 1	.22
	4.9.	La popolazione CD133 ⁺ resistente al CDDP mostra un elevato accumulo di lipid droplets 1	.27
	4.10.	Le linee resistenti mostrano un'attivazione dei trasportatori degli acidi grassi	.36
	4.11.	Le linee resistenti, aventi caratteristiche stem-like, mostrano un metabolismo glicolitico 1	.39
	4.12. mitoco	Le linee resistenti, aventi caratteristiche stem-like, mostrano un incremento della massa ondriale	43
5.	Con	clusioni1	49
6.	Refe	erenze1	51

Abstract

Il carcinoma ovarico (OC) è la neoplasia ginecologica con il maggiore tasso di mortalità, in parte dovuto all'acquisizione della resistenza al chemioterapico, che si manifesta nel 75% dei casi, con conseguente insorgenza della recidiva. In diversi tipi di tumori la sopravvivenza delle cellule tumorali trattate con chemioterapici è stata saldamente collegata alla riprogrammazione del metabolismo cellulare. Date queste premesse l'obiettivo di questo studio è quello di verificare se trattamenti a base di platino possano indurre un'alterazione del profilo metabolico in cellule di OC e come questa riprogrammazione metabolica influisca sul fenotipo cellulare. L'analisi del profilo OCR in due linee cellulari di OC (OV90 e OC314) resistenti al farmaco ha mostrato una riprogrammazione metabolica verso una riduzione del profilo OXPHOS e un aumento del metabolismo glicolitico rispetto alle cellule sensibili al chemioterapico. Inoltre, è stato verificato che l'acquisizione della resistenza al farmaco è associata ad un'aumentata espressione dei trasportatori ABCC2 e ABCG2 e ad un rallentamento della proliferazione cellulare con conseguente blocco in fase G1. La resistenza è, inoltre, associata all'acquisizione del fenotipo staminale. È stato dimostrato un arricchimento della popolazione cancer stem cell (CSC) nelle linee resistenti rispetto alle loro controparti sensibili. Infatti, la sovraespressione dei fattori di Yamanaka e di ABCG2 supportano l'acquisizione di un fenotipo stem-like nelle linee resistenti. Pertanto il trattamento cronico con cisplatino ha favorito la selezione e l'arricchimento della sottopopolazione CSC. Quindi, al fine di investigare il legame meccanicistico fra la riprogrammazione metabolica e l'acquisizione della chemioresistenza e di caratteristiche staminali, è stata effettuata un'analisi bioinformatica: gli elevati livelli di espressione dei marcatori CSC correlano con la sovraespressione dei geni coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del metabolismo lipidico. Questa analisi ha mostrato il coinvolgimento della via PPAR, in quanto via di regolazione, e la β -ossidazione come via metabolica. Dunque, le cellule resistenti, con caratteristiche stem-like, costituiscono una sotto-popolazione con un profilo metabolico glicolitico e lipidico. Tali cellule presentano un vantaggio selettivo in un microambiente ricco di lipidi, quale l'omento, e potrebbero pertanto concorrere all'insorgenza della recidiva.

1. Introduzione

1.1. Metabolismo della cellula tumorale

Venti anni fa le principali differenze tra le cellule tumorali e le cellule normali sono state riassunte da Hanahan e Weinberg, i quali hanno classificato i sei principali segni distintivi del cancro. Questi tratti sono responsabili della trasformazione delle cellule normali in cellule tumorali. Essi comprendono: autosufficienza nei segnali di crescita, insensibilità ai segnali che in condizioni normali limiterebbero la loro crescita, potenziale replicativo illimitato, resistenza all'apoptosi, stimolazione dell'angiogenesi per apportare i nutrienti ai tumori, invasione dei tessuti e metastasi¹. Queste peculiarità sono dovute a diversi meccanismi molecolari, in particolare sono state identificate mutazioni da perdita di funzione nei geni oncosoppressori e mutazioni guadagno di funzione negli oncogeni, al punto tale da definire la tumorigenesi come un processo multifasico. Ogni fase è dovuta ad alterazioni genetiche, che guidano la progressiva trasformazione da cellule normali a cellule neoplastiche. Le caratteristiche definite precedentemente permettono alla cellula di sopravvivere, di proliferare e di invadere i tessuti circostanti. Seppur in modo differente, esse sono acquisite dai vari tipi di tumore, in differenti fasi durante il processo di tumorigenesi.

Dieci anni dopo gli stessi autori hanno rivisitato la loro classificazione includendo il contributo del microambiente tumorale come condizione necessaria per soddisfare la prima classe di tratti distintivi: la plasticità metabolica e l'evasione del sistema immunitario. Inoltre, mutazioni, instabilità genomica e infiammazione sono state considerate come caratteristiche permissive per ottenere i tratti distintivi².

La proliferazione cellulare cronica e incontrollata, che rappresenta una delle essenziali peculiarità delle lesioni neoplastiche, è caratterizzata non solo da un mancato controllo del ciclo cellulare ma

anche da un'alterazione del metabolismo, al fine di fornire i metaboliti essenziali per la crescita e la divisione cellulare.

La riprogrammazione metabolica non è altro che il concetto evoluto dell'effetto Warburg che inizialmente presumeva che la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) fosse alterata nelle cellule tumorali. In effetti, Otto Warburg teorizzò che il metabolismo delle cellule tumorali fosse principalmente glicolitico, quindi tutto il glucosio doveva essere convertito in lattato anche in presenza di ossigeno molecolare³, a causa di disfunzioni mitocondriali ed in particolare a causa dell'incapacità delle cellule di accoppiare la glicolisi al ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) per produrre ATP⁴. Questa riprogrammazione metabolica è necessaria in risposta a pressioni selettive come l'adattamento all'ipossia, ma Warburg osservò questo fenomeno in presenza di O₂ (Fig 1.1). Successivamente, è stato dimostrato che la maggior parte dei tumori aggressivi possiede mitocondri funzionali, infatti inibendo le funzioni mitocondriali si riduce il potenziale tumorigenico delle cellule tumorali⁵.



Figura 1.1 Rappresentazione dell'effetto Warburg. In condizioni basali il glucosio viene convertito in piruvato il quale viene trasportato nella matrice mitocondriale attraverso il trasportatore del piruvato e decarbossilato ad acetil-coA. Questo entra nel ciclo di Krebs e viene demolito fino ad ottenere CO_2 e H_2O . In questo caso da una singola molecola di glucosio tramite glicolisi, ciclo di Krebs

e catena respiratoria, si ottengono 36 molecole di ATP. In condizioni anaerobiche, la carenza di ossigeno fa sì che il piruvato non venga indirizzato nella via di respirazione mitocondriale ma venga convertito in acido lattico con un conseguente accumulo. Attraverso questa via si ottengono 2 molecole di ATP per molecola di glucosio. Nelle cellule tumorali, in presenza di O₂, la cellula predilige un metabolismo glicolico. Per unità di glucosio, rispetto alla quantità ottenuta dalla respirazione mitocondriale, la glicolisi aerobica è una via inefficiente per generare ATP.

In particolare, le cellule proliferanti utilizzano i nutrienti per le vie anaboliche di un'ampia gamma di biomolecole, come il glutatione, i nucleotidi, gli acidi grassi, il glicerolo e gli amminoacidi. Tuttavia, in condizioni di deprivazione di nutrienti, le cellule tumorali utilizzano percorsi anaplerotici per ripristinare il ciclo TCA e l'OXPHOS e per ristabilire la produzione di NADPH e ATP⁶. Di conseguenza, l'effetto Warburg dovrebbe essere interpretato come un effetto modulatore del metabolismo del cancro, finalizzato a fornire percorsi biosintetici e sostenere la crescita del tumore.

Attraverso i cambiamenti nell'espressione e nell'attività degli enzimi che sono coinvolti nel metabolismo del glucosio, le cellule tumorali vanno incontro ad una trasformazione metabolica. Dunque, l'effetto Warburg comporta dei benefici sia bioenergetici che biosintetici. Non è chiaro se i due processi, di decremento della fosforilazione ossidativa e dell'aumento della glicolisi, avvengano contemporaneamente. Una possibile spiegazione riguardo questo paradosso è stata fornita da Smolkova e collaboratori, secondo i quali la progressione tumorale è caratterizzata da onde di espressione genica diverse che regolano il fenotipo metabolico durante la trasformazione tumorale⁷. In un primo momento si verifica l'attivazione della prima ondata di riprogrammazione genica mediata da oncogeni che prevede, da parte delle cellule tumorali, l'acquisizione di un fenotipo "Warburg" parzialmente glicolitico dove l'ingresso del piruvato nella OXPHOS viene in parte deviato. Questo profilo metabolico consente ancora un alto tasso di proliferazione e crescita del tumore. Queste caratteristiche, in associazione ad un'angiogenesi ridotta, causano ipossia in alcune regioni all'interno del tumore. Di conseguenza, l'ipossia avvia la seconda ondata, cioè la riprogrammazione metabolica mediata da *Hypoxia-inducible factor* (HIF), che rafforza il fenotipo glicolitico e devia quasi completamente il piruvato dalla OXPHOS. Parallelamente, i geni glicolitico

vengono altamente espressi a causa dell'attivazione di HIF. Il fatto che i tumori debbano sostenere un alto tasso di proliferazione si traduce in un fabbisogno energetico così elevato che supera la richiesta di nutrienti forniti dal sangue. Di conseguenza, la terza ondata di riprogrammazione deve essere avviata per garantire la sopravvivenza delle cellule tumorali e la selezione di quelle più aggressive. Questa terza ondata promuove la glutaminolisi che può avvenire in anossia e si basa sulla carbossilazione riduttiva dell' α -chetoglutarato in citrato seguendo le reazioni del ciclo di Krebs in direzione inversa. In alternativa, l' α -chetoglutarato viene metabolizzato regolarmente dall' α chetoglutarato deidrogenasi. Questo comporta l'attività della succinato deidrogenasi e di conseguenza un concomitante funzionamento parziale della OXPHOS che, dopo l'inibizione nelle due ondate precedenti, viene ristabilita⁷. Pertanto, ogni tumore avrà un fenotipo metabolico differente in base alla sequenza dei geni attivati. Considerando queste proprietà, è una tesi consolidata che il cancro sia anche una malattia metabolica, oltre che genetica, e dunque che il mitocondrio, che è l'organulo dove avvengono le principali reazioni metaboliche della cellula, assuma un ruolo centrale nella carcinogenesi.

1.2. Il carcinoma ovarico

Il carcinoma ovarico (OC) rappresenta la quinta tipologia di tumore più comune nelle donne e rappresenta il 5% delle morti femminili associate al cancro⁸ (Fig 1.2).

			Males	Females		
Lung & bronchus	72,500	23%		Lung & bronchus	63,220	22%
Prostate	33,330	10%		Breast	42,170	15%
Colon & rectum	28,630	9%		Colon & rectum	24,570	9%
Pancreas	24,640	8%		Pancreas	22,410	8%
Liver & intrahepatic bile duct	20,020	6%		Ovary	13,940	5%
Leukemia	13,420	4%		Uterine corpus	12,590	4%
Esophagus	13,100	4%		Liver & intrahepatic bile duct	10,140	4%
Urinary bladder	13,050	4%		Leukemia	9,680	3%
Non-Hodgkin lymphoma	11,460	4%		Non-Hodgkin lymphoma	8,480	3%
Brain & other nervous system	10,190	3%		Brain & other nervous system	7,830	3%
All Sites	321,160	100%		All Sites	285,360	100%



L'età media di insorgenza dell'OC è di 65 anni, tuttavia i casi ereditari si manifestano precocemente all'età di 30-35 anni⁹. L'ereditarietà rappresenta uno dei fattori di rischio maggiori insieme allo stato di nulliparità; l'uso di contraccettivi, la gravidanza e l'allattamento sono, invece, associati ad una riduzione del rischio¹⁰. In particolare, l'ovulazione è considerata un evento cruciale nello sviluppo dell'OC: dopo la rottura dei follicoli maturi per rilasciare gli oociti, le cellule epiteliali proliferano per riparare il danno sulla superficie dell'ovaio. Un'ulteriore ipotesi suggerisce, invece, che i cambiamenti strutturali che avvengono durante l'ovulazione non sono sufficienti per conferire il rischio di trasformazione tumorale. Inoltre, un ulteriore fattore di rischio potrebbe essere rappresentato dalla presenza di ormoni quali estrogeni, androgeni e progesterone¹¹. L'insieme di queste osservazioni suggerisce che ripetuti stimoli dell'epitelio della superficie dell'ovaio, o l'esposizione agli ormoni, potrebbero predisporre l'epitelio verso una trasformazione tumorale.

1.2.1. Classificazione del carcinoma ovarico

Le ovaie presentano una superficie irregolare e sono altamente vascolarizzate. Sono circondate da una tasca di origine peritoneale detta borsa ovarica. Inoltre, esternamente sono ricoperte da uno strato di mesotelio modificato chiamato epitelio ovarico superficiale. Sebbene l'ovaio sia costituito da una corteccia e da un midollo, la divisione tra loro non è sempre distinta. In generale, la regione midollare è costituita da vasi sanguigni, dal sistema linfatico, dallo stroma del tessuto connettivo e da aggregati di cellule interstiziali poligonali, mentre la corteccia è costituita principalmente da follicoli e corpi lutei¹². Vi sono tre principali tipi di tumore ovarico (Fig 1.3):

 Tumore epiteliale: deriva dalle cellule localizzate sulla superficie dell'ovaio. Questa è la forma più comune di carcinoma ovarico. Si manifesta con una frequenza dell'80%, prevalentemente negli adulti.

- *Tumore delle cellule germinali*: deriva dalle cellule che sono coinvolte nella produzione degli oociti all'interno delle ovaie. Si manifesta con una frequenza del 10-15%, è piuttosto raro se confrontato con il tumore epiteliale.
- Tumore stromale: molto raro rispetto al tumore epiteliale. Si manifesta con una frequenza del 5-10%. Questa tipologia di tumore spesso è coinvolta nella produzione di ormoni steroidei.



Figura 1.3 Rappresentazione schematica delle tre tipologie di tumore ovarico

Circa il 90% dell'OC ha un'istologia epiteliale e si suppone che provenga da cellule che rivestono la superficie ovarica, tuttavia l'origine è attualmente discussa¹³. L'OC epiteliale si sviluppa da cellule epiteliali appiattite in quattro distinti istotipi principali (Fig 1.4): sieroso, mucinoso, endometrioide o cellule chiare¹⁴.



Figura 1.4 Sezione istologica dei quattro istotipi di OC epiteliale. Ricordano le cellule normali ben differenziate che costituiscono la tuba di Falloppio (sierosa), l'endometrio (endometrioide) e l'endocervice (mucinoso), o che formano nidi all'interno della vagina (cellula trasparente).

I distinti istotipi di OC differiscono tra loro per quanto riguarda l'epidemiologia, i cambiamenti genetici, l'espressione genica, i marcatori tumorali e la risposta alla terapia¹⁴. Sebbene ogni istotipo mostri un pattern distinto di espressione genica, sono state osservate delle similitudini tra sottotipi sierosi ed endometrioidi in alcuni studi¹⁴ e tra istologia endometrioide e cellule chiare in altri¹⁵. Come in altri tumori solidi, il 90% dei tumori ovarici epiteliali è clonale: si sviluppano dalla progenie di singole cellule che hanno accumulato una serie di alterazioni genetiche a livello di oncogeni e oncosoppressori, implicati nell'oncogenesi ovarica. I cambiamenti genetici inducono la proliferazione, l'inibizione dell'apoptosi, il blocco dell'anoikis, l'aumento della motilità, dell'adesione, dell'invasione e l'attrazione dei componenti stromali, comprese le cellule staminali mesenchimali. In base alla malignità e alla velocità di crescita, l'OC può essere diviso in due gruppi:

- I tumori epiteliali di tipo I comprendono carcinomi sierosi di basso grado, endometrioidi, a cellule chiare, mucinosi e a cellule di transizione¹⁶. Spesso si presentano in una fase precoce, possono derivare da tumori ovarici borderline o endometriosi e in genere hanno una buona prognosi.
- *I tumori epiteliali di tipo II* comprendono il carcinoma sieroso ad alto grado, i carcinomi indifferenziati e i tumori mesodermici misti. Rappresentano circa il 75% dei tumori ovarici

epiteliali, tipicamente presenti in una fase avanzata e hanno una prognosi sfavorevole. Ogni gruppo istologico ha percorsi molecolari distinti che influenzano la chemiosensibilità, il modello di metastasi e la probabilità di sopravvivenza¹⁷.

La forma più diffusa è il carcinoma ovarico sieroso ad alto grado (HGSOC) che si manifesta con una frequenza maggiore del 70%¹⁵. Negli ultimi 30 anni, dall'introduzione dei trattamenti chemioterapici a base di carboplatino, il tasso di guarigione è cambiato solo in modo trascurabile, in gran parte a causa della disseminazione precoce (favorita dalla continuità anatomica con la cavità addominale) e del numero limitato di modelli che possano descrivere la patogenesi e la progressione della patologia¹⁸. La mancanza di questi modelli è dovuta alla persistente incertezza riguardo alla cellula di origine di HGSOC. Lo Riso e collaboratori hanno dimostrato che sia l'epitelio di rivestimento della tuba, sia l'epitelio di rivestimento dell'ovaio, sono coinvolti nell'origine della patologia. In particolare, l'origine spiega la variabilità esistente tra i tumori. I tumori che hanno origine dall'epitelio ovarico sono caratterizzati da una prognosi significativamente peggiore, attribuibile ad una ridotta risposta infiammatoria, associata invece ad una maggiore sopravvivenza¹⁸.

L'HGSOC non richiede la circolazione ematica per colonizzare i siti distanti. Infatti, generalmente nella maggior parte dei tumori epiteliali, le cellule tumorali, al fine di metastatizzare, devono subire una serie di trasformazioni per attraversare la membrana basale quali: migrare, circolare nel sangue e ristabilirsi in un sito distante. Al contrario, l'HGSOC si diffonde direttamente agli organi adiacenti all'interno della cavità peritoneale¹⁹. Per un tumore che cresce sulla superficie dell'ovaio, non sono presenti, dunque, barriere anatomiche in grado di limitare la diffusione di cellule tumorali¹⁴. Quindi, quando le cellule si distaccano dal sito del tumore primario, singolarmente o sottoforma di aggregati, si risospendono nel liquido peritoneale e vengono diffuse passivamente seguendo il flusso fisiologico del fluido all'interno della cavità peritoneale¹⁹. Queste cellule possono quindi colonizzare organi o tessuti distanti, con il conseguente sviluppo di siti tumorali secondari. La diffusione al di

fuori della cavità peritoneale non è comune, sebbene a volte possano essere coinvolti alcuni linfonodi pelvici e/o para-aortici²⁰. Tuttavia sono state osservate delle metastasi al fegato, mentre nella fase più avanzata di HGSOC le cellule tumorali possono anche attraversare la barriera diaframmatica ed entrare nello spazio pleurico, dove possono causare versamenti pleurici o impiantarsi nel parenchima polmonare²¹.

Le pazienti che mostrano una malattia in stadio avanzato sviluppano spesso liquido ascitico. Le cellule di HGSOC potrebbero partecipare alla formazione del liquido ascitico bloccando il drenaggio linfatico o secernendo dei fattori angiogenici che promuovono la permeabilità vascolare¹⁹. L'ascite è caratterizzata da strutture multicellulari quali sferoidi o aggregati di cellule tumorali in sospensione. Questi sono stati identificati come le unità fondamentali di diffusione metastatica formando, inoltre, anche una nicchia chemioresistente che consente alle cellule tumorali HGSOC di sopravvivere alla terapia¹⁹. È importante sottolineare che la formazione di strutture multicellulari potrebbe consentire alle cellule di sopravvivere in condizioni di indipendenza da ancoraggio prevenendo l'anoikis¹⁹.

1.2.2. Metabolismo in OC

Sebbene ogni organo o struttura all'interno della cavità peritoneale possa essere coinvolto nella disseminazione secondaria, le cellule di HGSOC mostrano una predilezione per l'omento¹⁹. Infatti, l'80% delle pazienti con HGSOC presentano metastasi omentali²². L'omento è una formazione peritoneale sierosa che si estende dallo stomaco e copre l'intestino, è composto prevalentemente da adipociti, i quali sono deputati alla formazione e all'immagazzinamento di trigliceridi. Funziona come un organo endocrino ed è un sito di accumulo per i lipidi¹⁹. La metastasi dell'OC all'omento provoca la trasformazione di questo tessuto adiposo in un tumore solido istologicamente privo di adipociti. Nieman e collaboratori dimostrarono che gli adipociti promuovono le prime fasi di

metastasi dell'OC all'omento, sebbene una spiegazione meccanicistica per la prevalenza di tumori metastatici omentali nelle donne con cancro all'ovaio rimanga da fornire²². In aggiunta a questa dimostrazione è stato osservato che in pazienti affette da HGSOC le cellule tumorali, all'interfaccia con gli adipociti dell'omento, mostrano un accumulo di lipidi.

È stato più volte osservato che le alterazioni metaboliche sono, infatti, segni distintivi riconosciuti del cancro¹. Le principali alterazioni metaboliche descritte nei tumori coinvolgono la glicolisi, la glutamminolisi e il metabolismo dei lipidi e contribuiscono a generare l'ATP necessario per la proliferazione cellulare e contemporaneamente rappresentano una fonte di sintesi di macromolecole. Queste sono coinvolte nelle vie di segnalazione e nel rifornimento dei sistemi di detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)²³.

Alla luce di queste considerazioni è stato ipotizzato che la preferenza di HGSOC per l'omento derivi da un fabbisogno metabolico per il catabolismo degli acidi grassi: la β-ossidazione²². Tale via metabolica comporta la produzione di acetil-CoA attraverso la degradazione ossidativa degli acidi grassi^{24,25}. L'acetil-CoA prodotto da ogni ciclo di β-ossidazione può successivamente entrare nel ciclo TCA per generare NADH e FADH₂ per la catena di trasporto degli elettroni, portando infine alla sintesi di circa sei molecole di ATP in più rispetto all'ossidazione dei carboidrati²⁴. Inoltre, l'ossidazione del citrato derivato dall'acetil-CoA, da parte dell'isocitrato deidrogenasi 1 (IDH1), è una delle principali fonti di produzione cellulare di NADPH²⁶. Pertanto, la β-ossidazione fornisce l'ATP sufficiente per alimentare il processo metastatico e genera il NADPH che è essenziale per il metabolismo anabolico e per la detossificazione dei ROS^{27,28}. Inoltre, l'attivazione della βossidazione protegge le cellule tumorali dagli stress ambientali, come la privazione di glucosio e l'ipossia²⁹.

Gli adipociti omentali, oltre a fornire il substrato per la produzione di ATP, producono citochine proinfiammatorie come IL-6 e IL-8 che promuovono l'*homing* e l'invasione delle cellule tumorali²². Nello stesso studio, è stata osservato che la co-coltura di adipociti con cellule di OC promuove una maggiore lipolisi negli adipociti e β-ossidazione nelle cellule tumorali²², conferendo un aumento della proliferazione alle cellule tumorali *in vitro* e una rapida crescita dei tumori trapiantati *in vivo*²². I lipidi derivati dagli adipociti non solo forniscono energia alle cellule tumorali, ma fungono anche da mediatori pro-infiammatori e molecole di segnalazione. Essi, inoltre, potrebbero indurre la produzione di ROS nelle cellule tumorali rendendole più cancerogene³⁰.

Dunque, in presenza di cellule tumorali, gli adipociti incrementano la lipolisi dei trigliceridi immagazzinati in acidi grassi liberi e glicerolo, favorendo il trasporto di questi ultimi nelle cellule tumorali. Questo suggerisce come gli adipociti possano rappresentare una fonte energetica per le cellule tumorali.

Molteplici lavori hanno identificato diversi trasportatori di acidi grassi, i cui alti livelli di espressione, indotti dalla presenza di adipociti omentali nelle cellule tumorali, favoriscono non solo la simbiosi tra adipocita e cellula tumorale ma sono coinvolti anche nella riprogrammazione metabolica. Tra questi *Fatty Acid-Binding Protein 4* (FABP4), favorisce l'interazione cellula tumorale-adipocita aumentando la disponibilità dei lipidi e supportando il processo di metastatizzazione^{22,31}. In un recente studio, è stato osservato come agli alti livelli di espressione di *FABP4* siano associati ad uno specifico profilo metabolico. Questo è caratterizzato dalla presenza di specie lipidiche prevalentemente insature e dal catabolismo degli acidi grassi³¹. La presenza di acidi grassi insaturi potrebbe svolgere un ruolo chiave nella progressione tumorale attivando la via della β-catenina³².

Ulteriori studi suggeriscono che gli adipociti omentali alterano il metabolismo del tumore mediante l'induzione di *Cluster of Differentiation 36* (CD36) nelle cellule tumorali³³. Questo è stato identificato come un importante fattore coinvolto nella riprogrammazione metabolica. L'espressione di *CD36* riduce l'ossidazione del glucosio da parte delle cellule tumorali e riprogramma il metabolismo favorendo l'assorbimento e l'immagazzinamento di lipidi esogeni mentre la sintesi lipidica endogena è inibita. L'assorbimento di acidi grassi mediato da CD36 è un probabile fattore di inibizione del metabolismo ossidativo del glucosio³³.

Inoltre, la co-coltura con adipociti non solo induce l'espressione di CD36, ma porta anche ad un aumento sostanziale del numero e delle dimensioni dei lipid droplets (LD) e del contenuto di colesterolo intracellulare. I LD hanno un'ultrastruttura peculiare costituita da un nucleo di lipidi neutri circondato da un monostrato fosfolipidico, caratterizzato dalla presenza di proteine integrali e periferiche. Sono organelli altamente dinamici, che alternano periodi di crescita e consumo attraverso l'idrolisi enzimatica mediata dalle lipasi (lipolisi) o attraverso una forma selettiva di autofagia (lipofagia). Questi processi dipendono dal metabolismo cellulare e dalla disponibilità dei nutrienti: i lipidi immagazzinati durante le condizioni di surplus di nutrienti vengono mobilitati per la produzione di energia in condizioni di deprivazione di nutrienti o per la sintesi dei fosfolipidi durante l'elevata richiesta di membrane. Inoltre i LD immagazzinano i lipidi potenzialmente tossici. Infatti, gli acidi grassi liberi possono agire come detergenti che alterano l'integrità della membrana o possono essere incorporati in specie lipidiche che ad elevate concentrazioni possono essere citotossiche, come ceramide, acilcarnitina e diacilglicerolo. Pertanto, la conversione degli acidi grassi sottoforma di triacilglicerolo all'interno dei LD impedisce le attività deleterie degli acidi grassi e dei loro derivati. I LD hanno, dunque, un ruolo importante nella prevenzione della lipotossicità e dello stress ossidativo³⁴.

Numerosi studi recenti su vari tumori solidi hanno riconosciuto i LD come organelli funzionali che influenzano la crescita del tumore, l'aggressività e la risposta chemioterapica^{35–37}.

Dunque, CD36 svolge un ruolo essenziale nell'adattamento bioenergetico delle cellule di OC nel microambiente ricco di adipociti e governa la loro plasticità metabolica³³.

Successivamente Zhang e collaboratori analizzarono i cambiamenti dei metaboliti nel processo di metastatizzazione dell'OC. In particolare, le linee cellulari metastatiche sono caratterizzate da variazioni nel profilo lipidomico. Esse mostrano un aumento della fosfatidilcolina e di acidi grassi a catena corta. Inoltre, le cellule metastatiche sono costituite prevalentemente da fosfolipidi³⁸.

Prove crescenti hanno rivelato che oltre all'omento anche l'ascite, grazie alla presenza di fattori di crescita solubili, citochine pro-infiammatorie e acidi grassi, favorisce lo sviluppo e l'invasione dell'OC^{39,40}.

Il liquido ascitico contiene una gamma di cellule tumorali e non tumorali, inclusi fibroblasti, adipociti, cellule mesoteliali, endoteliali e infiammatorie, cellule prive di DNA e numerose molecole di segnalazione che mediano il comportamento cellulare³⁹. La presenza dell'ascite favorisce un processo di metastatizzazione più efficiente, poiché le cellule tumorali seguono la dinamica del fluido peritoneale. Questa metastatizzazione "passiva" si traduce nella distribuzione di aggregati cellulari preferenzialmente nelle aree in cui il fluido si accumula all'interno del peritoneo¹⁹.

L'ascite agisce come serbatoio di una complessa miscela di lipidi, fattori pro-infiammatori, chemochine e fattori di crescita che promuove la progressione metastatica^{41,42}. L'alto contenuto di acidi grassi liberi nel fluido ascitico fornisce un'enorme fonte di energia e può costringere le cellule dell'OC a subire una riprogrammazione metabolica dalla glicolisi aerobica alla β-ossidazione degli acidi grassi per produrre energia per la crescita del tumore. In effetti, Chen e collaboratori hanno mostrato che le cellule di OC conducono la lipogenesi e la β-ossidazione degli acidi grassi per la crescita del tumore.

Dunque, il fluido ascitico come tale è considerato una forma di microambiente tumorale, che riveste un ruolo fondamentale sia nel processo di metastatizzazione che nella chemioresistenza^{44,45}.

Uno studio del 2012 ha riconosciuto la presenza di una percentuale maggiore di sferoidi nell'ascite dei pazienti chemioresistenti rispetto ai pazienti chemiosensibili (95% contro 25%)⁴⁶.

Un potenziale fattore che contribuisce all'associazione tra ascite e chemioresistenza è la presenza di sferoidi altamente cancerogeni^{47,48}. Gli sferoidi sono aggregati di cellule (sia cancerose che non cancerose), possono variare in dimensioni e struttura. È stato dimostrato che essi limitano l'efficacia dei farmaci citotossici e dei chemioterapici^{44,49}. Inoltre, i profili di espressione genica che sono generalmente associati alla chemioresistenza, sono stati identificati in cellule tumorali dell'ascite: è stato dimostrato che l'espressione dei marcatori delle cellule staminali *OCT4, EpCam* e *CD44* è sovraregolata nelle cellule tumorali di ascite provenienti da campioni chemioresistenti. Questo potrebbe collegare le proprietà delle cellule staminali di campioni resistenti con una maggiore efficienza nell'efflusso del farmaco^{46,50}.

1.3. Strategie terapeutiche in OC.

Attualmente sono in corso studi clinici volti a valutare l'efficacia di nuovi farmaci nel trattamento dell'OC. Questi sono principalmente diretti contro bersagli molecolari o contro le vie coinvolte nella proliferazione delle cellule tumorali, nella crescita del tumore e nei segnali di morte. Alcuni esempi sono rappresentati dai fattori anti-angiogenici e degli inibitori polyADP-ribose polymerase (PARP). Questi nuovi approcci terapeutici possono migliorare la terapia e ritardare l'insorgenza della recidiva.

Il trattamento standard per l'OC prevede un intervento chirurgico citoriduttivo seguito dalla chemioterapia a base di platino e taxani che viene somministrata per via endovena ogni 21 giorni, per sei cicli (chemioterapia di prima linea). Nelle pazienti nello stadio I, la chemioterapia può essere omessa⁵¹. Negli stadi avanzati (III / IV), spesso la completa citoriduzione non è possibile, a causa delle infiltrazioni nel mesentere dell'intestino tenue e del coinvolgimento delle arterie epatiche.

Queste pazienti vengono sottoposte ad una chemioterapia a basa di platino e taxani. Dopo tre cicli, se c'è una risposta al trattamento, viene eseguita la chirurgia di intervallo e la chemioterapia viene continuata, fino a sei cicli⁵¹.

Recentemente, la combinazione di chirurgia citoriduttiva e di chemioterapia intraperitoneale ipertermica (HIPEC) è sempre più utilizzata per il trattamento delle metastasi peritoneali. L'HIPEC viene applicata in combinazione con la terapia sistemica, generalmente platino e taxani. I migliori risultati si ottengono nel trattamento dei tumori sensibili al platino⁵².

Ulteriori innovative strategie terapeutiche prevedono l'utilizzo degli inibitori dell'angiogenesi. Uno dei fattori chiave coinvolto nello sviluppo della rete vascolare del tumore è il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Inizialmente si supponeva che il blocco della segnalazione VEGF avrebbe inibito l'angiogenesi e causato una riduzione della massa tumorale, dovuta al ridotto apporto di ossigeno e nutrienti. Tuttavia, una varietà di studi preclinici ha supportato un'ipotesi alternativa, secondo la quale gli agenti anti-angiogenici possono transitoriamente ripristinare la struttura anormale e la funzione della vascolarizzazione nel tumore rendendola più efficiente per la somministrazione di ossigeno e farmaci⁵³. Nell'OC, l'aumentata espressione di VEGF ha un valore prognostico: è correlato al grado del tumore, allo stadio della malattia e alla sopravvivenza delle pazienti. I recettori per VEGF sono presenti sulla superficie delle cellule di OC, facendo ritenere che il VEGF possa svolgere un ruolo importante nello sviluppo della patologia. Infatti, questo aumenta la permeabilità vascolare all'interno del peritoneo, ed è anche responsabile della formazione del liquido ascitico⁵⁴.

Il bevacizumab è un anticorpo monoclonale contro VEGF, che ne impedisce il suo legame al recettore; è stato dimostrato che il bevacizumab ripristina la vascolarizzazione tumorale e riduce la pressione interstiziale del tumore, migliorando l'efficacia della terapia standard. Il bevacizumab ha indotto un incremento di 2-4 mesi della sopravvivenza libera da progressione (PFS) e in alcuni studi

anche della sopravvivenza globale (OS), sebbene sia stato associato ad un elevato grado di effetti collaterali⁵⁴. In alternativa sono stati monitorati farmaci che inibiscono il recettore per il VEGF quali cediranib e pazopanib. Il primo è un inibitore dei tre recettori per il VEGF (VEGFR 1-3). È stato somministrato a pazienti con recidiva ovarica sensibile al platino. La somministrazione del cediranib ha prodotto un miglioramento del PFS, anche se ha indotto alcuni effetti collaterali. Il pazopanib è un inibitore dei recettori VEGFR1-3; è stato osservato che questo induce un miglioramento del PFS, sia nel trattamento delle pazienti resistenti che nel mantenimento delle pazienti sensibili al platino⁵⁴.

Ulteriori farmaci sono coinvolti nell'inibizione delle vie attivate per riparare il danno al DNA. La famiglia degli enzimi PARP è principalmente coinvolta nel rilevamento del danno a singolo filamento (SSB) e nell'attivazione di una cascata di eventi che porta al reclutamento di fattori di riparazione del DNA. In particolare PARP1 funge da sensore e trasduttore di segnale per SSB, lega il DNA e catalizza una serie di eventi di PARilazione che portano all'autoPARilazione di PARP1, che a sua volta induce il rilascio di PARP1 dal DNA. Gli inibitori PARP impediscono il rilascio di PARP1 dal DNA inibendo l'autoPARilazione, favorendo la persistenza del SSB, con il conseguente stallo della forca di replicazione e la rottura del doppio filamento (DSB)^{55,56}. La riparazione dei DSB si basa su due vie: ricombinazione omologa (HR) e non omologa (NHEJ)^{56,57}. BRCA1 e BRCA2 sono proteine fondamentali coinvolte nella via di riparazione HR. Pertanto, la concomitante inibizione degli enzimi PARP e il deficit di BRCA1 o BRCA2 induce la mortalità sintetica nelle cellule tumorali.

Il primo inibitore PARP approvato per uso clinico l'uso è stato l'olaparib⁵⁴. L'olaparib è stato approvato da parte della FDA nel 2014 per il trattamento dell'OC in pazienti con mutazione germinale BRCA, nota o sospetta, che sono state trattate precedentemente con tre o più linee di chemioterapia. Nello stesso anno l'EMA ha autorizzato l'olaparib come trattamento monoterapico in pazienti sensibili al platino o aventi mutazione BRCA che mostrano una risposta completa o parziale alla terapia a base di platino. Attualmente l'olaparib è oggetto di studio in combinazione con la chemioterapia⁵⁸.

1.3.1. Il Cisplatino e i meccanismi di chemioresistenza

La terapia convenzionale prevede l'intervento chirurgico seguito da una terapia a base di cisplatino (CDDP). Sebbene inizialmente la maggior parte delle pazienti risponda con esito positivo, la recidiva si manifesta nel 75% delle pazienti nell'arco di due anni. Le pazienti con OC ricorrente sviluppano una resistenza alla chemioterapia e alla fine soccombono alla malattia⁵⁹. Attualmente a causa dello sviluppo di meccanismi di chemioresistenza, l'OC risulta non curabile.

Il CDDP (Cis-diamminedichloroplatinum(II)) viene utilizzato per il trattamento dei tumori ai polmoni, al colon e alle ovaie. È stato scoperto nel 1965 da Rosenberg, e successivamente approvato per l'uso clinico nel 1978.

Questo viene internalizzato mediante diffusione passiva o mediante trasporto facilitato che vede il coinvolgimento del trasportatore *copper transporter receptor 1* (CTR1). Il chemioterapico esercita un'azione antitumorale mediante una complessa via di segnalazione che potrebbe essere distinta in: una via nucleare e una citoplasmatica. In quanto tale, il CDDP è inerte e deve essere attivato a livello intracellulare da una serie di reazioni che consistono nella sostituzione di uno o entrambi i gruppi cis-cloro con molecole d'acqua. Questa reazione avviene spontaneamente nel citoplasma, a causa della concentrazione relativamente bassa di ioni cloruro (2-10 mM rispetto a 100 mM nell'ambiente extracellulare) e porta alla generazione di forme di CDDP legato ad una o a due molecole d'acqua, queste molecole sono più reattive.

La via citoplasmatica consiste nell'interazione con un ampio numero di substrati e, in particolare, con nucleofili endogeni come il glutatione ridotto (GSH), la metionina e le metallotioneine. Pertanto, il CDDP citoplasmatico ha il potenziale di consumare gli equivalenti ridotti e di modificare l'equilibrio redox verso lo stress ossidativo.

Nella via nucleare il CDDP attivato lega il DNA, con una predilezione per il sito nucleofilo N7 delle purine. Questo porta alla generazione di addotti inter e intra-filamento DNA-DNA⁶⁰. Si ritiene che la presenza di addotti intra-filamento tra due residui G adiacenti sia responsabile della citotossicità. Questi determinano cambiamenti conformazionali del DNA, impedendo la separazione del doppio filamento, con un conseguente blocco della sintesi (Fig 1.5).



Figura 1.5 Formazione di addotti intra-strand e inter-strand indotti dal trattamento con il CDDP⁶¹

Solo l'1% del CDDP intracellulare lega il DNA. Se il trattamento induce un danno limitato, la presenza di addotti causa il blocco in fase S e G2 del ciclo cellulare: questo fenomeno esercita effetti citoprotettivi permettendo alla cellula di riparare il danno e ristabilire l'integrità del DNA. Se, invece, il danno è irreparabile, la cellula va incontro a morte per apoptosi (Fig 1.6).



Figura 1.6 Struttura del CDDP e meccanismo d'azione⁶²

È stato dimostrato che il danno al DNA indotto da CDDP è distribuito uniformemente nel genoma umano e l'incidenza del danno è dettata principalmente dalla frequenza G-G. L'efficienza della riparazione è altamente eterogenea e correla significativamente agli stati di trascrizione e della cromatina. Pertanto, l'effetto complessivo dei danni nel genoma umano è principalmente determinato dall'efficienza della riparazione e non dalla formazione del danno⁶³.

È stato clinicamente dimostrato che il CDDP è efficace contro diversi tipi di cancro. Sebbene alcuni tumori abbiano una prognosi migliore, la frequente somministrazione del chemioterapico potrebbe gradualmente indurre l'acquisizione della resistenza al farmaco, riducendo la sua attività antitumorale^{64,65}. Le vie molecolari della chemioresistenza sono oggetto di studio, la loro comprensione potrebbe fornire una prognosi migliore.

I meccanismi di chemioresistenza possono essere suddivisi in quattro gruppi:

Meccanismi di resistenza pre-target. Vi sono almeno due meccanismi messi in atto dalle cellule tumorali al fine di ridurre il potenziale citotossico del CDDP prima che questo si leghi ai bersagli citoplasmatici ed al DNA: (i) la riduzione della concentrazione intracellulare del CDDP e (ii) l'aumento del sequestro del CDDP dal GSH, dalle metallotionine e dalle altre proteine citoplasmatiche con funzione di *"scavengers"*. Il primo caso vede il coinvolgimento di proteine trasportatrici transmembrana appartenenti alla famiglia ATP binding cassette (ABC) che mediante l'idrolisi di ATP trasportano il CDDP nello spazio extracellulare riducendo la concentrazione intracellulare. Recentemente è stato dimostrato che mediante l'espressione di *ATP-binding cassette sub-family C member 2* (ABCC2) è possibile predire la sensibilità al chemioterapico⁶⁶. Nel secondo caso, il CDDP attivato lega le specie nucleofile citoplasmatiche, quali GSH, metionine e proteine ricche di cisteine. Se da un lato questo mette in evidenza l'effetto citotossico a livello citoplasmatico, in quanto consuma le riserve antiossidanti favorendo lo stress ossidativo, dall'altro lato le specie nucleofile agiscono come *scavengers* citoplasmatici limitando la presenza delle specie reattive del CDDP⁶⁷. Inoltre, l'estrusione del CDDP mediante *ABCC2* richiede che il farmaco sia coniugato al GSH.

Meccanismi di resistenza on-target: L'efficienza del chemioterapico dipende non solo dall'abilità di indurre il danno al DNA, ma anche dalla capacità della cellula tumorale di identificare e rispondere al danno. Questo può essere riparato e si ha la progressione nel ciclo cellulare, in caso contrario si ha la morte per apoptosi. Il riconoscimento degli addotti inter e intra-filamento e la conseguente generazione del segnale apoptotico è alterato nelle linee resistenti. Queste possono acquisire una maggiore capacità di riparare il danno grazie ad una particolare classe di DNA polimerasi che possono favorire la sintesi da translesione⁶⁸. In questo caso, la replicazione procede utilizzando il filamento danneggiato come filamento stampo⁶⁹.

Meccanismi di resistenza post target: Possono derivare da una serie di alterazioni nei meccanismi di trasduzione del segnale che normalmente attivano le vie apoptotiche in risposta al danno al DNA.

Meccanismi di resistenza off target: Prove crescenti suggeriscono che il fenotipo resistente al CDDP possa anche essere sostenuto (se non interamente generato) da alterazioni nelle vie di segnalazione che non sono direttamente indotte dal farmaco, ma attivate come vie compensatorie in risposta ai segnali di apoptosi indotti dal chemioterapico⁶⁸.

1.4. Staminalità in OC

Nei paragrafi precedenti sono state descritte una serie di alterazioni molecolari: queste favoriscono l'acquisizione ed il mantenimento della resistenza al chemioterapico. Negli ultimi anni è stata osservata la presenza di una sottopopolazione quiescente, che non viene distrutta nel corso della chemioterapia, ma che è in grado di rigenerare la massa tumorale: questa sottopopolazione, ovvero le cellule staminali (CSC), è sia la principale causa di recidiva che del processo di metastatizzazione.

Si ritiene che le CSC possano originare o da cellule staminali normali che acquisiscono nuove mutazioni, o da cellule differenziate che acquisiscono abilità stem-like. Le CSC hanno la capacità di auto-rinnovarsi, di proliferare e di differenziarsi in più linee di cellule tumorali, attraverso la divisione cellulare simmetrica e asimmetrica, e presentano un potenziale tumorigenico e specifici marcatori di superficie^{70–72}. Numerosi studi hanno permesso di identificare le caratteristiche specifiche delle CSC: è necessario un numero ridotto di CSC per rigenerare la massa tumorale; possiedono marcatori di superficie specifici che ne permettono l'identificazione e l'isolamento; hanno la capacità di essere trapiantate generazione dopo generazione; sono resistenti alla chemioterapia e alla radioterapia; hanno proprietà di differenziamento e di autorinnovamento^{73,74} (Fig 1.7). In relazione a quest'ultimo punto, le CSC mantengono la loro popolazione principalmente attraverso la divisione cellulare asimmetrica, in cui una CSC parentale si duplica in una CSC e una non-CSC^{75,76}. Nel corso della progressione del cancro, la popolazione CSC può aumentare attraverso la divisione cellulare simmetrica in cui una CSC da origine a due CSC. Un segno distintivo di questo processo è l'aumento del numero di CSC, che non potrebbe essere spiegato dalla divisione cellulare asimmetrica in cui solo una cellula figlia acquisisce un fenotipo staminale⁷⁵. Alcuni studi hanno dimostrato che l'abbondanza delle CSC nei tumori è strettamente correlata alla progressione delle malattie più aggressive e al fallimento delle chemioterapie convenzionali⁷⁷.



Figura 1.7 Caratteristiche delle CSC: a) è necessario un numero di CSC ridotto per rigenerare la massa tumorale; (b) hanno proprietà di autorinnovamento e di differenziamento; (c) possiedono marcatori di superficie specifici e che permettono l'identificazione e l'isolamento; (d) hanno la capacità di essere trapiantate generazione dopo generazione; (e) sono resistenti alla chemioterapia e radioterapia⁷⁸.

L'auto-rinnovamento, il differenziamento e la pluripotenza sono tra le principali caratteristiche delle CSC. Queste mostrano, oltre ad antigeni di membrana utilizzati come marcatori per il loro isolamento, alti livelli di espressione di fattori di trascrizione coinvolti nella staminalità e nella pluripotenza: *OCT4, SOX2, KLF4 e NANOG*, anche identificati come fattori di Yamanaka^{79,80}. L'acquisizione della pluripotenza sembrerebbe essere dovuta a due diverse onde trascrizionali guidate dai fattori di Yamanaka, durante le quali l'espressione dei geni coinvolti nella pluripotenza aumenta gradualmente⁸¹ fino a raggiungere la stabilizzazione⁸². Tuttavia, l'esatto meccanismo di riprogrammazione resta da chiarire. Sembrerebbe che i fattori di riprogrammazione riattivino un circuito di pluripotenza endogena re-inducendo nella cellula la capacità di una crescita illimitata. Vi sono meccanismi molecolari che controllano e regolano lo sviluppo delle cellule staminali tumorali. L'alterazione dell'espressione genica o dell'attività dei fattori di trascrizione di vie di segnalazione altamente conservate, correlate allo sviluppo e all'omeostasi dei tessuti, contribuisce a regolare la crescita, il differenziamento e l'auto-rinnovamento⁸³. Tra le vie di segnalazione prevalentemente coinvolte, hanno un ruolo importante la via di Wnt e la via di Notch.

La via di segnalazione Wnt regola la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la transizione epitelio mesenchima (EMT). I ligandi Wnt si legano alla proteina Frizzled e ai corecettori low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). La formazione del complesso Wnt-Fz-LRP, insieme al reclutamento della proteina di scaffolding Disheveled (Dvl), si traduce nella fosforilazione e nell'attivazione di LRP e nel reclutamento del complesso Axin. Questi eventi portano all'inibizione della fosforilazione della β -catenina mediata da Axin e quindi alla stabilizzazione della β -catenina, che si accumula e trasloca nel nucleo per formare complessi con DNA-bound T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) e attiva l'espressione dei geni bersaglio Wnt⁸⁴. La segnalazione di Wnt/βcatenina è importante sia nelle CSC normali che in quelle tumorali. TCF è un cofattore di trascrizione a valle della via di segnalazione Wnt/ β -catenina che forma un complesso con NANOG e OCT4, due fattori di trascrizione necessari per il mantenimento dell'espressione genica necessaria per la pluripotenza delle cellule staminali⁸⁵. Inoltre, Nagaraj e collaboratori hanno sottolineato l'importanza di questa via di segnalazione nelle CSC in OC: il silenziamento della β-catenina o l'inibizione farmacologica di Wnt/ β -catenina induce una riduzione della formazione di sferoidi, una sensibilizzazione delle cellule resistenti al CDDP e una ridotta percentuale delle CSC in linee cellulari di OC resistenti alla chemioterapia⁸⁶. Poiché la via β-catenina-dipendente regola la pluripotenza delle cellule staminali, ha un ruolo critico nell'auto-rinnovamento e nella capacità di differenziazione, si ritiene che un aumento dell'attivazione della via Wnt promuova la progressione della CSC.

La via di segnalazione di Notch regola la sopravvivenza, la proliferazione cellulare e il mantenimento, oltre alla replicazione ed al differenziamento delle CSC⁸⁷. Inoltre, questa via di segnalazione è generalmente alterata nelle linee cellulari tumorali e contribuisce all'acquisizione delle proprietà *stem-like* nella popolazione CSC. In OC questa via di segnalazione è alterata nel 20% delle pazienti ed è correlata ad un fenotipo altamente aggressivo e ad una prognosi sfavorevole^{88,89}. Brevemente, la via di Notch viene attivata quando uno dei suoi recettori (Notch-1, 2, 3, 4) viene scisso accoppiandosi con un Notch Ligand (Jagged-1, 2, Delta-like 1, 4) espresso su cellule adiacenti⁹⁰. La scissione di Notch è mediata dalla gamma-secretasi e dalla disintegrina-metalloproteinasi 10 (ADAM-10), questo consente la traslocazione nucleare del dominio intra-cellulare Notch (NICD). All'interno del nucleo, NICD si lega il Core binding factor-1 (CBF-1) che recluta i fattori di trascrizione per regolare l'espressione genica^{90,91}.

In relazione all'OC, il gruppo di Zhang e collaboratori fu il primo ad identificare in una popolazione nell'ascite delle pazienti affette da HGSOC alcune importanti capacità: di formare strutture tumorali in 3D, di crescere in condizioni di ancoraggio indipendente e di *self-renewal*⁹². Inoltre, le CSC hanno la capacità di autoproteggersi dai chemioterapici mediante la sovraespressione dei trasportatori ABC, l'attivazione delle vie di Notch e Wnt. Infatti questa popolazione, caratterizzata da un incremento dell'abilità di *self-renewal* e pluripotenza, in seguito al trattamento cronico con CDDP, ha la capacità di sostenere e favorire la crescita tumorale (Fig 1.8).



Figura 1.8 Rappresentazione schematica delle CSC nella chemioresistenza in OC. Le CSC sopravvivono alla tossicità del CDDP. grazie all'aumento dei meccanismi coinvolti nell'efflusso del CDDP, nella quiescenza e nel riparo del DNA, ricostituiscono la massa tumorale e inducono la recidiva⁹³

Diversamente dagli altri tipi di tumori il cui processo di metastatizzazione avviene per via ematica, l'OC normalmente metastatizza all'interno della cavità peritoneale, mediante il fluido ascitico⁹⁴. Molteplici studi hanno dimostrato che l'ascite è ricca in CSC^{46,95}. Questo ambiente è letale per le cellule tumorali che crescono in aderenza, ma favorisce le cellule con fenotipo mesenchimale le quali sono resistenti all'anoikis e quindi sopravvivono.

Inoltre, l'ascite è ricca di fattori che contribuiscono all'arricchimento della popolazione CSC quali interleuchina (IL)-6, IL8 e IL10. Le CSC fluttuanti nell'ascite aderiscono al mesotelio come primo step del processo di metastatizzazione.

1.4.1. Marcatori di staminalità in OC

Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di diversi marcatori di superficie che permettono di identificare popolazioni di OC con caratteristiche di CSC, quali la capacità di dare origine a tumori *in vivo*, di metastatizzare, di subire divisione asimmetrica e di una maggiore resistenza alla chemioterapia. Di seguito sono riportati i marcatori prevalentemente utilizzati in OC.

CD133 o Prominin 1. È una glicoproteina transmembrana localizzata prevalentemente nelle protrusioni della membrana plasmatica, suggerendo il suo coinvolgimento nell'organizzazione della membrana. Tale localizzazione subcellulare consente di legarsi direttamente ai rafts lipidici contenenti colesterolo, dove CD133 può essere coinvolto in varie cascate di segnalazione⁹⁶. Dunque, uno dei ruoli di CD133 potrebbe essere associato al mantenimento della composizione della membrana lipidica a causa della sua interazione con colesterolo⁹⁷. Recentemente è stato riportato il ruolo del CD133 come attivatore della segnalazione della via Wnt/β-catenina. Questa via è attivata dai ligandi WNT2B e WNT3 e promuove direttamente la proliferazione delle CSC. È coinvolta nel mantenimento e nell'espansione delle CSC. L'espressione di CD133 è stata utilizzata come marcatore di CSC per diversi tipi di tumori. In OC, è uno dei più studiati. In uno studio condotto da Curley e collaboratori è stato dimostrato che in OC le cellule CD133⁺, isolate da tumori ovarici primari, hanno proprietà CSC in quanto presentano un'aumentata capacità di formare il tumore rispetto alla popolazione CD133⁻⁹⁸. Inoltre, l'espressione di CD133 è correlata positivamente con lo stadio avanzato di HGSOC, con la presenza di ascite e con una mancata risposta al trattamento con chemioterapico. Questo mette in evidenza come l'espressione di CD133 possa essere utilizzata come marcatore CSC in OC per monitorare e prevedere gli esiti clinici in seguito alla somministrazione della chemioterapia⁹⁹. Inoltre, uno studio recente ha anche dimostrato che l'espressione di CD133 ha un ruolo importante nell'homing nel nuovo sito durante il processo di metastatizzazione, aumentando l'adesione cellulare al tessuto peritoneale in modelli di OC¹⁰⁰. Questi risultati suggeriscono che il targeting di CD133 può ridurre il rischio di recidiva del tumore riducendo al minimo l'invasione ed il potenziale metastatico.

CXCR4 è un membro della famiglia dei recettori delle chemochine che media la chemiotassi cellulare. Legato a CXCL12, stimola varie vie di segnalazione. CXCR4-CXCL12 è implicato nella migrazione delle cellule tumorali e nel processo di metastatizzazione. In OC, l'espressione di *CXCR4*

correla con lo stadio e con la presenza di metastasi, mentre CXCL12 è presente nell'ascite e induce la mobilizzazione delle cellule CXCR4⁺ aumentando la capacità di metastatizzare. Inoltre, è stato dimostrato che CXCR4 interagisce con fattori angiogenici per generare nuovi vasi. CXCL12 e VEGF agiscono in sinergia per stimolare proliferazione, migrazione ed indurre angiogenesi *in vivo*¹⁰¹.

ABCG2 è un membro della famiglia dei trasportatori ATP binding cassette (ABC). Utilizzando l'ATP intracellulare induce il trasporto dei substrati attraverso la membrana. Esso è coinvolto nell'estrusione di molteplici composti esogeni ed endogeni ed ha un importante ruolo nel promuovere la proliferazione delle CSC, ma anche nel mantenimento del fenotipo staminale. È stato identificato per la prima volte nella linea cellulare MCF-7 resistente alla doxorubicina e chiamato breast cancer resistance protein (BCRP)¹⁰². In generale, i trasportatori ABC sono costituiti da due domini transmembrana (TMD), con almeno 12 domini di membrana α -eliche, e due domini catalitici di legame nucleotidico (NBD) rivolti verso il citosol¹⁰³. Il TMD presenta il sito di legame del substrato e costituisce la via di traslocazione per il substrato, mentre l'NBD è responsabile del legame e dell'idrolisi dell'ATP. Tuttavia, solo la sequenza di ABCG2 comprende un NBD e un TMD, quest'ultimo costituito da solo sei domini α -eliche (TM1–6). Pertanto, è considerato un half transporter che deve dimerizzare per ottenere la piena funzionalità¹⁰⁴ (Fig 1.9). Infatti, per legare una molecola di ATP, è necessaria una dimerizzazione dei due domini NBD. Il legame con l'ATP induce dei cambiamenti conformazionali. Si pensa che questi avvengano al fine di fornire l'energia per il trasporto del substrato attraverso la traslocazione nel dominio del TMD^{105,106}. ABCG2, dunque, forma un omodimero di due catene proteiche contenenti due principali domini proteici (NBD; TMD).

ABCG2 può alternare tra due diverse conformazioni: in stato libero di nucleotidi, è rivolto verso l'interno del citosol ed è accessibile per i substrati che si legano all'interno del suo TMD. Nello stato legato all'ATP, la dimerizzazione dei due NBD induce cambiamenti conformazionali nel TMD che guidano il substrato allo spazio extracellulare. Probabilmente, il legame ATP e idrolisi dell'ATP mediano il cambio conformazionale che garantisce il trasporto estrudendo una varietà di sostanze dalla cellula¹⁰⁴. In particolare, affinchè il farmaco venga trasportato sono necessarie due molecole di ATP¹⁰⁷. A tal proposito, è stato osservato che l'attività dei trasportatori ABC richiede necessariamente l'ATP mitocondriale. È interessante notare che quello derivato dalla glicolisi non è necessario per l'attività dei trasportatori ABC. Quindi, la loro espressione in cellule tumorali altamente glicolitiche, con una bassa respirazione mitocondriale, potrebbe non essere sufficiente per conferire la chemioresistenza. Inoltre, data la bassa affinità per l'ATP, in assenza di substrato¹⁰⁷, sarebbe necessaria un'alta concentrazione al fine di garantirne l'attività. Questo requisito potrebbe essere difficile da soddisfare solo con livelli citoplasmatici di ATP generati dalla glicolisi. In tal caso, i mitocondri, in quanto organelli dinamici, potrebbero localizzare in prossimità della membrana citoplasmatica generando dei microdomini ATP aventi la funzione di sostenere l'attività dei trasportatori¹⁰⁸.

ABCG2 localizza in membrane cellulari caratterizzate da un alto contenuto di colesterolo, la deplezione di quest'ultimo induce una marcata diminuzione dell'attività del trasporto di ABCG2 senza influenzare la sua localizzazione all'interno della membrana¹⁰⁹. È interessante notare che è stato osservato che il contenuto di colesterolo del 30 mol % è necessario per fornire le migliori condizioni per l'ottimale attività ATPasica di ABCG2. In quanto tale, il colesterolo è considerato un attivatore essenziale della funzione ABCG2, probabilmente agisce come un substrato, un co-attivatore allosterico o un co-trasportatore¹¹⁰. Infatti, almeno cinque sequenze amminoacidiche consenso coinvolte nel riconoscimento / interazione del colesterolo (CRAC)¹¹¹ sono state identificate nel trasportatore ABCG2.

Come è noto il colesterolo riduce la fluidità della membrana regolando l'orientamento delle catene idrofobe, ciò ha portato a ipotizzare che la modulazione del contenuto di colesterolo all'interno della membrana influisca sulla coesione del dimero ABCG2 a causa di una diminuzione sulla tensione

laterale della membrana¹⁰⁹. Questo potrebbe avere un effetto non solo sulla funzione della proteina ma anche sulla capacità di trasportare il farmaco attraverso il doppio strato lipidico¹¹².

Inoltre, è considerato uno dei maggiori trasportatori coinvolti nella resistenza multi-drug. Tra i chemioterapici generalmente utilizzati come substrati sono stati identificati: mitoxantrone, flavopiridol, 9-aminocamptothecin, topotecan, irinotecan, methotrexate, imatinib, and erlotinib¹⁰³, motivo per il quale viene considerato un marcatore per le CSC universale¹¹³.

Questi dati mettono in evidenza come la funzione fisiologica di ABCG2 sia quella di fornire protezione da substrati citotossici. Gli altri livelli di espressione promuovono la vitalità cellulare. In OC è stato osservato che in una coorte di pazienti sensibili e resistenti al CDDP, alti livelli di espressione di *ABCG2* correlano con *ALDH1, CD133, CXCR4, NANOG* in una coorte di pazienti resistenti al CDDP, indicando la presenza del fenotipo staminale¹¹⁴. Tuttavia, il CDDP non è stato identificato come substrato di ABCG2. La sua sovraespressione potrebbe essere indotta indirettamente mediante l'attivazione della via di Wnt/β–catenina¹¹⁵. Gli altri livelli di espressione di ABCG2 nelle CSC e nei vari tipi di tumori suggeriscono la sua importante funzione nel mantenimento del fenotipo staminale.



Figura 1.9 Modello di topologia di membrana di ABCG2. TMD, domini transmembrana; NBD, domini catalitici di legame nucleotidico¹¹²

In questo contesto di acquisizione della resistenza al farmaco e di proprietà *stem-like*, la riprogrammazione metabolica svolge un ruolo importante. La capacità delle CSC di autorinnovamento e di ricostituire la massa tumorale potrebbe essere la ragione dell'insorgenza della recidiva. Le CSC mostrano un adattamento metabolico a stress fisiologici e metabolici come riduzione della fonte di energia, ipossia, pH del microambiente. Questa riprogrammazione metabolica è ora considerata un'importante caratteristica distintiva delle CSC.

1.5. Riprogrammazione metabolica nella chemioresistanza in OC

La riprogrammazione metabolica è stata riconosciuta da Hanahan e Weinberg come uno dei 10 segni distintivi del cancro². Al fine di supportare la rapida proliferazione, l'invasione e il processo di metastatizzazione, le cellule tumorali mostrano una riprogrammazione dei processi catabolici e anabolici, regolando così il metabolismo energetico e fornendo il supporto necessario per una rapida divisione cellulare¹¹⁶. Questa riprogrammazione prevede una regolazione della produzione di ATP per mantenere lo stato energetico, la biosintesi delle macromolecole e il mantenimento dell'omeostasi redox¹¹⁷. Al fine di sostenere queste esigenze, le cellule tumorali subiscono alterazioni nel metabolismo delle principali classi di macromolecole: carboidrati, proteine, lipidi e acidi nucleici¹¹⁸. La riprogrammazione del metabolismo cellulare è stata saldamente collegata alla sopravvivenza delle cellule tumorali trattate con chemioterapici. Tale riprogrammazione potrebbe conferire alle cellule una flessibilità tale da permette di sopravvivere alla tossicità del farmaco.

Dar e collaboratori mostrarono che le cellule di OC resistenti e sensibili al CDDP mostrano profili bioenergetici distinti. Le linee cellulari sensibili sono caratterizzate da un profilo metabolico prevalentemente glicolitico. Al contrario la rispettiva controparte resistente mostra un incremento di entrambe le vie metaboliche: glicolisi e OXPHOS. Da un punto di vista metabolico le linee resistenti mostrano, dunque, un profilo altamente energetico, che consente loro di utilizzare entrambe le vie metaboliche per la sopravvivenza¹¹⁹.

Inoltre, le linee resistenti presentano una densità mitocondriale significativamente più alta rispetto alla controparte sensibile. Questo si riflette non solo in relazione alla massa mitocondriale, ma anche in una maggiore funzionalità che si manifesta non solo sotto forma di fosforilazione ossidativa, ma anche come ossidazione degli acidi grassi¹¹⁹.

Alla luce di queste considerazioni, è stato proposto che il trattamento cronico con il CDDP determini una riprogrammazione metabolica modificando il metabolismo glicolitico delle linee sensibili in un fenotipo altamente bioenergetico. Questo conferirebbe alle linee resistenti una flessibilità metabolica nell'uso della glicolisi o dell'OXPHOS, soprattutto se una di queste vie metaboliche risulta essere compromessa. Infatti, queste cellule di OC resistenti mostrano la capacità di mantenere la produzione di energia in condizione di deprivazione di glucosio¹¹⁹.

Dunque, il fenotipo altamente bioenergetico favorisce la sopravvivenza in condizioni di stress indotte dal trattamento con il chemioterapico, rispetto alle linee sensibili che mostrano un fenotipo glicolitico.

Tuttavia la riprogrammazione metabolica in risposta al trattamento chemioterapico è ancora dibattuta^{120,121}. Gentric e collaboratori hanno valutato in modelli murini di patient-derived xenograft (PDX) le risposte alla chemioterapia. Sono stati identificati due sottogruppi con profili metabolici distinti. Questi mostrano differenze nella respirazione mitocondriale, nel ciclo TCA, nel processo di biosintesi dell'ATP e nell'espressione delle proteine della catena di trasporto mitocondriale. In base alla dipendenza dai processi precedentemente indicati sono stati individuati il sottogruppo ad alto profilo OXPHOS e quello a basso profilo OXPHOS¹²².

La crescita tumorale subisce un drastico arresto nei modelli PDX ad alto profilo OXPHOS rispetto al basso profilo. Dunque, lo stato di OXPHOS è associato ad una migliore risposta alla chemioterapia nei modelli PDX. Coerentemente con queste osservazioni, gli alti livelli di espressione delle proteine della catena respiratoria mitocondriale (che definiscono lo stato di alto profilo OXPHOS) sono stati associati ad un miglioramento della sopravvivenza nelle pazienti. Infatti, dopo un primo ciclo di chemioterapia, a base di platino e taxani, le pazienti caratterizzate da alti livelli di espressione delle proteine della catena respiratoria mitocondriale mostrano l'assenza di recidiva a 12 mesi¹²².

Coerentemente con i risultati su PDX e pazienti, *in vitro* linee cellulari aventi un alto profilo OXPHOS manifestano una maggiore sensibilità al platino e ai taxani rispetto alle linee cellulari a basso profilo. È stato ipotizzato che lo stress ossidativo cronico, rilevato nei tumori e nelle linee cellulari ad alto profilo OXPHOS, potrebbe essere coinvolto nella loro maggiore sensibilità ai chemioterapici¹²².

Le linee cellulari ad alto profilo OXPHOS sono caratterizzate da un aumento della produzione di ROS, da un'elevata perossidazione lipidica e da un'alterazione dell'omeostasi del ferro. Queste caratteristiche sono comunemente associate alla ferroptosi, una morte cellulare programmata dipendente dal ferro^{123,124}. La ferroptosi potrebbe essere coinvolta nell'aumento della sensibilità ai chemioterapici. Emerge, dunque, contrariamente a quanto osservato precedentemente da Dar e collaboratori, come l'elevata fosforilazione ossidativa sia una condizione determinante nel mantenimento della sensibilità al farmaco.

Parallelamente in numerosi lavori è stato osservato che l'incremento dell'assorbimento del glucosio e una maggiore glicolisi favoriscano l'acquisizione della resistenza al CDDP^{125–129}. Perché le cellule tumorali resistenti al CDDP preferiscano come via metabolica la glicolisi, che comporta una ridotta produzione di ATP rispetto all'OXPHOS, non è stato definito. Diversi aspetti potrebbero concorrere a conferire vantaggi rispetto alla fosforilazione ossidativa: in primo luogo, il tasso di produzione di ATP mediante glicolisi è più veloce; in secondo luogo, potrebbero essere utilizzati i prodotti
intermedi della glicolisi per la biosintesi di diverse macromolecole come lipidi, acidi nucleici, ecc. Inoltre, uno dei metaboliti generati dalla glicolisi è il NADPH, il quale è fondamentale per mantenere livelli sufficienti di GSH, che ha la capacità di bilanciare lo stress ossidativo indotto da composti a base di platino. Il processo di glicolisi potrebbe anche ridurre la produzione di ROS limitando il flusso di piruvato nei mitocondri aumentando la resistenza all'apoptosi o alla metastatizzazione^{130–132}.

Inoltre, una via metabolica che si ramifica dalla glicolisi, è quella dei pentosi fosfati (PPP). La PPP mediante la produzione di NADPH svolge un ruolo fondamentale contrastando lo stress ossidativo. Genera nucleotidi per la sintesi e la riparazione del DNA e, nel frattempo, potrebbe ridurre la produzione di H₂O₂ aumentano il potenziale redox, mediante la produzione del NADPH¹³³. La PPP potrebbe, dunque, favorire la resistenza a certi tipi di terapie che comportano la produzione di ROS e danni al DNA, compreso il CDDP^{134,135}. La produzione di NADPH è richiesta per la generazione di GSH, che svolge un'azione protettiva contro il CDDP; il GSH lega covalentemente il farmaco attraverso il suo gruppo tiolo, prevenendo la reazione del CDDP con il DNA¹³⁶.

Questa via è stata ampiamente studiata da Catanzaro e collaboratori. In questo lavoro si può osservare che l'aumento del metabolismo del glucosio, è necessario non solo per la generazione di ATP o per la sintesi di nucleotidi e amminoacidi, ma anche per il mantenimento dell'omeostasi redox tramite la via PPP che produce NADPH^{135,137}.

È stato osservato che il CDDP induce un'alterazione della funzione mitocondriale nelle cellule resistenti. Queste aumentano le loro richieste di glucosio e sono più sensibili all'inibizione della glicolisi, rispetto alla controparte sensibile. La riprogrammazione metabolica delle cellule resistenti può contribuire al buffering redox.

I cambiamenti metabolici, dunque, sono alla base della resistenza al CDDP. Oltre alla riduzione della massa e della funzione mitocondriale, queste cellule aumentano la loro richiesta di glucosio, che è in parte utilizzato per mantenere le difese antiossidanti della cellula.

1.6. mtDNA e chemioresistenza in OC

1.6.1. *Morfologia, struttura e funzione dei mitocondri*

I mitocondri sono i principali produttori di energia nella cellula: organelli semiautonomi in quanto costituiti da un proprio DNA. Il DNA mitocondriale (mtDNA) infatti, è costituito da una molecola circolare a doppio filamento che nell'uomo è costituito da 16.565bp. Alla fine del XIX secolo, Richard e Carla Benda furono i primi ad identificare i mitocondri come un insieme di vescicole presenti in centinaia di copie. Oggi è noto che i mitocondri sono presenti nel citoplasma, ma non sono singole vescicole come precedentemente osservato, sono, invece, organizzati in un network mitocondriale. Essi sono coinvolti nelle principali vie metaboliche che caratterizzano la biologia degli eucarioti, ovvero, la conversione di substrati organici in energia attraverso la OXPHOS. Numerosi processi avvengono negli organelli quali: il ciclo TCA, la β- ossidazione degli acidi grassi, il ciclo dell'urea, la sintesi del gruppo eme, la sintesi delle pirimidine e la produzione di calore mediante il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa dalla catena di trasporto degli elettroni. Inoltre, sono uno dei principali siti per la produzione di ROS. Essi hanno anche un ruolo principale nella regolazione dei meccanismi apoptotici, motivo per cui sono coinvolti nei processi di sopravvivenza: da essi dipende, infatti, il rilascio di proteine pro-apoptotiche quali il citocromo C, e l'attivazione della caspasi 3.

I mitocondri sono costituiti da un sistema a doppia membrana: la membrana mitocondriale interna differisce da quella esterna per il contenuto di lipoproteine e per la permeabilità (Fig 1.10). Le

membrane delimitano la formazione di due compartimenti: lo spazio compreso tra le due membrane, definito spazio intermembrana, e la matrice interna.



Figura 1.10 Struttura e funzione dei mitocondri¹³⁸

1.6.2. Organizzazione del mtDNA

I mitocondri sono considerati organelli semi-autonomi grazie alla presenza del mtDNA. Il genoma mitocondriale ha delle caratteristiche peculiari che lo contraddistinguono dal genoma nucleare. Probabilmente la maggiore differenza è attribuibile alla poliploidia del genoma mitocondriale, che determina lo stato di omoplasmia ed eteroplasmia. La coesistenza di differenti varianti genetiche all'interno della stessa cellula o tessuto è definita eteroplasmia. Invece, l'omoplasmia si manifesta quando tutte le copie del mtDNA sono omogenee dal punto di vista del genotipo. Generalmente è necessaria una certa percentuale di molecole di mtDNA mutate per osservare un effetto funzionale. Dunque, come conseguenza della poliploidia mitocondriale, l'effetto fenotipico di una variante dipende dal carico mutazionale. Di solito, è necessario raggiungere una certa porzione critica di molecole mutate prima che inizino a manifestarsi conseguenze funzionali, che dipendono dal tipo di variante e dal contesto in cui si verifica¹³⁹. I valori soglia sono stati determinati per alcune delle

mutazioni più comuni del mtDNA¹⁴⁰, ma la mancanza di metodi appropriati e standardizzati per l'indagine sull'eteroplasmia ha impedito una completa comprensione della correlazione genotipofenotipo del mtDNA¹⁴¹.

Il mtDNA utilizza un codice genetico lievemente diverso, non segue le leggi di ereditarietà mendeliane, ma viene ereditato esclusivamente per via materna¹⁴². Infatti, i mitocondri degli spermatozoi vengono degradati subito dopo la fecondazione. Il mtDNA umano (Fig 1.11) è una molecola circolare a doppio filamento costituita da circa 16569bp. I due filamenti differiscono tra loro per il contenuto in G+T e si distinguono in filamento pesante (H) e filamento leggero (L). Contrariamente al DNA nucleare, non sono presenti gli introni ma le sequenze codificanti sono continue. Esso contiene 37 geni, di cui 24 sono coinvolti nel sistema di traduzione e 13 codificano per le subunità della catena respiratoria. Di queste 13 subunità, 7 costituiscono il Complesso I (CI): ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6, una subunità il Complesso III: citocromo B (Cytb), 3 subunità il Complesso IV (CIV): COX1, COX2, COX3, e le ultime 2, ATPase6 e ATPase8 sono subunità del Complesso V (CV). Le rimanenti subunità dei complessi della catena respiratoria sono codificate dal DNA nucleare.

I geni coinvolti nella traduzione includono due RNA ribosomiali RNR1 e RNR2 e 22tRNA: un tRNA per ognuno dei 20 amminoacidi e, a causa della ridondanza del codice genetico, due tRNA diversi per leucina e serina. Il mtDNA contiene una regione regolatrice detta displacement loop (DLoop) in cui sono localizzati i siti di inizio della replicazione e della trascrizione.



Figura 1.11 DNA mitocondriale. A. Rappresentazione schematica del mtDNA come molecola circolare a doppio strand B. Schematizzazione della catena di trasporto degli elettroni. In tabella sono riportate le subunità a codifica mitocondriale e nucleare.

1.6.3. *mtDNA e chemioresistenza in OC*

Studi precedenti hanno rivelato che la formazione di addotti indotti dal platino è maggiore nel mtDNA rispetto al DNA genomico. Dato il ricco contenuto in G, il mtDNA è il principale bersaglio del CDDP. La formazione di addotti può danneggiare il mtDNA e causare delle mutazioni che possono contribuire alle disfunzioni energetiche e favorire la riprogrammazione metabolica. I cambiamenti dello stato metabolico e del potenziale tumorigenico *in vivo*, sono correlati al grado di alterazione della catena respiratoria mitocondriale e, quindi, al carico mutazionale del mtDNA.

Studi sul metabolismo energetico in diversi tumori indicano chiaramente che le cellule tumorali, che spesso preferiscono la glicolisi aerobica, sono in grado di modificare il proprio metabolismo glicolitico in uno prettamente ossidativo. Questo, secondo il modello ad onde di espressione genica proposto da Smolkova e collaboratori, viene ristabilito durante la progressione tumorale al fine di favorire la sopravvivenza delle cellule tumorali e selezionare i cloni più aggressivi⁷. Questo modello, indirettamente suggerisce che un certo grado di funzione mitocondriale e mtDNA *wild-type* deve essere mantenuto¹⁴³. In questo contesto, mutazioni mitocondriali distruttive sono state identificate come hallmark genetici di alcuni tipi di tumori detti oncocitomi: generalmente sono caratterizzati da un basso tasso di proliferazione e un fenotipo non invasivo¹⁴⁴.

Lo studio di questo tipo di tumore ha permesso di definire il concetto di "oncojanus".

"Oncojanus" fa riferimento alla capacità dei geni mitocondriali, codificanti per il Cl, di determinare l'arresto della crescita tumorale quando una mutazione distruttiva raggiunge un livello soglia¹⁴⁵. Guerra e collaboratori dimostrarono l'acquisto di un fenotipo oncocitico in una massa tumorale di OC, dopo un trattamento chemioterapico a base di CDDP e paclitaxel (PTX). Nello specifico, una mutazione omoplasmica in *MT-ND4* era presente sono nel tessuto post chemioterapia¹⁴⁶. Questa mutazione, indotta dal CDDP o insorta casualmente prima o durante la chemioterapia, potrebbe determinare difetti bioenergetici che conferiscono un vantaggio per la resistenza al PTX. Infatti, grazie all'effetto *oncojanus,* la massa tumorale mostra un fenotipo non invasivo e quiescente. Questo ha favorito la selezione di un clone tumorale resistente, ma quiescente durante il trattamento con CDDP e PTX, in quanto questi chemioterapici agiscono su cellule tumorali caratterizzate da un alto tasso di proliferazione. Successivamente, Girolimetti e collaboratori confermarono *in vitro* come il trattamento cronico con CDDP induca l'accumulo di mutazioni nel mtDNA. La presenza di mutazioni, in *MT-ND5* e MT-*CO2*, induce un difetto bioenergetico che conferisce una ridotta capacità proliferativa e un'alterazione dell'organizzazione del citoscheletro

incrementando, di conseguenza, la resistenza al PTX. Questo mette in evidenza una correlazione tra l'insorgenza delle mutazioni nel mtDNA e l'insorgenza della chemioresistenza¹⁴⁷.

Sulla base di questi dati e di studi precedenti, è possibile dedurre che le mutazioni del mtDNA possono determinare alterazioni nel metabolismo mitocondriale che sono collegate allo sviluppo, alla progressione e all'invasività del cancro^{144,146}. La ricerca di una correlazione tra una grave compromissione metabolica mitocondriale e la chemioresistenza potrebbe determinare l'utilizzo di mutazioni del mtDNA come marcatori molecolari di prognosi per la risposta chemioterapica in OC.

In un recente studio, Ni e collaboratori al fine di sviscerare ulteriormente la tipologia delle varianti del mtDNA e l'associazione con la resistenza al platino e la recidiva, hanno sequenziato l'intero genoma del mtDNA di pazienti sensibili e resistenti al chemioterapico non associati.

L'attenzione è stata focalizzata, in particolare, sulle varianti patogene eteroplasmiche. In questo contesto le pazienti caratterizzate da tali varianti presentano una maggiore incidenza di resistenza al platino e di recidiva rispetto alle pazienti che non presentano mutazioni patogene eteroplasmiche. Questi dati indicano che la disfunzione mitocondriale, causata da mutazioni somatiche patogene eteroplasmiche del mtDNA, potrebbero contribuire alla resistenza alla chemioterapia del platino e alla recidiva di HGSOC¹⁴⁸.

Alla luce di queste considerazioni, è evidente l'importanza della regolazione del metabolismo mitocondriale in termini di fosforilazione ossidativa. Considerando che lo stato OXPHOS può determinare il tasso glicolitico e il ciclo TCA, non sorprende che le mutazioni del mtDNA possano influenzare la riprogrammazione metabolica delle cellule tumorali nell'acquisizione della chemioresistenza. Le mutazioni mitocondriali possono avere effetti diversi e possono agire come effettori positivi o negativi sulla sopravvivenza e sulla proliferazione cellulare, a seconda del contesto e dello stadio del tumore. Come mostrato in studi precedenti, l'acquisizione di mutazioni mitocondriali, in seguito al trattamento con chemioterapico, induce difetti bioenergetici che si riflettono anche su una ridotta capacità proliferativa, favorendo un incremento della resistenza ai chemioterapici^{146,147}. L'insorgenza delle mutazioni, dunque, potrebbe conferire alla cellula tumorale delle caratteristiche necessarie per favorire l'acquisizione del fenotipo resistente.

L'associazione delle mutazioni del mtDNA con la resistenza alla terapia è un campo di ricerca particolarmente interessante poiché la loro identificazione potrebbe essere utile nella previsione della risposta alla terapia nei pazienti.

2. Scopo

Attualmente nel trattamento dell'OC la terapia convenzionale prevede l'intervento chirurgico seguito da una terapia a base di platino e taxani. Sebbene inizialmente la maggior parte delle pazienti risponda con esito positivo, la recidiva si manifesta nel 75% dei casi nell'arco di due anni successivi alla diagnosi iniziale⁵⁹. Nonostante solo l'1% del CDDP intracellulare leghi il DNA, attualmente è il meccanismo d'azione più investigato. Dato il ricco contenuto in Guanina, il mtDNA è il principale bersaglio del CDDP. La formazione di addotti può danneggiare il mtDNA e causare delle mutazioni che possono contribuire alle disfunzioni energetiche e favorire la riprogrammazione metabolica. I cambiamenti dello stato metabolico e del potenziale tumorigenico *in vivo*, sono correlati al grado di alterazione della catena respiratoria mitocondriale e, quindi, al carico mutazionale del mtDNA.

Sulla base di questa premesse, il primo obiettivo di questo studio è validare l'ipotesi che i composti a base di platino possano causare l'insorgenza di mutazioni nel mtDNA che, a loro volta, possano indurre un'alterazione della fosforilazione ossidativa. Un rallentamento della proliferazione è stato riportato in associazione con il deficit della OXPHOS, e di conseguenza con una diminuita sensibilità ai chemioterapici.

Nonostante i meccanismi coinvolti nell'acquisizione della chemioresistenza siano ancora poco chiari, negli ultimi tempi molteplici studi hanno proposto un ruolo critico delle CSC. Queste essendo caratterizzate da un'innata resistenza ai farmaci, dalla capacità di essere quiescenti e di andare incontro ad auto-rinnovamento, rappresentano uno dei principali bersagli. Inoltre, diversi studi indicano che in condizioni di stress le CSC, rispetto alla controparte differenziata, possono riadattare il proprio metabolismo per favorire la crescita e la sopravvivenza. Alla luce di queste considerazioni un ulteriore obiettivo di questo studio è quello di verificare che il trattamento cronico con CDDP induca l'acquisizione di un fenotipo *stem-like* in linee cellulari di carcinoma ovarico.

Il terzo obiettivo è quello di investigare il legame meccanicistico fra la riprogrammazione metabolica e l'acquisizione della chemioresistenza e di caratteristiche staminali.

La definizione del fenotipo metabolico permetterebbe di isolare le CSC, dalla rispettiva controparte differenziata, e di sviluppare una terapia mirata che vada a danneggiare la sottopopolazione staminale.

3. Materiali e metodi

3.1. Colture cellulari

In questo studio sono state utilizzate le seguenti linee cellulari di carcinoma ovarico.

- La linea cellulare OC314 deriva dal liquido ascitico prelevato da una paziente che al momento della diagnosi presentava un adenocarcinoma sieroso in stadio avanzato. La paziente non è stata soggetta a trattamenti chemioterapici; le OC314 mostrano una sensibilità al CDDP¹⁴⁹. Questa linea è stata gentilmente concessa dalla Professoressa Ada Funaro, Università di Torino.

- La linea cellulare OV90 deriva dal liquido ascitico prelevato da una paziente affetta da adenocarcinoma sieroso in stadio avanzato al momento della diagnosi¹⁵⁰. Questa linea è stata acquistata da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

Le linee resistenti al CDDP sono state generate dalle rispettive linee parentali. Il valore dell'LC50 delle due linee parentali è stato calcolato come riportato in Girolimetti et al¹⁴⁷. In particolare, per calcolare l'LC50 delle linee sensibili sono state utilizzate concentrazioni crescenti di CDDP comprese tra 1-8µM. Al fine di generare le linee resistenti, le linee sensibili sono state trattate con il rispettivo valore dell'LC50 per 72h (2,5µM per le OC314 e 3,5µM per le OV90) ed in seguito è stato ripristinato il terreno completo privo di chemioterapico per 72h. Questo ciclo è stato ripetuto per 2 volte. Il secondo ciclo di trattamento con il CDDP ha determinato la mortalità del 90% della popolazione cellulare. Il rimanente 10%, presente in piastra come singola cellula o gruppi di 2-3 cellule, è andato incontro a proliferazione formando un numero di colonie variabile. Inizialmente, ogni singola colonia visibile ad occhio nudo è stata isolata come una linea cellulare indipendente. Questo ha permesso di isolare per le OC314 i seguenti cloni: OC1, OC2, OC3, OC4, OC415, OC5, OC6, OC7 e OC9. Nel caso delle OV90, sono stati isolati i seguenti cloni: OV7, OV8, OV10. In ogni singolo clone, dopo un iniziale trattamento con l'LC50 della corrispondente linea parentale, i successivi trattamenti sono stati

realizzati alternando 72h senza trattamento a 72h di trattamento con il chemioterapico, usando concentrazioni di farmaco crescenti. In particolare, ogni due cicli la concentrazione di CDDP è stata incrementata di 1µM fino a duplicare l'LC50 della rispettiva linea parentale. I cicli sono stati alternati per circa sei mesi. Dopo la selezione, tutti i cloni sono stati coltivati da 2 a 4 settimane in assenza di CDDP per fornire alle cellule il tempo necessario di raggiungere la confluenza e di ristabilire la crescita. Infine, dopo circa 6 mesi dall'inizio dell'esperimento, è stato misurato l'LC50 di ogni clone.

Tutte le linee cellulari sono state coltivate in condizioni basali nel terreno RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contenente 11mM di glucosio e supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 2mM di L-glutammina, 100 μ g/mL di penicillina-streptomicina a 37°C, in atmosfera umidificata ed in presenza del 5% di CO₂.

3.2. Coorte dei pazienti pre-chemioterapia e post-chemioterapia

Il progetto MiPEO (i Mitocondri nella Progressione del carcinoma dell'Endometrio e dell'Ovaio) è stato approvato dal comitato etico locale nel 2011 (No.107/2011/U/Tess del 11.10.21). Nel corso di questo progetto presso l'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna sono state arruolate 17 pazienti con diagnosi di OC epiteliale sieroso alto grado. Sono state incluse le pazienti che alla diagnosi si presentavano con un tumore allo stadio IIIC e IV e le pazienti che hanno ricevuto un trattamento chemioterapico preoperatoria (neoadiuvante) con CDDP / PTX per più di 6 cicli prima dell'intervento citoriduttivo. Il consenso informato è stato ottenuto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki. Ai tessuti raccolti è stato poi assegnato un codice alfanumerico per assicurare l'anonimato della paziente. Per ogni paziente è disponibile il tessuto sano, il tessuto tumorale pre-terapia e post-terapia.

Metodi

3.3. Estrazione DNA

Il DNA è stato estratto dal pellet delle diverse linee cellulari e dai tessuti delle pazienti usando il kit GenElute[™] Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits seguendo il protocollo del kit (Sigma). La quantificazione è stata effettuata mediante metodo spettrofotometrico usando il NanoDrop2000, il quale fornisce indicazioni sulla concentrazione del campione e, valutando il rapporto tra l'assorbanza del DNA (260nm) e quella delle proteine (280 nm), permette di valutare il grado di purezza del campione.

3.4. Sequenziamento mtDNA

L'intero mtDNA è stato amplificato mediante 46 ampliconi che si sovrappongono coprendo così l'intera sequenza. Le 46 coppie di primers sono state disegnate in modo tale da permettere l'amplificazione specifica del mtDNA evitando di amplificare i *Nuclear mitochondrial DNA sequences* (Numts). La mix di reazione è stata realizzata in un volume finale di 10µl utilizzando la KAPA2G (Sigma) e 5ng di DNA. Il tutto è stato poi riposto in un termociclatore GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Successivamente il prodotto di reazione è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e, mediante 96 well MultiScreenRHTS PCR filter plates, il prodotto di PCR è stato purificato per evitare che eventuali residui della mix di PCR possano influenzare la lettura della sequenza. Il sequenziamento è stato effettuato mediante metodo Sanger. In questo caso la mix di reazione è stata realizzata in un volume finale di 10µl usando il prodotto di PCR (5-10ng) e BigDye Terminator v1.1 (Thermo Fisher). La reazione di sequenza è stata poi caricata al sequenziatore ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) per permettere la lettura delle sequenze. I 46 ampliconi sono stati analizzati e assemblati usando il software SeqScape version 2.5. Il calcolo della percentuale dell'eteroplasmia, (heteroplasmic fraction, HF) per le mutazioni puntiformi, è avvenuto mediante la valutazione dell'area presente sotto il picco dell'elettroferogramma mentre per l'inserzione è stata utilizzata la PCR fluorescente (F-PCR).

3.5. Analisi delle varianti del mtDNA

La pipeline MToolBox è stata utilizzata per estrapolare ed annotare le varianti alleliche di ciascun campione presente nel seguente studio¹⁵¹. Tale pipeline si basa sui seguenti step: filtraggio dei NumtS, processamento post-mapping, assemblaggio del genoma, predizione aplogruppo e annotazioni delle varianti. I *fasta file* di ogni campione sono stati caricati sull'applicativo MToolBox al fine di estrapolare le varianti mitocondriali. Il processo di estrapolazione delle varianti, si basa sul confronto della sequenza in esame con tre sequenze di riferimento comunemente utilizzate: rCRS, RSRS e MHCS. In particolare, quest'ultima deriva da 32 allineamenti multipli di sequenze mitocondriali di 14.144 pazienti sani disponibili su HmtDB appartenti a 32 macro-aplogruppi¹⁵². Nel multi-allineamento, per ogni specifico macro-aplogruppo, è stato effettuato un'analisi della composizione nucleotidica mediante SiteVar algorithm¹⁵³ al fine di determinare l'allele che con maggiore frequenza è presente in una specifica posizione. Il processo di estrapolazione realizzato con MToolBox prevede per ogni variante:

- La frequenza allelica di un sito specifico stimata sulla base dei multi-allineamenti di genomi di pazienti sani riportati in HmtDB;
- Predizione della patogenicità di varianti non-sinonime applicando gli algoritmi di MutPred¹⁵⁴, HumDiv- and HumVar-trained PolyPhen-2 models¹⁵⁵, SNPs&GO, PhD-SNP¹⁵⁶ e PANTHER algorithms¹⁵⁷. Ogni predittore assegna ad ogni variante un probabile score di patogenicità, ovvero una predizione qualitativa 'Disease', 'Neutral' or 'Unclassified'.
- Annotazione Mitomap che fornisce informazioni riguardo alla patologia associata alla mutazione che si manifesta in regioni codificanti, di controllo con i rispettivi livelli di omoplasmia ed eteroplasmia¹⁵⁸.
- Links OMIN (<u>http://omim.org</u>).

 Links Mamit-tRNA, il quale da maggiori informazioni riguardo la localizzazione spaziale della variante nella sequenza del tRNA mitocondriale¹⁵⁹.

Tutti questi dati sono attualmente reperibili su HmtVar in cui sono riportate 34.297 varianti che possono insorgere nelle regioni codificanti per le 13 proteine mitocondriali¹⁶⁰.

3.6. PCR fluorescente

La metodica è basata sull'amplificazione, usando uno dei due primer marcati con la fluoresceina al 5' della sequenza. Essa permette di identificare la percentuale di mtDNA mutato, nel caso si tratti dell'analisi di piccole inserzioni o delezioni. Gli amplificati sono stati caricati al sequenziatore ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). L'elettroferogramma ottenuto è visualizzato tramite il software GeneMapper v.3.5 mentre i picchi sono analizzati grazie al software Peak Scanner. I capillari in base alla lunghezza dell'amplicone emettono dei picchi relativi al numero di paia di basi. Sostanzialmente, per ciascun campione si otterranno due picchi: un picco relativo alla sequenza nucleotidica *wild type* e sulla destra una secondo picco che indica l'inserzione. L'area che sottende il picco fornisce informazioni sulla percentuale di DNA mutato.

3.7. Estrazione RNA

L'RNA è stato estratto dal pellet cellulare di circa 700.000 cellule, in un ambiente RNAsi free mediante kit TRIzol il quale, mediante fenolo e guanidina isocianato, permette di isolare l'RNA e degradare le altre componenti cellulari. Successivamente l'integrità dell'RNA è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, mentre la concentrazione e la purezza dell'RNA sono verificati mediante spettrofotometro.

3.8. Retrotrascrizione

L'RNA estratto è stato convertito in cDNA utilizzando il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Byosistems), il quale si base sull'utilizzo dell'enzima trascrittasi inversa. Per ogni campione sono stati retrotrascritti 300ng di RNA in un volume finale di 20µl.

3.9. Real time PCR quantitativa (qRT-PCR)

I campioni di cDNA ottenuti sono stati analizzati mediante qRT-PCR usando il SYBR Green (Promega) come fluoroforo intercalante nei doppi filamenti di DNA. Tale metodica permette l'amplificazione e la quantificazione simultanea del cDNA. Infatti, poiché si intercala nel cDNA a doppio filamento, la fluorescenza aumenta all'aumentare del prodotto di amplificazione. Al termine di ogni ciclo di amplificazione viene misurato il valore della fluorescenza che rappresenta la quantità di prodotto a doppio filamento sintetizzata fino a quel punto. Pertanto, la fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di cDNA.

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta sui seguenti geni di interesse:

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
ATP binding cassette subfamily C member 1 ABCC1	5'- CTGATGATGTTTTCCGGGCC-3'	5'-ATCCTCATGCCACTGACGAA-3'
ATP binding cassette subfamily C member 2 ABCC2	5'- TACCAATCCAAGCCTCTACC-3'	5'-AGAATAGGGACAGGAACCAG-3'
ATP binding cassette subfamily G member 2 ABCG2	5'- TAGCAGCAGGTCAGAGTGTG-3'	5'-TCATTATGCTGCAAAGCCGT-3'
SRY-box transcription factor 2 SOX2	5'-AGAACCCCAAGATGCACAAC-3'	5'-TCGGGGCCGGTATTTATAATC-3'
Nanog homeobox NANOG	5'-AGAACTCTCCAACATCCTGAACCT-3'	5'-TGCCACCTCTTAGATTTCATTCTCT-3'
POU class 5 homeobox 1 pseudogene 5 OCT4	5'- CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA-3'	5'-CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA-3'
Kruppel like factor 4 KLF4	5'- ACCCACACAGGTGAGAAACC-3'	5'-ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC-3'
CD36 molecule CD36	5'- TGATGAACAGCAGCAACATTCA-3'	5'-CAGCGTCCTGGGTTACATTTTC-3'
fatty acid binding protein 4 FABP4	5'- TGGGCCAGGAATTTGACGAA-3'	-5'-CACATGTACCAGGACACCCC-3'
peroxisome proliferator activated receptor alpha PPARα	5'-CTGGAAGCTTTGGCTTTACG-3'	5'-ACCAGCTTGAGTCGAATCGT-3'
peroxisome proliferator activated receptor delta PPARð	5'- CTCTATCGTCAACAAGGACG-3'	5'-GTCTTCTTGATCCGCTGCAT-3'
peroxisome proliferator activated receptor gamma PPARy	5'- GACCTGAAACTTCAAGAGTACCAAA-3'	5'-TGAGGCTTATTGTAGAGCTGAGTC-3'
ATP binding cassette subfamily A member 4 ABCA4	5'- AGAATAACCGGACGCTGCTC-3'	5'- TCACCAAACCGGGCATAGAC-3'
apolipoprotein A1 APOA1	5'- TGCCCACTCTATTTGCCCAG-3'	5'- CTCACTGGTCCTGGCAATGT-3'
heat shock protein family D (Hsp60) member 1 HSPD1	5'- CCTGCACTCTGTCCCTCACTC-3'	5'- GGTCTCATCTGGCGAAAGACT-3'
thioredoxin interacting protein TXNIP	5'- CAACTTGCTGCCCGACAAAA-3'	5'- TGGGTGGCATGCAAGGTATT-3'
diacylglycerol O- acyltransferase 1 DGAT1	5'- TCGCCTGCAGGATTCTTTAT-3'	5'- GCATCACCACACACCAGTTC-3'
PPARG coactivator 1 alpha PGC1α	5'- TGACTGGCGTCATTCAGGAG-3'	5'- CCAGAGCAGCACACTCGAT-3'
pyruvate dehydrogenase kinase 4 PDK4	5'- GCAGTGGTCCAAGATGCCTT-3'	5'- GTTCAACTGTTGCCCGCATT-3'
hypoxanthine phosphoribosyltransferase HPRT	5'- CATTGTAGCCCTCTGTGTGC-3'	5'- CCACCAATTACTTTTATGTCCCC-3'

Tabella 3.1 Sequenze primers utilizzati in qRT-PCR

Come normalizzatore è stato utilizzato il gene *HPRT*. Per la reazione di amplificazione e quantificazione dei trascritti è stata utilizzata la macchina Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System associata al Sequence Detection Systems (SDS) Software. Al termine della quantificazione, sono stati ottenuti i valori di ciclo soglia (*Cycle Threshold*, Ct) relativi a ciascun campione e utilizzati nell'elaborazione dati. Il valore ottenuto è stato utilizzato nel calcolo del Δ Ct come descritto di seguito:

 $\Delta Ct = Ct$ (controllo) – Ct (esperimento)

Il controllo è relativo al cDNA estratto dalle linee parentali e l'esperimento invece è rappresentato dal cDNA estratto dai cloni resistenti al CDDP. Tale valore viene utilizzato nella definizione del fold change come segue:

Il fold change permette di determinare la differenza di espressione di un trascritto tra due condizioni sperimentali diverse, in quanto indica il rapporto tra la quantità del trascritto del gene di interesse (target), rispetto alla quantità del trascritto del gene scelto per la normalizzazione dei dati¹⁶¹.

3.10. Saggio di vitalità

Il saggio SRB (Sulforodamina B) è un test colorimetrico che permette di analizzare la vitalità delle cellule sottoposte a trattamento. La sulforodamina B è un colorante rosa brillante che in condizioni acide si lega ai residui amminoacidici delle proteine cellulari. Infatti, le cellule vengono fissate con acido tricloacetico. La quantità del colorante rilevata dalla lettura allo spettrofotometro TECAN Microplate Readers è direttamente proporzionale al numero di cellule vive presenti in ogni pozzetto. Nel caso specifico di questo studio è stata valutata *in vitro* la citotossicità di chemioterapici a diverse concentrazioni. Le linee OC314 e OV90 sono state seminate, in piastre da 24 well, alla densità

cellulare rispettivamente di 7.500 e 15.000 ed incubate per 24h a 37°C e 5% CO₂. Il CDDP è stato diluito in terreno completo alle diverse concentrazioni riportate negli esperimenti.

3.11. *Citofluorimetria*

- Analisi dei marcatori di staminalità.

L'analisi citofluorimetrica permette di misurare e quantificare diverse caratteristiche cellulari, quali le dimensioni, il contenuto di acidi nucleici (DNA, RNA), la presenza di cellule vive e di cellule apoptotiche, l'espressione di specifici recettori di membrana, la distribuzione delle cellule nelle tre fasi del ciclo cellulare. La misurazione si basa sull'identificazione del segnale emesso da specifici fluorofori, generalmente coniugati ad anticorpi e impiegati per il riconoscimento di marcatori cellulari di interesse. Quando il campione viene eccitato da un laser ad una specifica lunghezza d'onda di eccitazione viene emesso un segnale di emissione la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità del fluorocromo legato.

In questo studio, per la valutazione della percentuale di cellule staminali presenti nella popolazione cellulare d'interesse, le linee OC314 e OV90 sono state seminate in piastre 6-well alla densità di 200.000 e 400.000, rispettivamente. Raggiunta la confluenza dell'80-90%, si è proceduto alla colorazione. Dopo la tripsinizzazione, le cellule in sospensione sono state incubate con la soluzione di blocking (2% FBS e 0,5% BSA in PBS). Per la colorazione sono stati utilizzati i seguenti anticorpi per i marcatori di staminalità: CD133 (1:400; coniugato con PE) e CXCR4 (1:200; coniugato con APC). Come controllo negativo sono stati utilizzati i rispettivi isotipi IgG1 (CD133-PE) e IgG2a (CXCR4-APC). Le cellule sono state poi risospese in una soluzione contente ZombieViolet (1:400; Violet) per discriminare le cellule vive dalle cellule morte. Successivamente i campioni sono stati caricati al Citofluorimetro Gallios (Beckman Coulter) l'analisi di espressione dei marcatori di staminalità è stata effettuata su 50.000 eventi. I dati sono stati analizzati mediante il software Flowing.

- Ciclo cellulare in citofluorimetria.

Per le analisi della distribuzione della popolazione nelle fasi del ciclo cellulare, le cellule sono state colorate con il propidio ioduro (PI), un colorante fluorescente, il quale lega il DNA in quantità stechiometriche permettendo, così di dedurre la fase del ciclo cellulare in funzione della quantità di DNA. Quando il laser monocromatico eccitata il campione, questo emette un segnale direttamente proporzionale alla quantità di fluorocromo legato, poiché il fluorocromo è presente in quantità di DNA presente. Le cellule sono state piastrate in fiasche da 25cm² alla densità cellulare di 300.000 OC314 e 600.000 OV90, e sono state analizzate al raggiungimento di una confluenza del 60-70%. Il pellet è stato risospeso in EtOH 70% freddo e sottoposto a colorazione. Sono stati utilizzati 10µl di PI e 100 µg/ml di RNasi A. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata su 50.000 eventi mediante Citofluorimetro Gallios (Beckman Coulter). I dati sono stati analizzati mediante il software Flowing.

3.12. Tempo di duplicazione cellulare.

Le linee cellulari sono state seminate in piastre da 24 well alla densità cellulare di 7.500 per le OC314 e 15.000 per le OV90 per 24 h. Al termine, le cellule sono state riposte in Incucyte, dove sono state acquisite 16 immagini per pozzetto ogni 24h per fino a 72h. Al termine dell'esperimento, applicando la maschera "cell by cell", sono state contate le cellule per ogni pozzetto e ad ogni tempo. I dati ottenuti sono stati normalizzati sul T0 e riportati in GraphPad. Per determinare il tempo di duplicazione cellulare è stata utilizzata la funzione: equazione esponenziale di crescita.

3.13. Oxygen consumption rate (OCR)

Il Seahorse XF24 Extracellular Flux Analizer (Seahorse Bioscence) è stato utilizzato per definire il profilo bioenergetico di linee in tempo reale. In particolare, è stato analizzato il tasso di consumo di ossigeno (OCR), che da informazioni relativamente ai livelli di respirazione mitocondriale. Le linee cellulari sono state piastrate in piastre XF-24 (Seahorse Bioscience) alla densità di 30.000 cellule per le OC314 e 50.000 cellule per le OV90, 24h prima dell'inizio dell'esperimento. Il giorno successivo, il terreno di coltura è stato sostituito con il terreno XF (Seahorse Bioscience) privo di sodio bicarbonato e FBS e supplementato con 10mM glucosio, 1mM Sodio piruvato, 2mM L-glutammina, ed è stata posta in incubatore senza CO_2 a 37°C per 1 ora per permettere alla temperatura e al pH di equilibrarsi. Successivamente la piastra viene riposta nello strumento Seahorse XF24 Extracellular Flux Analizer il quale effettua tre misurazioni in basale prima dell'iniezione di inibitori farmacologici delle subunità della catena respiratoria mitocondriale. Dopo sono aggiunti rispettivamente oligomicina (1mg/ml), FCCP (0,5 μ M), rotenone e antimicina A (1mM). I valori di OCR sono normalizzati sui livelli di proteina totale (saggio SRB, Sigma). Per ogni esperimento le linee cellulari sono state piastrate in cinque pozzetti e l'esperimento è stato realizzato tre volte. I dati ottenuti sono espressi in picomole di O_2 per minuto.

3.14. Misurazione parametri biochimici in citofluorimetria

La misurazione dei parametri biochimici di internalizzazione del glucosio, della massa mitocondriale, dei LD e del contenuto totale dei lipidi intracellulari è stata effettuata mediante citofluorimetria. Nel caso dell'internalizzazione del glucosio è stata utilizzata una sonda fluorescente analoga al glucosio 2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) coniugata con il fluorocromo FITC (spettro di emissione: 540 nm). Nel caso della massa mitocondriale è stata utilizzata la sonda MitoTracker Deep Red, che diffonde passivamente attraverso la membrana cellulare e si accumula nei mitocondri attivi. È coniugata ad un fluorocromo APC caratterizzato dal seguente spettro di emissione: 665 nm. Nel caso dei LD è stata utilizzata la sonda LD540, una sonda lipofilica è coniugata ad un fluorocromo PE con spettro di emissione di 545nm. Il contenuto totale dei lipidi intracellulare è stato quantificato mediante la sonda BODIPY 493/503. Come la precedente è una sonda lipofilica ma coniugata al fluorocromo FITC.

In entrambe le analisi, sono state valutate tali caratteristiche biochimiche nella popolazione totale e nella popolazione che esprime il marcatore di staminalità CD133. Le linee cellulari sono state piastrate in 6 well alla densità cellulare di 200.000 per le OC314 e 400.000 per le OV90. Raggiunta la confluenza dell'80-90% si è preceduti alla colorazione. Le cellule sono state tripsinizzate ed inizialmente è stata effettuata la colorazione con l'anticorpo CD133 (APC) 1:200, nel caso di 2-NDGB, LD540 e BODIPY e CD133 (PE) 1:400, nel caso del MitoTracker Deep Red. Come controllo negativo sono stati utilizzati rispettivamente i seguenti isotipi IgG1 (APC) e IgG1 (PE).

Dopo la colorazione, le cellule sono state risospese in una soluzione contente ZombieViolet (Violet) 1:400 per discriminare le cellule vive dalle cellule morte, 1µM 2-NDGB o 1nM MitoTracker Deep Red. Successivamente i campioni sono stati caricati al Citofluorimetro Gallios (Beckman Coulter), l'analisi dei parametri biochimici è stata effettuata su 50.000 eventi. I dati sono stati analizzati mediante il software Flowing ed espressi come intensità di fluorescenza media.

3.15. Saggio di formazione degli sferoidi

Il saggio di formazione degli sferoidi è comunemente utilizzato per selezionare ed arricchire la popolazione staminale. Il principio su cui si basa è l'abilità delle CSC di formare strutture sferiche in 3D in condizioni di ancoraggio indipendente. In questo studio sono stati realizzati due tipologie di saggi: pre-trattamento con CDDP in 2D e successive generazioni di sferoidi.

Pre-trattamento. Le linee cellulari sono state piastrate alla seguente densità cellulare: 150.000 OC314 e 300.000 OV90 in adesione in 2D. Il giorno successivo alla semina è stato aggiunto il trattamento utilizzando l'LC50 della linea parentale per 72h. Terminato il trattamento, le cellule sono state seminate in una piastra ultra-low attachment (ULA) per permettere la formazione degli sferoidi. Gli sferoidi sono stati contati dopo 7 giorni. Nel caso delle generazioni successive di sferoidi le linee cellulari sono state piastrate alla densità di 100.000 cellule in 6-well ULA. Il trattamento in CDDP è stato effettuato dopo la formazione dello sferoide. Dopo 7 giorni, gli sferoidi sono stati contati e piastrati per la Il generazione.

3.16. Analisi di espressione genica differenziale

L'espressione dei geni di staminalità è stata analizzata nel dataset TCGA in tumori primari. I 307 pazienti affetti da OC sono stati stratificati in base ai livelli di espressione dei marcatori di staminalità precedentemente valutati *in vitro*, in quartili. È stata condotta un'analisi di espressione differenziale tra i pazienti presenti nel quartile caratterizzato da un'alta espressione dei geni di staminalità e i pazienti presenti nel quartile a bassa espressione; i quartili intermedi non sono stati presi in considerazione. Per questa analisi è stato utilizzato il pacchetto R DESeq2¹⁶².

Il risultato ottenuto è un dataset virtuale che permette di analizzare i geni, la cui alta espressione e bassa espressione è associata all'*upregolazione* di ciascun marcatore di staminalità.

3.17. Analisi delle vie metaboliche

Per ogni marcatore di staminalità sono stati estrapolati ~20.000 geni. I geni sono stati filtrati secondo i seguenti criteri: Adj pvalue < 0,05; log2FC >1; log2FC < -1. Successivamente mediante il webtool Enrichr sono stati identificati i pathway metabolici significativamente associati.

3.18. Statistica

GraphPad Prism 8 è stato utilizzato per calcolare la significatività. Tutte gli esperimenti sono stati eseguiti almeno tre volte. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita confrontando le medie dei gruppi dei campioni esperimento rispetto al controllo. Tutti i dati sono presentati come media ± SD e il test t di Student è stato utilizzato per determinare la significatività, un p-value < 0,05 è stato considerato significativo.

4. Risultati e discussione

4.1. Generazione di linee di carcinoma ovarico resistenti al CDDP

La chemioterapia e l'intervento chirurgico di rimozione del tumore sono, attualmente, le principali strategie terapeutiche nelle pazienti affette da OC. Il farmaco maggiormente utilizzato è il CDDP o alcuni dei suoi analoghi. Dopo un'iniziale risposta positiva, la maggior parte delle pazienti sviluppa la resistenza ai chemioterapici che causa la formazione di recidive del tumore. Questo è uno dei maggiori ostacoli al successo della terapia. Diversi studi hanno associato la formazione di recidive all'abilità di una specifica sottopopolazione tumorale di resistere al trattamento e di espandersi¹⁶³. Quindi, lo studio della chemioresistenza e dei meccanismi che la regolano è uno dei campi di maggiore interesse nella ricerca di cure più efficaci per l'OC.

Nella prima parte del progetto si è posti l'obiettivo di validare l'ipotesi che i composti a base di platino possano causare l'insorgenza di mutazioni nel mtDNA che, a loro volta, possano indurre un'alterazione della fosforilazione ossidativa. Precedentemente, in studi *in vitro* ed *ex vivo* effettuati dal nostro gruppo^{146,147}, un rallentamento della proliferazione cellulare è stato riportato in associazione ad un deficit della OXPHOS, e di conseguenza ad una diminuita sensibilità ai chemioterapici. Queste modifiche agiscono soprattutto sulla popolazione tumorale altamente proliferante.

Al fine di valutare se le cellule resistenti al CDDP acquisiscono mutazioni nel mtDNA, due linee cellulari di adenocarcinoma sieroso, le OC314 e le OV90, sono state esposte al chemioterapico. Da esse sono state generate le rispettive linee resistenti. Inizialmente, è stato calcolato l'LC50 delle linee sensibili utilizzando concentrazioni crescenti di CDDP comprese tra 1-8µM e la vitalità è stata monitorata in un intervallo di tempo di 72h (Fig 4.1).



Figura 4.1 Misurazione LC50 delle linee parentali. Le linee sono state incubate per 72h in terreno completo con concentrazioni crescenti di CDDP comprese tra 1-8µM. Per il calcolo dell'LC50 la percentuale di vitalità è stata trasformata in Log10 e il valore dell'LC50 è stato ottenuto per interpolazione della retta.

I valori di LC50 per la linea OC314 e la linea OV90 sono rispettivamente di 2,5μM e 3,5μM (Fig 4.1).

Le linee resistenti sono state generate utilizzando come primo trattamento con CDDP la concentrazione dell'LC50 della corrispondente linea parentale. Dopo aver isolato i singoli cloni, questi sono stati esposti a successivi trattamenti, realizzati alternando 72h senza trattamento a 72h di trattamento con il chemioterapico, usando concentrazioni di farmaco crescenti (Fig 4.2).



Figura 4.2 Rappresentazione schematica dei trattamenti con CDDP per indurre la chemioresistenza.

Dopo sei mesi di trattamento cronico con CDDP è stato misurato l'LC50 di ogni clone, per valutare se tale trattamento cronico avesse selezionato una sottopopolazione di cellule con un LC50 al platino più elevato rispetto alla linea parentale. Il calcolo dell'LC50 è stato effettuato mediante un saggio di vitalità con SRB utilizzando concentrazioni di chemioterapico nell'intervallo tra 1 – 128 μ M (Fig 4.3, Fig 4.4).



4

Δ





Figura 4.3 I cloni resistenti delle OC314 mostrano un significativo aumento dell'LC50. Per ogni clone è riportata la curva di crescita e il calcolo dell'LC50. Le cellule sono state incubate per 72h con concentrazioni crescenti di CDDP. La vitalità è stata determinata mediante il saggio SRB. LC50 è stato calcolato dopo il trattamento di 72h in diverse concentrazioni di CDDP, usando la funzione log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters) mediante la seguente formula Y=Bottom + (Top-Bottom)/(1+10^{(LogIC50-X)*HillSlope)}). L'equazione è stata applicata su GraphPad Prism. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n = 3 (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).



Figura 4.4 I cloni resistenti delle OV90 mostrano un significativo aumento dell'LC50 Per ogni clone è riportata la curva di crescita e il calcolo dell'LC50. Le cellule sono state incubate per 72h con concentrazioni crescenti di CDDP. La vitalità è stata determinata mediante il saggio SRB. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 3 (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 **** p < 0.0001). L'LC50 è stato calcolato dopo il trattamento di 72h in diverse concentrazioni di CDDP, usando la funzione log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters) mediante la seguente formula Y=Bottom + (Top-Bottom)/(1+10^((LogIC50-X)*HillSlope)). L'equazione è stata applicata su GraphPad Prism.

I 9 cloni resistenti al CDDP ottenuti dalla linea cellulare OC314 (OC1, OC2, OC3, OC4, OC41s, OC5, OC6, OC7, OC9) presentano LC50 compreso tra 7,43 e 15,87μM (Fig 4.3), mentre i 3 cloni ottenuti dalla linea OV90 (OV7, OV8, OV10) presentano LC50 compreso tra 12,70 e 19,97μM (Fig 4.4).

Tutti i cloni analizzati risultano avere LC50 con valori che sono almeno triplicati rispetto alla linea parentale. Al fine di abbattere le differenze generate dal singolo clone è stato creato un *pool* in cui, per le OC314, sono stati selezionati cinque cloni in modo casuale: OC1, OC2, OC41S, OC5 e OC9 realizzando un'unica linea cellulare stabile resistente al CDDP: le OC314R. Parallelamente, per le OV90, unendo i cloni OV7, OV8 e OV10, è stata generata la linea resistente al CDDP: le OV90R.

Queste due linee, OC314R e le OV90R, rappresentano le linee cellulari resistenti utilizzate in tutti gli esperimenti di questo studio.

Per verificare che anche dopo il *pooling* le linee OC314R e OV90R mantengano un LC50 significativamente differente rispetto alla controparte sensibile, è stata valutata la vitalità cellulare utilizzando le concentrazioni di CDDP nell'intervallo tra $1 - 128\mu$ M (Fig 4.5).



Figura 4.5 OC314R e OV90R conservano la resistenza al CDDP. A. OC314 e in **B**. OV90. Per ogni linea è stata rappresenta la curva di crescita e il calcolo dell'LC50. Le cellule sono state incubate per 72h con diverse concentrazioni di CDDP. La vitalità è stata determinata mediante il saggio SRB. LC50 è stato calcolato, dopo il trattamento di 72h in diverse concentrazioni di CDDP, usando la funzione log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters) mediante la seguente formula Y=Bottom + (Top-Bottom)/(1+10^{(LogIC50-X)*HillSlope)). L'equazione è stata applicata su GraphPad Prism. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n = 3 (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 ****p < 0.0001).

Entrambe le linee resistenti non sono influenzate dal trattamento con il CDDP corrispondete alla concentrazione di LC50 delle linee sensibili. Infatti, la curva di crescita scende sotto il 50% di vitalità solo impiegando concentrazioni di chemioterapico maggiori del corrispettivo valore di LC50, quale 7,70µM per le OC314R e 13,36µM per le OV90R, raggiungendo il 30% di vitalità a 48µM. Nelle OC314R, l'LC50 è stato determinato a 7,70µM rispetto al 2,5µM della rispettiva linea parentale; la concentrazione del CDDP deve essere, dunque, triplicata per ottenere l'inibizione della crescita cellulare del 50%. Un significativo aumento dell'LC50 è stato osservato anche nelle OV90R. Infatti,

l'LC50 è stato identificato a 13,36μM rispetto al 3,5μM della linea parentale. In questo caso, la concentrazione del chemioterapico è quadruplicata. Questi dati confermano che le linee resistenti mantengono il fenotipo resistente al CDDP anche dopo il *pooling*.

Le cellule tumorali, dunque, in seguito all'esposizione al chemioterapico protratta nel tempo, sviluppano la resistenza al farmaco. Diversi studi hanno suggerito che questo fenomeno di resistenza sia associato all'aumento dell'efflusso di un'ampia classe di farmaci citotossici idrofobici. È un processo altamente controllato, mediato dai membri della famiglia di proteine trasportatrici dipendenti da energia, noti come trasportatori *ATP-binding cassette* (ABC)¹⁶⁴.

La sovraespressione di specifici trasportatori ABC nelle linee cellulari tumorali, nonché nei tumori, induce fenomeni di resistenza ai chemioterapici, che è il fattore principale che contribuisce al fallimento della chemioterapia¹⁶⁴.

4.2. Gli alti livelli di espressione dei trasportatori ABC come possibile meccanismo di sopravvivenza

L'estrusione di farmaci antitumorali da parte dei membri della famiglia dei trasportatori ABC è uno dei meccanismi di resistenza più conosciuti. Recentemente, mediante lo studio di ampi database di farmaci testati su linee cellulari caratterizzate, è stato possibile identificare molteplici substrati citotossici riconosciuti dai diversi trasportatori ABC¹⁶⁵.Tali trasportatori sono essenziali per molti processi cellulari che richiedono il trasporto di substrati attraverso le membrane cellulari¹⁶⁵. La superfamiglia dei trasportatori ABC è composta da 48 geni suddivisi in 7 sottofamiglie, da *ABCA* a *ABCG*¹⁶⁶. La maggior parte di questi geni codifica per proteine di membrana che hanno un ruolo importante nel trasporto, dipendente dall'energia, di xenobiotici, metaboliti e molecole di segnalazione attraverso le membrane cellulari, spesso contro il loro gradiente di concentrazione.

Tra questa superfamiglia almeno dodici membri sono stati coinvolti nel trasporto di farmaci antitumorali¹⁶⁵. Prove convincenti supportano attualmente il ruolo di tre di questi trasportatori nella chemioresistenza: *ABCC1* (Multidrug Resistance Protein 1 / MRP1), *ABCC2* (Multidrug Resistance Protein 2 / MRP2), *ABCG2* (Breast Cancer Resistance Protein / BCRP).

Queste proteine proteggono le cellule dalla tossicità causata da alte concentrazioni del farmaco. Esse intervengono riducendo la biodisponibilità e la concentrazione intracellulare tramite l'estrusione dei chemioterapici, tra cui il CDDP, nello spazio extracellulare grazie all'idrolisi di ATP. Al fine di verificare se le linee cellulari resistenti OC314R e le OV90R utilizzino questi trasportatori come meccanismo di sopravvivenza al farmaco, è stata valutata l'espressione genica di *ABCC1*, *ABCC2* e *ABCG2* (Fig 4.6).



Figura 4.6 Le linee resistenti mostrano alti livelli di espressione di alcuni trasportatori ABC. Analisi di qRT-PCR dell'espressione dei trasportatori ABC. La normalizzazione dell'espressione genica è stata eseguita sul gene *housekeeping* HPRT. Il *fold change* è stato calcolato usando il metodo $\Delta\Delta$ CT e utilizzando i valori delle linee sensibili come riferimento. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 3. (** p<0.001, *** p<0.001, ****p < 0.0001).

I risultati mostrano che *ABCC2* e *ABCG2* sono altamente espressi nelle linee cellulari OC314R e OV90R rispetto alla loro controparti sensibili; è da notare che i livelli di espressione di *ABCG2* aumentano di 15 volte nella linea cellulare OC314R e di 6 volte nella linea cellulare OV90R rispetto alle controparti sensibili (Fig 4.6).

Al contrario le linee cellulari non mostrano significative differenze di espressione in *ABCC1* rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.6). Questo dato suggerisce che il trattamento cronico con CDDP potrebbe esercitare una specifica pressione selettiva che permette di selezionare la sottopopolazione che esprime specifici trasportatori.

L'insieme di questi dati, in base ai meccanismi d'azione di queste proteine, suggerisce informazioni sulla modalità di acquisizione del fenotipo resistente. Potrebbero essere utilizzati meccanismi diretti e indiretti per l'estrusione del CDDP. Infatti, *ABCC2* utilizza un meccanismo diretto mediante il GSH. Questo svolge un duplice ruolo in quanto compete con il CDDP per il legame dei gruppi tiolici nelle proteine riducendo lo stress ossidativo indotto dal platino¹⁶⁷, e forma complessi con il chemioterapico che vengono eliminati nello spazio extracellulare da *ABCC2*¹⁶⁸.

Gli alti livelli di espressione di *ABCC2* osservati forniscono una duplice informazione: da un lato mettono in evidenza l'abilità della cellula resistente di "controllare" le alte concentrazioni del farmaco intracellulare, e dall'altro suggeriscono la presenza di un sistema detossificante che agisce mediante il GSH. Inoltre, recentemente Sancho e collaboratori hanno dimostrato come l'aumento della sintesi del GSH sia correlata al mantenimento della pluripotenza e del fenotipo staminale, e che l'inibizione della via di sintesi del GSH sensibilizza la popolazione CSC al trattamento con il chemioterapico¹⁶⁹.

Contrariamente ad *ABCC2*, *ABCG2* viene attivato indirettamente dal CDDP. Infatti, il suo substrato preferenziale è il Topotecan¹⁷⁰ ma il trattamento cronico con CDDP induce la modulazione dell'espressione e dell'attività del trasportatore mediante l'attivazione della via canonica e non canonica di Wnt¹⁷¹. In assenza di attivazione della via di Wnt, la β-catenina viene fosforilata

dall'enzima glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK3 β) e successivamente viene degradata. In seguito all'attivazione di Wnt, invece, GSK3 β viene inattivato e la β -catenina non fosforilata si accumula nel nucleo e attiva la trascrizione dei geni responsivi (Fig 4.7)¹⁷¹.



Figura 4.7 Rappresentazione schematica della via di Wnt¹⁷²

In particolare, la β-catenina svolge una duplice funzione: regola la trascrizione dei geni responsivi, in seguito all'attivazione di Wnt, ma è coinvolta anche nella stabilizzazione dei *rafts lipidici* facilitando l'assemblaggio di complessi trasportatori dei farmaci compreso *ABCG2*. In questo modo, la β-catenina favorisce l'efflusso del CDDP e abbassa i livelli intracellulari dei chemioterapici¹⁷³. Dunque gli alti livelli di espressione di *ABCG2* potrebbero essere una conseguenza indiretta del trattamento con il platino mediante l'attivazione della via di Wnt.

Al fine di valutare la presenza di mutazioni nei geni coinvolti nella via Wnt nelle linee utilizzate in questo studio è stata condotta un'analisi bioinformatica. Mediante il webtool *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) sono stati identificati i 150 geni coinvolti nella via Wnt, e la presenza di eventuali mutazioni in questi geni è stata ricercata nel profilo genetico delle linee OC314 e OV90 presente nel
database Cell Model Passports (<u>https://cellmodelpassports.sanger.ac.uk/</u>). L'analisi ha mostrato la presenza di 6 geni mutati coinvolti nella via Wnt nella linea cellulare OC314 (Tab 4.1)

Gene	Mutazione Driver	Posizione	Тіро
WNT10A	no	p.E52fs*29	frameshift
WNT2B	no	p.V150fs*1	frameshift
AXIN2	si	p.P25fs*51	frameshift
AXIN2	si	p.G665fs*24	frameshift
CACYBP	no	p.V145fs*22	frameshift
PPP2R5E	no	p.K174fs*3	frameshift
ROCK2	no	p.W138fs*31	frameshift

Tabella 4.1 Rappresentazione delle mutazioni nei geni coinvolti nella via Wnt nella linea cellulare OC314.

I geni *WNT10A* e *WNT2B* sono 2 dei 19 geni che codificano per i ligandi che attivano la via canonica^{125,174}. Tutti gli altri sono coinvolti nella regolazione negativa della via Wnt: *AXIN2* promuove la fosforilazione e la degradazione della β -catenina¹⁷⁵, *CACYBP* promuove la degradazione della β -catenina non fosforilata¹⁷⁶, *PPP2R5E* esercita una funzione inibitoria sulla via Wnt¹⁷⁷ e infine *ROCK2* favorisce l'attivazione della *GSK3B* con la conseguente degradazione della β -catenina¹⁷⁸. Parallelamente nelle OV90 è stata identificata una mutazione in *SMAD4* (Tab 4.2).

Gene	Mutazione Driver	Posizione	Тіро
SMAD4	si	p.R445*	nonsenso

Tabella 4.2 Rappresentazione delle mutazioni nei geni coinvolti nella via Wnt nella linea cellulare OV90.

Anche in questo caso la funzione di *SMAD4* è quella di inibire l'attività della via Wnt¹⁷⁹. L'analisi del profilo genetico suggerisce che la presenza di queste mutazioni, presenti prevalentemente in geni che hanno la funzione di inibire la via Wnt, potrebbe favorire l'attivazione di tale via nelle linee parentali. Sulla base di queste considerazioni, al fine di confermare che gli alti livelli di espressione di *ABCG2* potrebbero essere indotti dalla via di Wnt, è stata effettuata un'analisi di correlazione

genica in cui è stata valutata l'espressione di *ABCG2* in relazione ai fattori coinvolti nell'attivazione della via Wnt utilizzando il dataset TGCA. È stato osservato che nelle pazienti affette da OC, elevati livelli di *ABCG2* correlano positivamente con l'espressione di alcuni fattori coinvolti nella via di Wnt. Tra questi sono stati presi in considerazione *WNT5A*, che è un attivatore della via di segnalazione non canonica¹⁸⁰, *WNT2B*, che è uno dei principali attivatori della via canonica¹⁸¹ e CTNNB1, che è attivata nella via canonica (Fig 4.8).



Figura 4.8 Rappresentazione schematica dell'attivazione della via A. canonica e B. non canonica di Wnt¹⁸²



Figura 4.9 ABCG2 correla positivamente con WNT5AB, WNT2B, CTNNB1. L'analisi di correlazione di espressione genica è stata realizzata utilizzando il dataset TCGA valutando l'espressione dei geni target in 307 pazienti affette da OC. La correlazione è stata valutata mediante il webtool Tucana.

Le analisi di correlazione mostrano che *ABCG2* correla in modo positivo con *WNT5A* (pValue=0,00005), *WNT2B* (pValue=0,00000182) e *CNNB*1 (pValue=0,00997), suggerendo quindi l'attivazione della via canonica e non canonica di Wnt (Fig 4.9).

Inoltre, poiché il platino non è un substrato del trasportatore, *ABCG2* potrebbe essere considerato un marcatore di chemioresistenza in quanto la sua espressione è stata frequentemente osservata in popolazioni di cellule tumorali aventi una maggiore capacità di auto-rinnovamento e un maggiore potenziale tumorigenico¹⁸³. Nello specifico, Muñoz-Galván e collaboratori hanno dimostrato un aumento dei livelli di espressione di *ABCG2* in sferoidi di linee di OC rispetto alla condizione di aderenza, suggerendo questo come marcatore di staminalità¹¹⁴. Parallelamente, nel nostro contesto, un'attivazione di Wnt/β-catenina potrebbe suggerire l'acquisizione di caratteristiche *stem-like* nelle linee OC314R e OV90R resistenti al chemioterapico. Infatti, tale via è richiesta per l'acquisizione del fenotipo staminale, per il *self-renewal* e per il differenziamento delle cellule progenitrici^{86,184}, parallelamente la via di segnalazione di Wnt non canonica è coinvolta nel mantenimento del fenotipo staminale¹⁸⁵. Questo potrebbe indirettamente suggerire come il CDDP sia coinvolto nell'arricchimento delle CSC.

Queste considerazioni suggeriscono che gli elevati livelli di espressione di *ABCC2* e *ABCG2* possano essere indicativi della capacità di esportazione del platino nello spazio extracellulare e dell'acquisizione di caratteristiche *stem-like* delle linee resistenti OC314R e OV90R: due importanti meccanismi di chemioresistenza^{66,73}.

74

4.3. Le linee chemioresistenti mostrano una riprogrammazione metabolica verso il metabolismo glicolitico

Nel paragrafo precedente, mediante il calcolo dell'LC50 e l'analisi di espressione dei trasportatori ABC, è stata confermata l'acquisizione del fenotipo chemioresistente nelle linee di OC: OC314R e OV90R. Attualmente, il contributo della riprogrammazione metabolica in risposta al trattamento chemioterapico è ancora dibattuto^{120,121}, nonostante la riprogrammazione del metabolismo cellulare sia stata saldamente collegata alla sopravvivenza delle cellule tumorali trattate con chemioterapici^{119,122,137}. Tale riprogrammazione potrebbe conferire alle cellule una flessibilità tale da permettere di sopravvivere anche in presenza di elevate concentrazioni di farmaco. L'OC può essere classificato, in base al profilo energetico, in due sottogruppi: quello ad alto profilo OXPHOS e quello a basso profilo OXPHOS¹²². I tumori con alto profilo OXPHOS mostrano un incremento della respirazione mitocondriale, dell'espressione delle proteine della catena di trasporto mitocondriale e da uno stress ossidativo cronico; al contrario, quelli con basso profilo OXPHOS sono caratterizzati da una prevalenza del metabolismo glicolitico. Nel contesto dell'OC, lo stress ossidativo cronico potrebbe assumere un ruolo chiave proprio in relazione alla risposta alla chemioterapia. Infatti, il trattamento a base di platino e taxani induce un aumento di ROS in linee cellulari, aventi un alto profilo OXPHOS, rispetto al basso profilo OXPHOS¹²². L'aumento dei ROS è associato ad un'incrementata perossidazione lipidica e ad un'alterazione dell'omeostasi del ferro con conseguente morte per ferroptosi. Queste caratteristiche determinano una maggiore sensibilità alla chemioterapia delle linee cellulari aventi un alto profilo OXPHOS¹²². Al fine di caratterizzare il profilo energetico, dei modelli cellulari utilizzati in questo studio, e di valutare se questo sia riprogrammato a seguito della selezione di cellule resistenti al CDDP, è stata valutata la capacità della OXPHOS tramite la piattaforma Seahorse XF Analyzer (Fig 4.10A). Questa analisi permette di misurare la respirazione mitocondriale in relazione al tasso di consumo di ossigeno (OCR). L'analisi del profilo energetico prevede la misurazione della respirazione basale e la misurazione in seguito all'aggiunta di inibitori o stimolatori della respirazione mitocondriale. L'oligomicina, in quanto inibitore dell'ATPasi, riduce quasi a zero la respirazione mitocondriale; il disaccoppiante Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) stimola fortemente la respirazione al di sopra dei livelli basali; il rotenone inibisce il CI della catena di trasporto degli elettroni misurando il contributo del CI nella respirazione cellulare; infine l'inibitore del complesso III, l'antimicina A, induce il collasso della respirazione mitocondriale e consente il calcolo della respirazione non mitocondriale.



Figura 4.10 Le linee resistenti mostrano un basso profilo OXPHOS e un metabolismo prevalentemente glicolitico. Il profilo OCR è stato misurato utilizzando la piattaforma Seahorse XF-24 (Seahorse Biosciences). Le cellule sono state seminate in una piastra di coltura Seahorse da 24 pozzetti a una densità di 30.000 cellule per pozzetto. I composti sono stati iniettati durante il test e l'OCR è stato misurato utilizzando dei tempi di misurazione di 2 minuti. A Le misurazioni di OCR (pMols/min) sono state eseguite dopo le iniezioni di 1 mM di oligomicina (Oligo), 0,5 mM di FCCP, 1 mM di rotenone (R) e 1 mM di antimicina A (AA). I dati (media \pm SD) sono espressi come picomoli di O₂ al minuto. B Analisi dell'internalizzazione del glucosio in citofluorimetria mediante la sonda 2-NDGB (FITC). La sonda è stata incubata per 30min. Per ogni linea sono stati analizzati 50.000 eventi. L'analisi è stata effettuata usando il software Flowing. L'intensità di fluorescenza media (MFI) delle linee resistenti è stata normalizzata su quella delle rispettive linee sensibili.

I risultati mostrano che le linee OC314R e OV90R sono caratterizzate da un'alterazione della respirazione mitocondriale rispetto alle controparti sensibili (Fig 4.10A). Infatti, le linee resistenti sono caratterizzate da una respirazione basale inferiore rispetto alla controparte sensibile (OC314R 370 pmolO₂/min vs. OC314 1022 pmolO₂/min; OV90R 500 pmolO₂/min vs. OV90 700 pmolO₂/min), nello specifico la linea OC314R non è fortemente stimolata dall'FCCP a livelli più alti rispetto all'OCR basale, indicando una riduzione della capacità respiratoria massima rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.10A). Si può concludere che le linee cellulari OC314R e le OV90R mostrano un deficit della OXPHOS ed un ridotto profilo energetico. Questo è particolarmente evidente confrontando la linea cellulare OC314R con la rispettiva controparte sensibile OC314, invece nelle OV90R si osserva una capacità respiratoria più bassa solo nella respirazione basale (Fig 4.10A). In conformità con i dati riportati da Gentric et al¹²², le linee sensibili sono caratterizzate da una maggiore capacità respiratoria e appaiono avere un alto profilo OXPHOS; data la ridotta capacità di respirazione mitocondriale, le linee resistenti possono essere definite a basso profilo OXPHOS¹²².

Al fine di valutare se il decremento del metabolismo OXPHOS, osservato in relazione all'acquisizione della resistenza al CDDP, sia associato all'acquisizione di un metabolismo glicolitico è stata valutata, mediante citofluorimetria, la capacità delle linee sensibili e resistenti di internalizzare il glucosio (Fig 4.10B). A tal fine, è stata utilizzata la sonda fluorescente analoga del glucosio 2-NDGB coniugata al fluorocromo FITC. I risultati mostrano che entrambe le linee resistenti presentano un'aumentata capacità di internalizzare il glucosio rispetto alla controparte sensibile. Nella linea OC314R il glucosio internalizzato aumenta di 1,6 volte (pvalue=0,0022) parallelamente nelle OV90R l'aumento è di 1,75 volte (pvalue =0,0011) rispetto alle controparti sensibili (Fig 4.10B).

Molteplici studi hanno messo in evidenza che un incremento dell'internalizzazione del glucosio e un profilo metabolico prevalentemente glicolitico siano in grado di indurre la resistenza al platino in

diversi tipi di tumore^{125,127,129}, sebbene questa osservazione non sia univoca. Dar e collaboratori dimostrarono invece che linee di OC sensibili al CDDP mostrano un profilo energetico glicolitico e la rispettiva controparte resistente presenta un profilo altamente energetico con la capacità di riprogrammare il proprio metabolismo¹¹⁹. Il metabolismo glicolitico potrebbe apparire svantaggioso rispetto all'OXPHOS, considerando che quest'ultimo risulta nella produzione di 36 molecole di ATP rispetto alle 2 molecole di ATP per molecola di glucosio. Tuttavia, nella glicolisi il tasso di produzione di ATP è più veloce rispetto all'OXPHOS, permette la produzione di una serie di intermedi coinvolti nella biosintesi di lipidi e degli acidi nucleici e riduce la produzione di ROS limitando il flusso del piruvato nei mitocondri. Inoltre, in seguito all'esterificazione del glucosio in glucosio 6 fosfato (G6P), la glicolisi può diramarsi nella via metabolica PPP. Questa svolge un ruolo chiave nella produzione del NADPH che, in quanto substrato dell'enzima glutatione reduttasi, è fondamentale per rigenerare il GSH, il quale ha la funzione di contrastare lo stress ossidativo indotto dal CDDP¹⁸⁶. La via dei PPP è stata ampiamente analizzata da Catanzaro e collaboratori, infatti la linea cellulare tumorale di cervice uterina C13, resistente al CDDP, mostra un basso profilo OXPHOS e una dipendenza dalla glicolisi¹³⁷. Parallelamente è caratterizzata da un'elevata capacità enzimatica del glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PDH) l'enzima limitante della via dei PPP, e da alti livelli di GSH, suggerendo che l'aumentata richiesta di glucosio, nelle linee resistenti al CDDP, potrebbe essere dovuta alla necessità di mantenere le difese antiossidanti¹³⁷. Risultati analoghi sono stati raggiunti da Xu e collaboratori in linee di OC¹⁸⁷. Alla luce di queste osservazioni, si potrebbe ipotizzare che nelle linee OC314R e le OV90R, in risposta al trattamento cronico con CDDP, l'incremento del metabolismo glicolitico si manifesti per la necessità di bilanciare lo stress ossidativo indotto dal platino. Infatti, uno stress ossidativo cronico è stato riportato come la condizione fondamentale affinché linee di OC siano sensibili al chemioterapico¹²².

4.4. Effetto del trattamento cronico con CDDP sul ciclo cellulare.

Gli esperimenti precedenti hanno messo in evidenza che l'insorgenza della resistenza al CDDP è associato ad un basso profilo OXPHOS nelle line di OC. Questo, insieme al rallentamento della proliferazione cellulare, è considerato una caratteristica delle linee resistenti al platino, che appaiono prone ad accumulare mutazioni mitocondriali^{146,147}.

Il rallentamento del ciclo cellulare è uno dei principali fattori coinvolti nella chemioresistenza. Infatti, la maggior parte dei chemioterapici agisce prevalentemente sulla popolazione tumorale caratterizzata da un fenotipo altamente proliferante. Al contrario, una subpopolazione rallentata è in grado di eludere l'effetto dei farmaci antitumorali. Il ciclo cellulare è un meccanismo strettamente regolato, infatti le cellule che subiscono un danno al DNA non avanzano alla fase che segue quella in cui è avvenuto il danno. Il blocco fornisce l'intervallo di tempo necessario in cui il DNA può essere riparato prima dell'eventuale ingresso nella fase M¹⁸⁸. Pertanto, al fine di valutare se l'induzione della resistenza e l'acquisizione del basso profilo OXPHOS siano associati ad un rallentamento della proliferazione cellulare, è stata monitorata la crescita delle linee sensibili e resistenti nell'arco di 72h in assenza di trattamento (Fig 4.11).



La linea sensibile OC314, nell'intervallo di tempo di 72h, mostra una crescita che risulta essere 3,7 volte inferiore rispetto alla crescita delle linee sensibili (Fig 4.11). Le cellule OV90, invece, sono caratterizzate da una crescita che risulta essere ridotta di 2,3 volte rispetto al tasso di proliferazione della linea sensibile (Fig 4.11). Questi dati confermano che l'acquisizione del fenotipo resistente è associata ad un rallentamento della proliferazione cellulare.

Per valutare se il rallentamento della crescita è determinato da un blocco in una delle fasi del ciclo cellulare, è stata analizzata la distribuzione delle cellule nelle tre fasi G0/G1, S e G2/M nelle linee resistenti al CDDP rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.12A). Il ciclo cellulare è stato analizzato in citofluorimetria mediante la colorazione delle cellule con Propidio ioduro (PI), questo ha permesso di quantificare la percentuale di cellule nelle fasi G0/G1, S e G2/M del ciclo cellulare.

Figura-4.11 Le linee resistenti al CDDP presentano una riduzione della proliferazione cellulare. Valutazione della proliferazione cellulare delle linee sensibili e resistenti in assenza di trattamento chemioterapico. La crescita è stata monitorata per 72h, e normalizzata sul t0. Nelle immagini, nero e il grigio rappresentano le linee sensibili, mentre il viola ed il verde mostrano le linee resistenti. I dati sono rappresentati come media \pm SD, n = 3. (*** p<0.001, ****p < 0.0001).



Figura 4.12 L'acquisizione della resistenza al CDDP è associata ad una riduzione del tasso di proliferazione. **A.** Ciclo cellulare è stato analizzato in citofluorimetria mediante colorazione con PI. L'analisi è stata effettuata in assenza di trattamento. Per ogni linea sono stati analizzati 50.000 eventi. Nel grafico sono mostrate le percentuali di cellule positive al PI per ogni fase. **B**. Tempo di duplicazione cellulare analizzato mediante Incucyte. Le linee cellulari sono state contate ogni 24h usando la maschera *cell by cell*. I dati ottenuti sono stati normalizzati sul T0. Per determinare il tempo di duplicazione cellulare è stata utilizzata la funzione: equazione esponenziale di crescita in Graphpad. I dati sono rappresentati come media ± SD (n= 4; *p<0.05, ** p<0.01, ****p < 0.0001).

I risultati dimostrano un significativo accumulo in G1 nelle cellule OC314R (57%, p=0,0001) e OV90R (56%, p=0,0001) rispetto alle controparti sensibili OC314 (47%) e OV90 (46%) (Fig 4.12A). L'accumulo delle cellule in fase G1 è accompagnato da una riduzione delle cellule in fase G2. Non si osservano, invece, significative differenze in fase S. Il blocco in fase G1 potrebbe conferire un

rallentamento nella progressione del ciclo cellulare. È generalmente osservato che il blocco del ciclo cellulare è la conseguenza di un danno al DNA. Il CDDP induce un danno citotossico ed il principale meccanismo coinvolto è la riparazione per escissione di nucleotidi (NER). Il blocco in G1 potrebbe, infatti, fornire l'intervallo di tempo necessario per reclutare il complesso NER e permettere la rimozione degli addotti promuovendo così la riparazione del danno e ristabilire l'integrità del genoma. Solo quando il riparo non viene completamente effettuato, le cellule vanno incontro ad apoptosi¹⁸⁹. Inoltre, il blocco in fase G1 potrebbe conferire una "protezione" alle linee resistenti, in quanto i chemioterapici agiscono generalmente su cellule caratterizzate da un fenotipo altamente proliferante.

A corroborare il blocco in fase G1, nelle stesse linee si manifesta un rallentamento del tempo di duplicazione cellulare (Fig 4.12B). Il tempo di duplicazione è stato valutato ogni 24h nell'intervallo di tempo di 72h, utilizzando la piattaforma Incucyte. Le cellule OC314 e OV90 sono caratterizzate, rispettivamente, da un tempo di duplicazione di 20h e 40h; le rispettive controparti resistenti aumentano il tempo di duplicazione, risultando essere di 35h nelle OC314R e 64h nella OV90R (Fig 4.12B). L'insieme di questi dati mette in evidenza che le linee resistenti al CDDP, acquisiscono un fenotipo caratterizzato da un aumento delle cellule in fase G1 e da una riduzione del tasso di proliferazione.

Come precedentemente dimostrato dal nostro gruppo, il ridotto tasso di proliferazione cellulare osservato nella linea cellulare C13 potrebbe essere innescato da un danno mitocondriale causato da mutazioni omoplasmiche in regioni codificanti del mtDNA¹⁴⁷. Queste possono causare alterazioni funzionali delle attività dei complessi della catena di trasporto degli elettroni. La duplicazione cellulare è un meccanismo strettamente controllato che richiede energia. Durante la proliferazione cellulare, la fase G1 è supportata dall'energia derivata dalla respirazione mitocondriale e la

replicazione del DNA (fasi S / G2 / M) è supportata dall'energia che non è generata mediante la respirazione. Infatti, l'inizio della divisione cellulare e la costituzione di nuove cellule potrebbe favorire il metabolismo glicolitico¹⁹⁰. Inoltre, è stato osservato che l'arresto in G1/S potrebbe essere innescato da stress metabolico¹⁹¹. Questi studi sono stati confermati da Owusu-Ansah il quale osservò che mutazioni nei geni codificanti per le subunità del CI e CIV causano una disfunzione mitocondriale che, mediante un segnale retrogrado, determinano il blocco in fase G1/S¹⁹². In conclusione, il rallentamento della crescita, insieme alla riduzione della capacità respiratoria, conferisce un fenotipo resistente che si evidenzia con un incremento del LC50. Queste riflessioni suggeriscono, anche in questi modelli cellulari, l'insorgenza di mutazioni mitocondriali a seguito di trattamento con CDDP.

4.5. L'effetto del CDDP sulle mutazioni del mtDNA

In questa parte dello studio si vuole verificare se il trattamento cronico con CDDP possa indurre l'insorgenza di mutazioni nel mtDNA, che potrebbero essere responsabili dell'alterazione dell'OXPHOS e della conseguente riduzione della proliferazione cellulare. Questo permetterebbe di associare l'insorgenza delle mutazioni patogene del mtDNA alla chemioresistenza in OC.

4.5.1. Analisi del mtDNA in linee resistenti al CDDP

Con l'obiettivo di validare l'ipotesi che il rallentamento del metabolismo OXPHOS e della proliferazione cellulare, osservato nelle linee resistenti al CDDP, possa essere indotto dalle mutazioni mitocondriali, è stato sequenziato il mtDNA delle linee OC314 e OV90 sensibili e resistenti. Nella linea resistente OC314R il trattamento cronico con CDDP ha indotto l'insorgenza di due nuove mutazioni, m.1411G>A in *MT-RNR1* (Fig 4.13) e m.12425insA in *MT-ND5* (Fig 4.14). La mutazione in *MT-RNR1* mostra un *heteroplasmic fraction* (HF)=20%.



Figura 4.13 Elettroferogramma della m.1411G>A presente solo nelle OC314R

L'inserzione in *MT-ND5* è caratterizzata da un HF =6.8% (Fig 4.14).



Figura 4.14 Elettroferogramma della m.12425insA presente solo nelle OC314R

Invece il trattamento cronico con CDDP nelle cellule OV90R non induce l'insorgenza di nuove mutazioni ma modifica il carico mutazionale di varianti già presenti nella linea sensibile (Fig 4.15).



Figura 4.15 Elettroferogrammi delle mutazioni A. MT-CYTB, B. MT-TL2 presenti nella linea cellulare OV90R.

Nella linea OV90R viene selezionata negativamente la mutazione in *MT-CYTB* e parallelamente si assiste alla selezione positiva della mutazione in *MT-TL2* (Fig4.15), suggerendo che queste due mutazioni siano presenti su differenti molecole di mtDNA.

Questa prima analisi realizzata sulle linee cellulari OC314R e OV90R, che hanno acquisito la resistenza al farmaco, mostra che il chemioterapico può indurre l'acquisizione di nuove mutazioni e modificare i livelli di eteroplasmia di mutazioni già presenti nella controparte sensibile. Diventa necessario confermare quanto osservato *in vitro*, nelle pazienti che hanno sviluppato la resistenza al CDDP e condurre un'analisi al fine di determinare la patogenicità delle mutazioni osservate nelle linee cellulari, valutando dunque gli effetti funzionali.

4.5.2. Analisi del mtDNA nella coorte di pazienti pre e post-chemioterapia

Come primo aspetto ci si è focalizzati sulla valutazione delle mutazioni nel mtDNA nelle pazienti affette da OC che hanno subito trattamenti a base di CDDP e PTX. Infatti studi precedenti effettuati dal nostro gruppo hanno dimostrato l'acquisizione di un fenotipo oncocitico in una massa tumorale di OC, dopo un trattamento chemioterapico a basa di CDDP e paclitaxel (PTX)¹⁴⁶. L'insorgenza di una

mutazione omoplasmica in *MT-ND4* nel tessuto post chemioterapia potrebbe determinare difetti bioenergetici che conferiscono un vantaggio per la resistenza al PTX. Infatti, come conseguenza all'effetto *oncojanus,* la massa tumorale mostra un fenotipo non invasivo e quiescente. Questo ha favorito la selezione di un clone tumorale resistente, ma quiescente durante il trattamento con CDDP e PTX, in quanto questi chemioterapici agiscono su cellule tumorali caratterizzate da un alto tasso di proliferazione¹⁴⁶.

Considerando queste premesse e le osservazioni effettuate sulle linee cellulari utilizzate in questo studio, al fine di comprendere se la chemioterapia a base di CDDP possa indurre l'insorgenza di nuove mutazioni del mtDNA nei campioni post-chemioterapia e se la presenza di mutazioni del mtDNA possa influenzare la risposta alla chemioterapia nelle pazienti affette da OC, è stato condotto uno studio pilota. In questo studio è stata analizzata la presenza di mutazioni del mtDNA in un set di 34 campioni di OC provenienti dalle stesse pazienti prima della chemioterapia e dopo aver subito il trattamento a base di CDDP e PTX, collezionati nell'ambito del progetto MiPEO. I campioni sono stati suddivisi in due gruppi: 17 tessuti tumorali, derivati da masse tumorali ovariche rimosse chirurgicamente prima della chemioterapia e 17 tessuti tumorali ovarici, raccolti dopo il trattamento chemioterapico standard. Tutti i tessuti post-chemioterapia sono stati raccolti dopo sei cicli di trattamento con CDDP e PTX.

In una prima analisi è stata valutata la risposta alla chemioterapia in funzione delle mutazioni nel mtDNA. Questo tipo di analisi permette di verificare se la presenza di mutazioni nel mtDNA possa essere correlata alla risposta alla chemioterapia. Le pazienti sono state classificate in chemioresistenti (CR) e chemiosensibili (CS) in base al tempo di ricaduta. Se la ricaduta si è manifestata in un intervallo di tempo minore di sei mesi, la paziente è stata considerata CR; se invece, la ricaduta si è verificata in un intervallo di tempo maggiore di sei mesi la paziente è stata considerata CS. (Tab 4.3)

Pazienti	Risposta alla Chemioterapia	Chemiosens (CS)/ Chemioresist (CR)	Tempo di ricaduta
M3	Completa	CS	>12m
M5	Completa	CS	>12m
M8	Parziale	CS	>12m
M11	Completa	CS	>12m
M12	Parziale	CS	>12m
M1	Nulla	CR	<6m
M4	Nulla	CR	<6m
M6	Nulla	CR	<6m
M7	Nulla	CR	<6m
M9	Parziale	CR	<6m
M10	Nulla	CR	<6m
M13	Parziale	CR	<6m
M15	Nulla	CR	<6m
M16	Nulla	CR	<6m
M18	Nulla	CR	<6m
M19	Parziale	CR	<6m
M21	Nulla	CR	<6m

Tabella 4.3 Pazienti pre- chemioterapia e post-chemioterapia classificati in base alla risposta alla chemioterapia. CS chemiosensibile, CR chemioresistente.

Per ogni campione sono disponibili il tessuto tumorale e il tessuto sano. Le varianti trovate solo nei tessuti tumorali e assenti nei tessuti normali corrispondenti sono state classificate come mutazioni somatiche (Fig 4.16).



Figura 4.16 Mutazioni mtDNA presenti nei due gruppi CR e CS.

Nel gruppo CS, costituito da cinque pazienti, sono state riscontrate delle mutazioni in 1/5 pazienti (20%). Nel gruppo CR, costituito da dodici pazienti, sono state riscontrate varianti in 7/12 pazienti (58,3%) (Fig 4.16).

Nel dettaglio nel gruppo CS è stata identificata la seguente variante m.12758T>Y in *MT-ND5* (Tab 4.4).

Pazienti	Chemiosens (CS)/ Chemioresist (CR)	Posizione	Gene	Cambio AA	Variabilità Nt	Frequenza allelica	Disease score
M3	CS	m.12758T>Y	MT-ND5	F141S	0.00	0.000000	0.863
M5	CS	-					
M8	CS	-					
M11	CS	-					
M12	CS	-					

Tabella 4.4 Mutazioni mtDNA presenti nel gruppo CS.

Nel gruppo CR sono state identificate 12 varianti, nel dettaglio: M1 m.2446 A>R *MT-RNR2*, M4 m.7162 G>R in *MT-CO1*, M6 m.1913 G>R in *MT-RNR2*, m.2702 G>R in *MT-RNR2*, m.12213G>R in *MT-TS2*, M9 m.6179G>R in *MT-COI*, m.13758C>Y in *MT-ND5*, m.15106G>R in *MT-CYTB*, m.16293A>G in *MT-DLoop*, M13 m.11742G>R in *MT-ND4*, M18 m.8470A>R in *MT-ATP8*, M19 m.12425delA in *MT-ND5*. Sono state considerate tutte le mutazioni presenti sia in regioni codificanti che in regioni non codificanti (Tab 4.5).

Pazienti	Chemiosens (CS)/ Chemioresist (CR)	Posizione	Gene	Cambio AA	Variabilità Nt	Frequenza allelica	Disease score
M1	CR	m.2446 A>R	MT-RNR2	-	0.01		
M4	CR	m.7162 G>R	MT-CO1	G420D	0.00	0.000000	0.853
		m.1913 G>R	MT-RNR2	-	0.000112	0.000024	
M6	CR	m.2702 G>R	MT-RNR2	-	0.006646	0.001522	
		m.12213G>R	MT-TS2	-	0.0	0.000000	
M7	CR	-					
		m.6179G>R	MT-COI	Silente	0.008568	0.002497	
	CD.	m.13758C>Y	MT-ND5	Silente	0.001290	0.000428	
1019	CR	m.15106G>R	MT-Cytb	Silente	0.012395	0.002901	
		m.16293A>G	MT-Dloop	-			
M10	CR	-					
M13	CR	m.11742G>R	MT-ND4	C238Y	0.0	0.000000	0.847
M15	CR	-					
M16	CR	-					
M18	CR	m.8470A>R	MT-ATP8	Silent	0.003912	0.000666	
M19	CR	m.12425delA	MT-ND5	del			
M21	CR	-					

Tabella 4.5 Mutazioni mtDNA presenti nel gruppo CR.

Indipendentemente dal trattamento, le pazienti caratterizzate dall'insorgenza di mutazioni nel mtDNA sembrano manifestare una prognosi peggiore. L'insieme di questi dati mette in evidenza che il gruppo CR presenta un maggior numero di varianti somatiche rispetto al gruppo CS, e che la presenza delle mutazioni mitocondriali potrebbe essere associata ad una risposta parziale o nulla al trattamento con chemioterapico. Per valutare se le mutazioni del mtDNA tumore-specifiche in campioni pre- e post-chemioterapia possano essere associate alla risposta alla chemioterapia, è stato utilizzando webtool GraphPad eseguito il test di Fisher il (https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm) (Tab 4.6).

	Mut	No mut	Total
CS	1	4	5
CR	7	5	12
Total	8	9	17

Tabella 4.6 Test di Fisher in pazienti pre e post chemioterapia in pazienti affette da OC.

Il *p value* risultante di 0,2941 è superiore ai margini di 0,05, pertanto è stato considerato statisticamente non significativo. Tuttavia, data la tendenza a manifestare una prognosi peggiore delle pazienti che manifestano l'insorgenza delle mutazioni nel mtDNA, risultati significativamente diversi potrebbe essere ottenuti aumentando il numero delle pazienti arruolate.

Successivamente è stata valutata l'insorgenza delle mutazioni mitocondriali in seguito al trattamento con CDDP. In questo caso il tessuto tumorale post chemioterapia è stato confrontato con la rispettiva controparte pre-chemioterapia (Tab 4.7).

Pazienti	Posizione	Gene	Cambio AA	Variabilità Nt	Frequenza Allelica	Disease score	Pre	Post
M1	m.2446 A>R	MT-RNR2	-	0.01		-	+	+
M2	-							
M3	m.12758T>Y	MT-ND5	F141S	0.00	0.000000	0.863	+	+
M4	m.7162 G>R	MT-CO1	G420D	0.00	0.000000	0.853	+	+
M5	-							
M6	m.1913 G>R m.2702 G>R m.12213G>R	MT-RNR2 MT-RNR2 MT-TS2	- -	0.000112 0.006646 0.0	0.000024 0.001522 0.000000		+ + +	+ + +
M7	-							
M8	-							
M9	m.6179G>R m.13758C>Y m.15106G>R m.16293A>G	MT-COI MT-ND5 MT-Cytb MT-Dloop	Silente Silente Silente	0.008568 0.001290 0.0112395	0.002497 0.000428 0.002901		+ - - +	+ + + +
M10	-							
M11	-							
M12	-							
M13	m.11742G>R	MT-ND4	C238Y	0.0	0.000000	0.847	+	-
M15	-							
M16	-							
M18	m.8470A>R	MT-ATP8	Silente	0.003912	0.000666		+	+
M19	m.12425delA	MT-ND5	del				+	+
M21	-							

Tabella 4.7 Mutazioni in mtDNA in seguito a trattamento a base di CDDP e PTX. + indica la presenza della mutazione, - indica l'assenza della mutazione.

Le pazienti associati pre-chemioterapia e post-chemioterapia condividono le stesse mutazioni. Destano attenzione le pazienti M9 e M13. Nel caso della paziente M9 si assiste all'insorgenza di due nuove mutazioni nel tessuto post-chemioterapia m.13758C>Y in *MT-ND5* e m.15106G>R in *MT-CYTB*, suggerendo l'azione del CDDP nell'indurre l'accumulo di nuove mutazioni. Nella paziente M13, al contrario, la mutazione m.11742G>R in *MT-ND4* sembrerebbe essere selezionata negativamente. Pertanto sembrerebbe non essere evidente l'effetto del CDDP nell'indurre l'insorgenza di nuove mutazioni. Come osservato nella linea cellulare resistente OV90R, un altro aspetto importante da considerare è la variazione dell'HF (Fig 4.17).



Figura 4.17 Mutazioni mtDNA in M1 e M6

Nelle pazienti M1 m.2446A>R in *MT-RNR2* e M6 m.1913G>R e 2702G>R entrambe in *MT-RNR2*, in seguito al trattamento, si verifica un aumento dei livelli di eteroplasmia, suggerendo una selezione positiva delle mutazioni (Fig 4.17).



Figura 4.18 Mutazioni mtDNA in M3 e M4

Al contrario, nelle pazienti M3 m.12758T>C in *MT-ND5* e M4 m.7162G>R in *MT-COI*, la riduzione dei livelli di eteroplasmia mette in evidenza una possibile pressione selettiva negativa indotta dal CDDP (Fig 4.18).

Tuttavia, bisogna considerare che non è stato possibile valutare la contaminazione da tessuto sano. Non è da escludere, dunque, che nel tessuto post-chemioterapia vi sia una contaminazione da tessuto normale che potrebbe mascherare la rilevazione di mutazioni specificamente presenti nel tessuto tumorale. La contaminazione da sano potrebbe giustificare la controselezione delle m.12758T>C in *MT-ND5* e m.7162G>R in *MT-COI*, rispettivamente nelle pazienti M3 e M4. Inoltre, la contaminazione de tessuto sano potrebbe impedire di rilevare la presenza di mutazioni indotte dal CDDP a bassi livelli di eteroplasmia. Rimane necessario incrementare la numerosità delle pazienti arruolate per comprendere se la chemioterapia a base di CDDP possa indurre l'insorgenza di nuove mutazioni del mtDNA nei campioni post-chemioterapia.

4.5.3. Analisi di patogenicità delle mutazioni osservate nelle linee cellulari resistenti al *CDDP*

In questa parte dello studio è stato posto l'obiettivo di validare l'ipotesi che il rallentamento del metabolismo OXPHOS e della proliferazione cellulare osservato nelle linee resistenti al CDDP possa essere indotto dalle mutazioni mitocondriali. È stata quindi condotta un'analisi finalizzata a determinare la patogenicità delle mutazioni osservate nelle linee cellulari e valutare dunque gli effetti funzionali

In Tabella 4.8 sono riportate le mutazioni riscontrate nella linea sensibile OC314 e nella rispettiva linea resistente OC314R con le percentuali di eteroplasmia.

Mutazioni	Gene	OC314	OC314R	Cambio AA	Variabilità Nt	Frequenza allelica	Disease score
m.1411G>A	MT-RNR1	0%	20%	ND	0,0	ND	ND
m.12425insA	MT-ND5	0%	6,8%	Frameshift	ND	ND	ND

Tabella 4.8. Mutazioni del mtDNA nelle linee OC314 sensibile e nella linea resistente al CDDP. Le percentuali indicano i livelli di eteroplasmia riscontrati (HF) nelle due linee cellulari. La sigla ND indica che i parametri non sono disponibili.

La mutazione m.1411G>A in *MT-RNR1* non presenta un indice di patogenicità. Dunque, mediante il

software MEGA-X è stato valutato l'indice di conservazione (ICon) della regione analizzata (Fig 4.19).



Figura 4.19 Analisi del ICon della m.1411G>A mediate software MEGA-X

Comparando la variante nel mtDNA umano con il mtDNA di 14 vertebrati è stato calcolato l'ICon. Quest'ultimo è definito come la percentuale di specie che tra i 14 vertebrati mostra il nucleotide *Wild Type* in quella specifica posizione. Normalmente se l'ICon≥70%, la regione è considerata altamente conservata ma nel caso della variante m.1411G>A, ICon=20%. Poiché la mutazione m.1411G>A non insorge in una regione altamente conservata, potrebbe non avere effetto sulla funzionalità di *MT-RNR1*

La mutazione m.12425inaA in *MT-ND5* induce lo slittamento della sequenza del mtDNA determinando la formazione della proteina ND5 tronca. In uno studio condotto da Birsoy e collaboratori, i difetti bioenergetici nell'OXPHOS sono stati associati alla presenza di questa variante avente livelli di HF≥50%¹⁹³. In questo caso, però, i livelli di eteroplasmia di questa variante sono molto più bassi (HF=6,8%) e questo permette di ipotizzare che anche questa variante non possa dar luogo a disfunzioni del complesso I, di cui ND5 fa parte.

L'insieme di questi dati mette in evidenza che ripetuti cicli di trattamento con il CDDP hanno indotto l'insorgenza di nuove mutazioni nel mtDNA nelle cellule OC314R; tuttavia, dati i bassi livelli di HF, queste mutazioni potrebbero non avere un effetto sulla funzionalità della catena respiratoria mitocondriale.

In parallelo, è stato sequenziato il mtDNA delle OV90 e della linea resistente al CDDP (Tab 4.9). La patogenicità di ciascuna mutazione è stata definita utilizzando due diversi criteri: i. per le varianti non sinonime un *disease score* uguale o maggiore di 0,43 e una frequenza allelica uguale o inferiore a 0,003264 (DS \geq 0,43 e AF \leq 0,003264), ii. per le varianti tRNA, un *disease score* uguale o maggiore di 0,35 e una frequenza allelica uguale o inferiore a 0,005020 (DS \geq 0,35 e AF \leq 0,005020)¹⁶⁰.

Mutazioni	Gene	OV90	OV90R	Cambio AA	Variabilità Nt	Frequenza allelica	Disease score
m.15462T>C	MT-CYB	60%	20%	L239S	0,0007	0,0001	0,72
m.12334G>A	MT-TL2	30%	50%	ND	0,0	0,0	0,8

Tabella 4.9 Mutazioni del mtDNA nella linea OV90 sensibile e nella linea resistente al CDDP. Le percentuali indicano i livelli di eteroplasmia riscontrati nelle due linee cellulari. La sigla ND indica che i parametri non sono disponibili.

La variante m.15462T>C in *MT-CYTB*, *in silico*, viene predetta come patogena utilizzando HmtVar¹⁶⁰, presentando un disease score \geq 0,43 e una frequenza allelica \leq 0,003264. Tuttavia, non sono state riportate evidenze funzionali che tale mutazione possa alterare la funzionalità del CIII. Infatti, nelle encefalomiopatie gran parte delle mutazioni missenso del CIII che hanno un effetto funzionale presenta livelli di HF=70-80%; nel caso di mutazioni nonsenso i livelli di HF riportati sono invece del 50-60%¹⁹⁴. Sulla base di queste constatazioni, dati i livelli di HF=60%, la mutazione m.15462T>C potrebbe non avere effetti sulla funzionalità del CIII. Tuttavia, poiché il CIII è uno dei siti coinvolti nella produzione di ROS¹⁹⁵, si potrebbe ipotizzare che la selezione negativa di questa mutazione durante il trattamento con il CDDP sia necessaria per bilanciare lo stress ossidativo indotto dal farmaco.

La m.12334G>A in *MT-TL2* viene predetta coma patogena da HmtVar¹⁶⁰, poiché difatti presenta un *disease scor*e=0,8 e le variabilità allelica e nucleotidica uguali a 0. A conferma della patogenicità di tale mutazione, l'analisi dell'ICon mostra che la regione d'insorgenza è altamente conservata (ICon=100%) (Fig 4.20)

																														_	
Species/Abbo: A																															
1 NC 000845 1:12865 12034 Sue ecrofe	Tale	TT	TTA		0.0.0	T A A	C A 4			TCI	0.01		0.0	TC	TT	0.00		CC	0.0			TTO	GT	00		TC	0.0				-
2 NC 005089 1:11671 11741 Mus musculus		÷÷.	÷÷.			122	-			TCI			00		++			00	22		0.0		GT		224	H C					- 7
2. NC_005003.1.11071-11741 mus musculus		11	140	•			47)						00		14			00				0	C T	00			2				17
4 NC 0053911.1.12041-12111 Dos inucus			110	22		1.2		-		-			00					00			-		0 -	00	222		2		1.1		
4. NC_006380.3.12571-12640 Bos grunniens	10	11	11	· ~ ~	GGA				6.0				GG	5	11					AAA	- ^	G	GI	GC	A A C	1	-	<u>^</u>	A A A	AG	
5. NC_006853.1:12038-12108 Bos taurus	AC	TT	TTA	AAI	GGA	TAG	IAG	T	L A	TCO	GGI		GG	тс	11	AGG	I A A	сc	AAA	AAA	- A	G	GT	GC	AAC	TC	CA	AA	AAA	AG	1
6. NC_008830.1:12972-13041 Phacochoerus africanus	AC	TT	TTA	AA	GGA	TAA	CAC	-		TCO	CGT	гт.	GG	ТС	TT	A G G	AA	C C	AAA	AAA	- A	TG	GT	GC	AAC	TC	CA	AA	AAA	AAG	1
7. NC_012920.1:12266-12336 Homo sapi	AC	ΤT	TTA	AA	GGA	TAA	CAC	-	TA	TCO	CAI	ГΤ	GG	TC	TT	AGG	CC	CC	AAA	AAA	TT	TG	GT	GC	AAC	TC	CA	AA	AAA	AAG	T A
8. NC_024860.1:12734-12803 Sus celebensis	AC	TT	TTA	AA	GGA	TGG	CAC		TA	TCO	CAT	TТ	GG	TC	ТТ,	AGG	AA	CC	AAA	AAA	- A	TTG	GT	GC	AAC	TC	CA.	AA	AAA	AAG	T A
9. NC_036020.1:12037-12106 Bos frontalis	AC	ΤТ	TTA	AA	GGA	TAG	TAC	3 - 1	ГТА	TCP	CAT	τт	GG	тс	ΤТ	AGG	AA	C C	A A /	AAA	- A	TTG	GT	GC	AAC	тс	CA	A A 1	AAA	AG	T A
10. AY702618.1:12055-12124 Bubalus bubalis breed Haikou	AC	TT	TTA	AA	GGA	TGG	TA		TTA	TCF	CGT	τT.	GG	тс	ΤТ	AGG	AG	CC	AAA	AAA	- A	TTG	GT	GC	AAC	тс	CA.	AA	AAA	AG	T A
11. NC_001941.1:11683-11753 Ovis aries	AC	ΤТ	TTA	AA	GGA	TAG	TAC		TTA	TCO	CAT	гтс	GG	тс	TT	AGG	AA	C C	AAA	AAA	- A	TG	GT	GC	AAC	тс	CA	AA	AAA	AAG	T A
12. NC_005044.2:11678-11747 Capra hircus	AC	ТТ	TTA	AA	GGA	TAG	TA		TTA	TCF	CGT	гτ	GG	тс	TT	AGG	AG	cc	AAA	AAA	- A	TTG	GT	GC	AAC	тс	CA	AA	AAA	AG	T A
13. NC_009628.2:11685-11754 Camelus bactrianus	AC	ΤТ	тт <mark>а</mark>	AA	GGA	TAG	AA		AA	TCO	CGT	гт.	GG	сс	тт	AGG	AG	сс	A A /	AAA	- A	TTG	GT	GC	AAC	тс	CA	A A 1	AAA	AAG	T A
14. NC 007704.2:11687-11756 Cervus elaphus	AC	ТТ	TTA	GA	GGA	TGA	CAC		AAA	тс	CGT	гт.	GG	TC	TT	AGG	AA	cc	AAA	AAA	- A	TG	GT	GC	AAC	тс	CA	AA	AAA	AAG	
15. NC 028321.1:12509-12578 Leopardus guigna isolate OG	3 A C	TT	TTA	TA	GGA	TAG	AA		AA	TCO	CAT	гт.	GG	тс	TT	AGG		c c	AA	AAA	- A	TG	GT	GC	AAC	тс	CA	AAT	AAA	AAG	T /
16. NC_008092.1:11711-11780 Canis lupus	AC	тт	тта	TA	GGA	TAG	GAO			TC	CGT	гτ	GG	тс	т т	AGG	AA	сс	A A A	AAA	- A	TTG	GT	GC	AAC	тс	CA	GAT	AA	AG	T A

Figura 4.20 Analisi del ICon della m.12334T>C mediate software MEGA-X

La mutazione è localizzata sul braccio accettore del tRNA^{LEU}. L'insorgenza della mutazione determina un cambio conformazionale che potrebbe rendere la struttura più instabile causando un'alterazione nel sito accettore per il legame con la leucina da trasportare (Fig 4.21)



Figura 4.21 Analisi strutturale della m.12334G>A. Il tRNA^{LEU} che acquisisce la mutazione, in seguito al trattamento cronico, mostra dei cambiamenti conformazionali. L'analisi è stata realizzata mediante l'applicativo mRNA fold web server.

È stato recentemente riportato il caso di un paziente affetto da oftalmoplegia esterna progressiva cronica in cui la variante m.12334T>C con un HF=84% è stata associata all'accumulo di mitocondri non funzionanti a livello delle fibre muscolari¹⁹⁶.

L'insieme di questi dati mette in evidenza la patogenicità della variante m.12334G>A in *MT-TL2*. Tuttavia, allo scopo di valutare l'effetto funzionale, è necessario considerare che la mutazione m.12334T>C mostra un HF=50% nelle cellule OV90R, quindi gli effetti della variante nel tRNA mutato potrebbero essere compensati dalle molecole di mtDNA in cui questa non è presente. Oltre a quanto già detto, il mtDNA è caratterizzato dalla ridondanza, per questo motivo la leucina viene codificata da due differenti codoni CUN e UUA/G; quindi tale variante potrebbe avere degli effetti solo sugli amminoacidi codificati dal codone CUN.

Questi dati mettono in evidenza che il CDDP ha la capacità di indurre mutazioni nel mtDNA e operare una pressione selettiva sulle mutazioni potenzialmente coinvolte nella produzione di ROS. Tuttavia, dati i bassi livelli di HF, le mutazioni ritrovate in queste linee cellulari resistenti al CDDP non sembrerebbero avere effetti sulla funzionalità della catena respiratoria mitocondriale. Pertanto, alle varianti analizzate non può essere imputata la riduzione della capacità respiratoria della linea cellulare OC341R (Fig 4.10A). Nelle cellule OV90R è possibile ipotizzare che la perdita della mutazione in *MT-CYTB* possa conferire un vantaggio nell'acquisizione del fenotipo resistente al CDDP; difatti, la selezione negativa di questa mutazione potrebbe contribuire a contrastare lo stress ossidativo indotto dal farmaco. Poiché la variante insorge in uno dei principali siti produttori di ROS, la selezione negativa durante il trattamento cronico con CDDP potrebbe contribuire a mantenerne bassi i livelli.

Al fine di confermare che le mutazioni mitocondriali indotte da CDDP non inducano una disfunzione che altera la funzionalità della catena respiratoria, è stata valutata la capacità delle cellule di crescere in galattosio (Fig 4.22). Le linee sensibili e resistenti sono state incubate in terreno completo in cui il glucosio è stato sostituito dal galattosio, inducendo quindi le cellule ad utilizzare la catena respiratoria per crescere.



Figura 4.22 Il trattamento cronico con CDDP non induce disfunzioni mitocondriali severe. Le cellule sono state incubate per 72h con un terreno completo contente 5mM di galattosio. La vitalità è stata determinata mediante il saggio SRB. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 3.

I risultati mostrano che non vi sono differenze di vitalità cellulare tra le linee sensibili e le linee resistenti (Fig 4.22), indicando quindi che le mutazioni mitocondriali riscontrate nelle linee resistenti non sono sufficientemente severe da bloccare l'OXPHOS, potrebbero rappresentare dunque degli eventi passeggeri.

Per quanto riguarda il ruolo delle mutazioni nel mtDNA riscontrate con l'acquisizione del fenotipo chemioresistente, dalla letteratura si evincono pareri contrastanti. In seguito al trattamento cronico con CDDP, il mtDNA presenta una maggiore capacità di formare addotti rispetto al DNA nucleare¹⁹⁷. Inoltre, l'acquisizione di un fenotipo resistente, della linea cellulare di carcinoma polmonare A549, è stato associato ad una variazione del carico mutazionale da eteroplasmia ad omoplasmia di una mutazione non-sinonima nel gene MT-ND2 nel Cl¹⁹⁸. L'insieme di queste osservazioni suggerisce che le mutazioni del mtDNA potrebbero avere un ruolo nell'acquisizione della chemioresistenza. Nonostante la letteratura sembri associare positivamente la presenza di varianti mitocondriali alla resistenza al platino, non si può escludere il contrario. L'analisi del mtDNA effettuata in questo studio suggerisce che il trattamento con CDDP può indurre l'insorgenza di nuove varianti mitocondriali o esercitare una pressione selettiva sulle mutazioni già presenti. Tuttavia, nel caso delle linee cellulari utilizzate, le varianti mitocondriali non sembrano indurre severe disfunzioni della catena di respirazione mitocondriale, al punto tale da essere responsabili della ridotta capacità respiratoria delle linee cellulari OC314R e OV90R, e quindi anche del rallentamento del ciclo cellulare e del tempo di duplicazione. Nel contesto della chemioterapia, sono necessari ulteriori e più dettagliati studi per definire il ruolo delle mutazioni del mtDNA che potrebbe essere specifico per il tipo di tumore e le mutazioni coinvolte.

4.6. Le linee chemioresistenti acquisiscono un fenotipo staminale.

Sebbene la chemioterapia a base di platino sia efficace contro i tumori caratterizzati da un elevato tasso di proliferazione, ad oggi si osserva una riduzione del tempo di sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS) ed un conseguente incremento delle recidive. Attualmente, è noto che sottopopolazioni di cellule chemioresistenti condividono proprietà biologiche con le cellule staminali tumorali (CSC)¹⁹⁹. Queste si ritiene siano responsabili della recidiva, dell'invasione, ed in ultima analisi della diffusione della malattia attraverso l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali¹¹². Le CSC rappresentano una ristretta sottopopolazione di cellule tumorali con capacità di auto-rinnovamento, sensibilità ai ROS ed elevata plasticità metabolica²⁰⁰. Recentemente Menendez e collaboratori hanno coniato il termine "metabostemness", che delinea i parametri metabolici che modulano, a livello epitrascrizionale, la riprogrammazione genetica che reindirizza le cellule tumorali normali e non-CSC verso stati cellulari CSC meno differenziati. In particolare, comprende i parametri metabolici che consentono le capacità di autorinnovamento delle CSC. La riprogrammazione metabolica potrebbe essere un evento molecolare precoce, che nelle cellule differenziate favorisce l'acquisizione delle modifiche epigenetiche richieste per l'acquisizione del fenotipo staminale. Parallelamente, le vie metaboliche possono essere controllate da fattori di trascrizione coinvolti nella pluripotenza e nell'auto-rinnovamento, quali c-MYC, che regolano la struttura della cromatina²⁰¹. Inoltre è stato visto che la metilazione e l'acetilazione del DNA cambiano durante l'acquisizione del fenotipo staminale. Tali modifiche epigenetiche richiedono l'intervento di diversi cofattori derivati da varie vie metaboliche, tra cui la glicolisi, la β-ossidazione degli acidi grassi, il TCA e l'OXPHOS.

Dunque, l'acquisizione del fenotipo staminale potrebbe rappresentare la causa o la conseguenza della riprogrammazione metabolica osservata nelle linee resistenti al CDDP. Un'ulteriore peculiarità delle CSC è il rallentamento del ciclo cellulare: Gao e collaboratori dimostrarono che le cellule CSC mostrano un tasso di proliferazione ridotto associato ad una maggiore resistenza al CDDP²⁰⁵.

In questo studio, è stato finora dimostrato che l'acquisizione della resistenza al platino è associato ad una ridotta capacità respiratoria, ad un metabolismo prevalentemente glicolitico e ad un rallentamento del ciclo cellulare, caratteristiche associate a loro volta all'acquisizione di un fenotipo staminale. Date queste osservazioni, al fine di valutare se il trattamento cronico con CDDP abbia indotto l'acquisizione del fenotipo staminale è stata quantificata, mediante citofluorimetria, la subpopolazione con caratteristiche staminali presente nelle linee cellulari oggetto di studio, attraverso la valutazione della positività ai marcatori staminali: CD133 (coniugato al fluorocromo PE) e CXCR4 (coniugato al fluorocromo APC)²⁰⁶ (Fig 4.23A).



Figura 4.23 Le linee resistenti presentano un fenotipo staminale. **A.** Marcatori di staminalità in citofluorimetria. L'analisi è stata effettuata su linee adese (2D) in assenza di trattamento al CDDP. Gli istogrammi nero e grigio rappresentano le linee sensibili. Per ogni linea sono stati analizzati 50.000 eventi. Nel grafico sono mostrate le percentuali di cellule positive a CD133 (PE) e CXCR4 (APC). **B.** Analisi di qRT-PCR dell'espressione dei fattori di Yamanaka. Per la normalizzazione sono stati utilizzati i dati relativi al gene housekeeping HPRT. Il fold change è stato calcolato usando il metodo $\Delta\Delta$ CT e utilizzando i valori delle linee sensibili come controllo. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 4. (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 **** p < 0.0001).

Le linee cellulari OC314R e OV90R mostrano un incremento della sottopopolazione staminale positiva per entrambe i marcatori CD133⁺/CXCR4⁺ rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.23A). Le cellule OC314R sono caratterizzate dal 4% di popolazione CD133⁺/CXCR4⁺ rispetto allo 0,3% presente nella linea sensibile (p=0,0001). Allo stesso modo, la linea cellulare OV90R mostra un 50% di popolazione CD133⁺/CXCR4⁺ rispetto al 6% della linea sensibile (p=0,001). Questi dati mettono in evidenza che l'acquisizione della resistenza è associata ad un arricchimento della popolazione staminale, che risulta essere 16 volte maggiore per le OC314R e di 8 volte maggiore per le OV90R rispetto alla controparte sensibile.

La differenza osservata, nella quantificazione della sottopopolazione CSC, tra le due linee cellulari resistenti potrebbe essere dovuta ad una differente componente staminale nella popolazione parentale. Nelle OC314 la quota di sottopopolazione staminale è pressoché zero; nelle OV90 si riscontra un 6% di popolazione CD133⁺/CXCR4⁺. Ripetuti cicli di CDDP nel tempo, dunque, potrebbe favorire l'arricchimento della popolazione CSC in base alla percentuale presente nella popolazione parentale.

L'espressione di CD133 e CXCR4 potrebbe suggerire l'acquisizione di particolari caratteristiche. Nel caso di CD133 in OC, la sua funzione è quella di favorire il processo di adesione al tessuto peritoneale durante il processo di metastatizzazione¹⁰⁰. CXCR4 è coinvolto nei processi di metastatizzazione, viene attivato dal ligando CXCL12, di cui è ricca l'ascite, e favorisce ed aumenta la capacità di metastatizzare¹⁰¹. Pertanto, la simultanea espressione di CD133 e CXCR4 identificherebbe una specifica sottopopolazione staminale in grado di evadere dal tessuto primario e di raggiungere siti distanti. Dunque, la positività delle linee cellulari resistenti OC314R e OV90R a CD133⁺/CXCR4⁺, oltre ad identificare una sottopopolazione caratterizzata da una marcata resistenza al farmaco, potrebbe indirettamente suggerire la capacità della cellula tumorale staminale di migrare e favorire il

processo di metastatizzazione. È, inoltre, interessante notare che confrontando il tumore primario con la recidiva, la popolazione CD133⁺ aumenta dal 6,3% al 34,5% nelle pazienti resistenti al CDDP⁹⁹.

Un'altra importante caratteristica delle cellule staminali è una marcata resistenza alle terapie convenzionali mediante l'alto livello di espressione dei trasportatori ABC²⁰⁷. La teoria che associa la resistenza multi-farmaco a caratteristiche di staminalità sostiene che, dopo l'esposizione al chemioterapico, solo le cellule staminali che esprimono trasportatori ABC mantengano il potenziale di rigenerare il tumore²⁰⁸. Muñoz-Galván e collaboratori hanno identificato *ABCG2* come marcatore di staminalità in OC¹¹⁴. Al fine di confermare quanto osservato in citofluorimetria, è stata quindi valutata l'espressione genica dei fattori di Yamanaka *NANOG, OCT4, SOX2, KLF4*, nelle linee sensibili e resistenti al CDDP, oltre ad *ABCG2* (Fig 4.23B).

I fattori di Yamanka sono fattori di trascrizione e riprogrammazione coinvolti nel mantenimento della staminalità e della pluripotenza^{79,80}. Sembrerebbe che tali fattori di riprogrammazione, mediante l'attivazione di due diverse onde trascrizionali, riattivino un circuito di pluripotenza endogena re-inducendo nella cellula la capacità di una crescita illimitata⁸². Tuttavia l'esatto meccanismo resta da chiarire.

I risultati mettono in evidenza che la linea cellulare OC314R mostra un aumentato livello di espressione dei fattori *OCT4, SOX2* e *KLF4,* rispetto alla controparte sensibile. La sovraespressione è particolarmente evidente per *KLF4* e per *ABCG2,* che presentano livelli di espressione aumentati di circa 15 volte rispetto alla linea sensibile. Relativamente a NANOG, si osserva una tendenza all'aumento di espressione genica, sebbene non significativa, tra OC314R e controparte sensibile (Fig 4.23B). La linea cellulare OV90R mostra, rispetto alla controparte sensibile, un incremento dei livelli di espressione di *NANOG, OCT4* e *ABCG2,* rispettivamente di 3,5, 2 e 6 volte, ma non mostra significative differenze di espressione per *SOX2* e *KLF4* (Fig 4.23B). Concludendo, l'analisi di

espressione genica dei fattori di Yamanaka e *ABCG2*, in quanto coinvolti nel mantenimento del *selfrenewal*, del differenziamento e della pluripotenza, confermano che l'acquisizione delle chemioresistenza favorisce la selezione e l'arricchimento della popolazione staminale.

Come riportato nel primo studio che ha identificato in OC le CSC, questa sottopopolazione è generalmente presente nell'ascite, ha la capacità di organizzarsi in sferoidi ed è coinvolta nella propagazione del tumore⁹². Date queste evidenze, al fine di confermare la precedente osservazione, sono stati realizzati saggi funzionali per valutare se le linee resistenti presentino un'aumentata capacità di formare strutture 3D attraverso un saggio di formazione di sferoidi. Le linee cellulari sono state piastrate in condizioni di indipendenza da ancoraggio e in assenza di siero. Tale sistema, sfruttando le proprietà intrinseche delle CSC, ne impedisce il differenziamento e permette di eliminare le cellule non-CSC mediante apoptosi/anoikis²⁰⁹ favorendo, dunque, l'arricchimento. Dopo sette giorni, è stato quantificato il numero degli sferoidi (Fig 4.24).





Figura 4.24 Le linee resistenti formano sferoidi aventi maggiori dimensioni. Rappresentazione delle caratteristiche morfologiche degli sferoidi in 3D. La crescita degli sferoidi è stata monitorata per sette giorni in ULA. Nei grafici sono riportati il numero degli sferoidi e la misurazione del diametro effettuata mediante il software ImageJ. Le immagini sono state acquisite al settimo giorno di crescita ad un ingrandimento 20X.

Le linee cellulari OC314R e OV90R, che in citofluorimetria mostrano un aumento della popolazione CD133⁺/CXCR4⁺ rispettivamente di 16 e 8 volte rispetto alla controparte sensibile, manifestano significative differenze nelle dimensioni degli sferoidi (Fig 4.24). Le linee cellulari OC314 e OC314R danno origine a degli sferoidi dal diametro rispettivamente di 72,11µm e 215,6µm, parallelamente le cellule OV90 e OV90R formano strutture 3D aventi il diametro di 162,4µm e di 293,6µm rispettivamente. Inoltre, la linea cellulare OV90R mostra una forma sferica ben delineata dai contorni regolari, mentre la linea cellulare OC314R è costituita da una popolazione mista caratterizzata da strutture 3D dai contorni regolari e non (Fig 4.24). Gli sferoidi aventi una dimensione maggiore sono il risultato di una maggiore capacità di auto-rinnovamento, mentre la

forma irregolare, riscontrata nelle OC314R, potrebbe suggerire delle proprietà invasive²¹⁰. L'analisi delle dimensioni dello sferoide corrobora l'associazione tra l'acquisizione della resistenza e le caratteristiche staminali.

Tuttavia, nelle stesse condizioni non è stato osservato un significativo aumento nel numero degli sferoidi: 173±31,7 sferoidi nelle OC314R rispetto ai 192±27,7 nella controparte sensibile OC314 (p=0,4841); 125±17,01 sferoidi nelle OV90R rispetto ai 94±11,7 nelle OV90 (p=0,0604). Questo potrebbe essere una conseguenza del ridotto tasso di proliferazione osservato nelle linee resistenti. Il rallentamento della capacità di crescita, potrebbe riflettersi anche nella divisione simmetrica e asimmetrica, utilizzata delle CSC per il mantenimento della popolazione staminale. In condizioni basali, dunque, il numero degli sferoidi tra le linee sensibile e resistenti è comparabile.

Concludendo le caratteristiche morfologiche permettono di apprezzare una significativa differenza nell'acquisizione di caratteristiche *stem-like* tra le linee sensibili e resistenti.

In OC circa un terzo delle pazienti sviluppa l'ascite²¹¹. Questo microambiente favorisce l'arricchimento e la selezione di cellule con caratteristiche staminali che possono tollerare l'anoikis e dunque sopravvivere. In particolare, in un recente studio è stata riscontrata una più alta percentuale di CSC nell'ascite delle pazienti che hanno avuto una recidiva dopo la chemioterapia, rispetto alle pazienti che non sono state sottoposte a cicli chemioterapici, suggerendo come la terapia a base di platino possa favorire la selezione della sottopopolazione staminale.

4.6.1. Il CDDP seleziona ed incrementa il contenuto delle CSC

I dati precedenti suggeriscono che il trattamento cronico con CDDP potrebbe aver indotto l'acquisizione del fenotipo staminale: al fine di confermare questa ipotesi è stato realizzato un saggio di formazione degli sferoidi *in vitro* in presenza di CDDP. In questo caso, è stato effettuato un pretrattamento delle linee sensibili e resistenti in 2D per 72h utilizzando le concentrazioni di 2,5μM e 3,5μM di CDDP, che rappresentano rispettivamente l'LC50 delle OC314 e delle OV90. Al termine delle 72h di trattamento le linee cellulari sono state seminate in condizioni di indipendenza da ancoraggio e dopo 7 giorni di crescita è stato valutato il quantitativo di sferoidi formati, rispetto alla condizione in assenza di farmaco (Fig 4.25).



Figura 4.25 II CDDP arricchisce il contenuto di CSC nelle linee resistenti al CDDP. Le linee sono state trattate in 2D per 72h con LC50 delle rispettive linee sensibili. La crescita degli sferoidi è stata monitorata per sette giorni in ULA. Nel grafico è riportato il rapporto tra il numero degli sferoidi trattati con CDDP e il numero degli sferoidi non trattati. Gli istogrammi nero e grigio rappresentano le linee sensibili. La linea tratteggiata indica il non trattato di ogni linea. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 3. Le immagini riportate sono rappresentative e mostrano un ingrandimento 4X (** p<0.01, ****p < 0.0001).

La presenza del CDDP induce nelle linee OC314 e OV90 una riduzione del numero degli sferoidi; questo potrebbe essere dovuto al fatto che il pretrattamento con il platino in 2D ha determinato la morte cellulare di oltre il 50% della popolazione sensibile. Contrariamente le linee resistenti OC314R e OV90R mostrano, in seguito al pretrattamento in CDDP, un aumento nel numero di formazione degli sferoidi rispettivamente di 1,2 volte (p=0,0029) e di 1,3 volte (p=0,0015) (Fig 4.25). Questi dati mettono in evidenza che il fenotipo staminale è associato alla chemioresistenza e che nella condizione di aderenza in 2D il chemioterapico potrebbe aver favorito la selezione della sottopopolazione staminale e più resistente che in 3D è andata incontro a proliferazione simmetrica e asimmetrica sostenendo la generazione delle CSC.

Successivamente, è stata valutata l'efficienza del trattamento con CDDP in sferoidi che presentano una forma ben delineata. Questo esperimento riproduce l'effetto del CDDP osservato nelle pazienti. In particolare, è stata valutata la capacità di proliferazione degli sferoidi trattati con chemioterapico in generazioni sequenziali. (Fig 4.26).



Figura 4.26 Rappresentazione schematica di due generazioni sequenziali di sferoidi.

Le linee cellulari sono state piastrate in condizioni di indipendenza da ancoraggio e quattro giorni dopo la semina sono state trattate con il rispettivo LC50 della linea sensibile per 72h. La crescita della prima generazione di sferoidi è stata monitorata per un totale di sette giorni (Fig 4.27A). Successivamente è stata analizzata la seconda generazione (Fig 4.27A). Dopo aver valutato la crescita della prima generazione di sferoidi, questi sono stati disgregati e piastrati in condizioni di indipendenza da ancoraggio. La vitalità è stata monitorata per dieci giorni. Questo approccio permette di arricchire e selezionare le CSC e di avere una popolazione staminale più pura²¹².


Figura 4.27 In generazioni successive il trattamento con CDDP rafforza la selezione e l'arricchimento le CSC. A. Le linee mostrate sono state trattate in 3D per 72h con CDDP. La crescita degli sferoidi di prima generazione è stata monitorata per un totale di sette giorni. La crescita degli sferoidi di seconda generazione è stata monitorata per un totale di dieci giorni. Nel grafico è riportato il rapporto tra il numero degli sferoidi trattati con CDDP e il numero degli sferoidi non trattati. Le linee nero e grigio rappresentano le linee sensibili. B. Marcatori di staminalità in citofluorimetria. L'analisi è stata effettuata in 3D. Gli istogrammi nero e grigio rappresentano le linee sensibili. Per ogni linea sono stati analizzati 5000 eventi. Nel grafico sono mostrate le percentuali di cellule positive a CD133 (PE) e CXCR4 (APC). I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 3. (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 ****p < 0.0001).

È da sottolineare che il CDDP ha un significativo effetto sulla prima generazione di sferoidi delle linee sensibili; infatti le linee OC314 e OV90, rispetto alla controparte non trattata, mostrano una riduzione nel numero di strutture 3D. Contrariamente nelle cellule OC314R e OV90R, quando lo sferoide è già formato, il CDDP non esercita nessun effetto, ed il numero di sferoidi si mantiene costante prima e dopo il trattamento. Nella seconda generazione, l'effetto del CDDP sulle linee sensibili e resistenti è molto più consistente. In particolare, il trattamento con il platino effettuato nella prima generazione e la successiva rigenerazione dello sferoide, fanno sì che nelle cellule resistenti, la sottopopolazione staminale sia arricchita determinando un aumento nel contenuto delle strutture 3D.

Un aspetto svantaggioso della tecnica è che la componente non-CSC potrebbe formare sferoidi alterando l'informazione sul contenuto di CSC⁷⁰. Per investigare questo dato è stata analizzata la popolazione CSC CD133⁺/CXCR4⁺ nella prima generazione di sferoidi in citofluorimetria (Fig 4.27B).

Nella linea cellulare OC314R, il numero di sferoidi tra la condizione di trattamento e non, si mantiene inalterato. Tuttavia l'analisi in citofluorimetria della sottopopolazione staminale CD133⁺/CXCR4⁺ mostra che il CDDP seleziona e arricchisce la componente CSC. Si osserva un aumento di 1,5 volte delle CSC rispetto alla popolazione non trattata. Al contrario, non si osserva nessuna differenza tra la popolazione CSC in 2D (Fig 4.23A) ed in 3D in assenza di trattamento (Fig 4.27B), suggerendo che l'arricchimento delle CSC potrebbe essere indotto dall'azione selettiva del platino.

Nelle cellule OV90R, invece, è sufficiente la presenza del terreno selettivo e la formazione dello sferoide per arricchire la popolazione CSC. Confrontando la condizione in assenza di trattamento in 2D (Fig. 4.23A) e in 3D (Fig. 4.27B), le CSC CD133⁺/CXCR4⁺ quasi si duplicano, passando da 50% ad un 80%. In questo caso, non si osserva una variazione nella popolazione CD133⁺/CXCR4⁺in presenza o in assenza di CDDP, probabilmente perché le staminali sono presenti all'80% nella condizione non trattato. In questo caso, potrebbe essere stata sufficiente la selezione indotta dal terreno per osservare un quasi completo arricchimento della popolazione CSC e mascherare l'effetto del CDDP.

È importante notare che nelle OV90 in risposta al CDDP si assiste ad un aumento della popolazione CD133⁺/CXCR4⁺ (Fig 4.27B). La selezione e l'arricchimento delle CSC, quindi, potrebbe avvenire nella popolazione sensibile già dopo un primo ciclo di trattamento. La popolazione arricchita nella linea sensibile, dopo un solo ciclo di trattamento con CDDP, potrebbe rappresentare la subpopolazione che acquisisce la resistenza. Questi risultati suggeriscono che il CDDP potrebbe rappresentare una pressione selettiva per l'acquisizione del fenotipo staminale, causando un arricchimento delle CSC. Inoltre questo arricchimento potrebbe verificarsi precocemente nella linea sensibile, favorendo l'acquisizione della chemioresistenza.

Diversi autori hanno dimostrato che il CDDP induce l'arricchimento delle CSC in linee resistenti di OC ^{213–215}. Tuttavia non sono stati riportati meccanismi molecolari mediante i quali il CDDP possa indurre l'acquisizione di caratteriste *stem-like* in OC. Zhang e collaboratori osservarono che in cancro polmonare non a piccole cellule il trattamento con il CDDP induce alti livelli di espressione dell'IL-6, la quale modula l'espressione di Hypoxia-inducible factor (HIF) mediante due meccanismi: ne promuove la trascrizione e ne inibisce la degradazione. La stabilizzazione di HIF mediata dall'IL-6 favorisce l'arricchimento della popolazione CSC in seguito al trattamento con CDDP²¹⁶. Lu e collaboratori osservarono che in tumore al seno in risposta alla chemioterapia HIF-1 attiva, a livello epigenetico, la trascrizione dei geni coinvolti nella pluripotenza, in particolare, favorisce l'attivazione trascrizionale dei fattori di Yamanaka *OCT4, NANOG, SOX2* e *KLF4*²¹⁷.

Inoltre, Abubaker e collaboratori hanno dimostrato che è sufficiente un singolo e breve trattamento con CDDP per modulare l'espressione dei marcatori di staminalità *in vitro*. Allo stesso modo è stato osservato un arricchimento delle CSC nel tumore primario e nell'ascite già dopo il primo ciclo di chemioterapia²¹⁸. Dunque, la presenza delle CSC all'interno della popolazione di tumori primari potrebbe spiegare l'inefficacia degli attuali trattamenti nell'eradicare completamente la massa del tumore primario. Le attuali terapie colpiscono la maggior parte delle cellule tumorali lasciando intaccata la subpopolazione staminale, la quale può determinare l'insorgenza della recidiva. In conclusione, questi dati suggeriscono l'acquisizione di un fenotipo *stem-like* delle linee resistenti. Infatti è stato mostrato che, anche nella condizione in 2D, le linee resistenti presentano un arricchimento della popolazione CD133⁺/CXCR4⁺, la quale presenta un'aumentata espressione genica dei fattori coinvolti nella pluripotenza e nel mantenimento *del self-renewal*. Inoltre, i saggi funzionali suggeriscono che il trattamento con CDDP induca un arricchimento della subpopolazione CSC visibile sia nella formazione di sferoidi che nell'analisi in citofluorimetria. Un aspetto importante è che quando il platino viene utilizzato come trattamento antitumorale, invece di ridurre lo sferoide, induce un arricchimento delle CSC. L'insieme di questi dati confermano, dunque, l'associazione tra l'acquisizione della resistenza al farmaco e le caratteristiche di staminalità.

4.7. Alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità correlano con la sovraespressione dei geni coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del metabolismo lipidico.

Nella prima parte di questo studio è stato osservato come il trattamento cronico con CDDP e l'induzione della resistenza siano associati all'arricchimento della popolazione CSC e all'acquisizione di un basso profilo OXPHOS. La presenza delle CSC associate ad un alto livello di espressione dei trasportatori ABC e ad un rallentamento del ciclo cellulare, potrebbe essere la causa dell'aumento dell'LC50 nelle linee cellulari resistenti al CDDP.

Un ulteriore obiettivo di questa tesi è stato quindi comprendere il legame meccanicistico fra il cambiamento metabolico osservato nelle linee resistenti e l'acquisizione delle loro caratteristiche staminali.

Recentemente è stato dimostrato il coinvolgimento di oncogeni e fattori di trascrizione della pluripotenza, come *MYC*, *p53*, *K-Ras*, *HIF1a*, *NANOG*, *MEIS1*, *Wnt o OCT4*, nella riprogrammazione metabolica²¹⁹. In OC la definizione del profilo metabolico delle CSC rispetto alla controparte

differenziata risulta piuttosto complessa. Pastò e collaboratori suggeriscono che le CSC in OC si contraddistinguono per un'elevata dipendenza dal metabolismo OXPHOS e per un'elevata internalizzazione del glucosio²²⁰. Altri studi, tuttavia, sostengono che le CSC in OC sono caratterizzate da un metabolismo prevalentemente glicolitico con una ridotta funzionalità mitocondriale. Infatti, la sottopopolazione staminale, isolata da ascite da paziente affetta da OC, si distingue dalla controparte differenziata per un'elevata dipendenza dalla glicolisi²²¹. Queste osservazioni non solo suggeriscono che il fenotipo metabolico e la staminalità siano intrinsecamente correlati, ma che il metabolismo energetico potrebbe modulare le caratteristiche di staminalità²²².

Al fine di correlare il fenotipo staminale con il profilo metabolico, sono state realizzate due differenti analisi bioinformatiche: un'analisi di espressione genica differenziale ed un'analisi di correlazione dell'espressione genica.

Nel primo tipo di analisi l'espressione dei geni di staminalità è stata analizzata nel dataset TCGA in tumori primari. Le 307 pazienti affette da HGSOC sono state stratificate in base ai livelli di espressione dei marcatori di staminalità, precedentemente valutati *in vitro* in questo studio (*ABCG2, SOX2, KLF4, NANONG, CXCR4, OCT4, CD133*), in quartili. Il primo quartile include le pazienti aventi una bassa espressione dei geni di staminalità (*staminality-low*), mentre l'ultimo quartile quelle caratterizzate da un'alta espressione dei marcatori (*staminality-low*). L'espressione genica differenziale realizzata tra questi due gruppi ha permesso di estrapolare un dataset di geni la cui alta e bassa espressione è associata al quartile *staminality-high*.

Il secondo e il terzo quartile sono stati esclusi dall'analisi in quanto le pazienti mostrano livelli di espressione genica dei marcatori di staminalità intermedi.



Figura 4.28 Valutazione dell'espressione dei marcatori di staminalità nel dataset TCGA. L'espressione dei geni di staminalità è stata analizzata nel dataset TCGA in tumori primari in 307 pazienti affette da OC. Le linee verdi identificano il quartile 1 (staminality-low) e il 4 (staminality-high). Le linee rosse indicano i valori soglia dell'espressione genica dei quartili analizzati.

L'analisi dei marcatori di staminalità nella coorte delle pazienti affette da OC ha mostrato che il range di espressione di *NANOG* è più basso rispetto a tutti gli altri marcatori (*ABCG2, SOX2, OCT4, KLF4, CD133, CXCR4*) che presentano una maggiore variabilità (Fig 4.28). In base alla valutazione del range di espressione dei marcatori di staminalità, questa prima analisi suggerisce la presenza di una componente staminale e mette in evidenza un'eterogeneità di popolazione già presente nel tumore primario.

Per ogni marcatore di staminalità i geni più differenzialmente espressi sono stati filtrati in base ai seguenti criteri: per la significatività Adj pvalue<0,05 per i livelli di espressione log2FC >1; log2FC < -1. I geni con log2FC >1 mostrano alti livelli di espressione mentre quelli con log2FC < -1 bassi livelli di espressione nel gruppo staminality-high.

Dopo aver estratto i geni significativamente associati, mediante il webtool Enricher²²³ sono state identificate le vie metaboliche correlate ad alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità (Fig 4.29).



Figura 4.29 Valutazione dei geni a bassi livelli di espressione nell'analisi di espressione genica differenziale. A. Schematizzazione dei geni negativamente associati agli alti livelli di espressione dei geni di staminalità. B. Rappresentazione schematica dei pathway significativamente coinvolti.

Ai fini di questo studio, sono stati considerati d'interesse solo i geni differenzialmente espressi che sono comuni a due o più marcatori di staminalità. I geni estratti mediante l'analisi di espressione genica differenziale sono comuni a *ABCG2 e KLF4* (Fig 4.29A).

L'esito di questa prima analisi ha portato all'identificazione delle vie metaboliche regolate negativamente quando *ABCG2* e *KLF4* sono altamente espressi nei tumori, ovvero la via di PPAR, l'ossidazione degli acidi grassi (Fig 4.29B).

Il secondo tipo di analisi, ovvero l'analisi di correlazione genica è stata condotta usando il web tool: <u>http://giorgilab.dyndns.org/Tucana/</u>nelle la coorte dei pazienti del TGCA. In questo caso, sono stati identificati i geni associati agli alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità, in base al coefficiente di correlazione R.

L'analisi prevede l'uso di criteri meno stringenti rispetto a all'analisi precedente: in questo caso per la significatività è stato utilizzato il pvalue<0,05. Questo ha permesso di analizzare un maggior numero di geni correlati agli alti livelli dei marcatori di staminalità (Fig 4.30).



Figura 4.30 Valutazione dei geni negativamente correlati ai marcatori di staminalità. A. Schematizzazione dei geni negativamente associati agli alti livelli di espressione dei geni di staminalità. B. Rappresentazione schematica dei pathway significativamente coinvolti.

Sono stati così identificati 22 geni con coefficiente R negativo che sono regolati da *ABCG2 e NANOG, ABCG2 e CD133, NANOG e CD133* (Fig 4.30A).

Rispetto all'analisi precedente, si osserva il coinvolgimento anche di altri fattori quali *NANOG e CD133*, mettendo in evidenza come l'associazione fra staminalità e metabolismo sia attribuibile a molteplici fattori. L'esito di queste analisi evidenzia che le vie metaboliche con coefficiente R negativo associate all'alta espressione dei marcatori di staminalità sono rappresentate dalla sintesi dei trigliceridi e dal metabolismo dei lipidi (Fig 4.30B).

Questa analisi ha inoltre evidenziato una particolare *signature* di *CD133*. Sono state identificate le subunità dei complessi I, III, IV, V della catena respiratoria mitocondriale a codifica nucleare associate negativamente all'espressione di *CD133*, suggerendo un rallentamento del metabolismo OXPHOS in cellule con elevati livelli del marcatore CD133 (Tab 4.10).

Complesso I		Complesso III		Complesso IV		Complesso V	
Gene	Coefficiente R	Gene	Coefficiente R	Gene	Coefficiente R	Gene	Coefficiente R
NDUFA13	-0.11	UQCRB	-0.166	COX8A	-0.128	ATP6V1D	-0.152
NDUFA7	-0.139	UQCR11	-0.119	СОХ7В	-0.114	ATP6V1F	-0.169
NDUFB7	-0.174			COX6A1	-0.118	ATP6V1B1	-0.171
NDUFA12	-0.114			COX5B	-0.113	ATP5MC2	-0.118
NDUFA3	-0.14			СОХ6С	-0.13	ATP5MC3	-0.144
NDUFA10	-0.118			COX7C	-0.163	ATP5MC1	-0.146
NDUFA2	-0.168			COX6B1	-0.124	ATP5IF1	-0.118
NDUFA1	-0.114					ATP5F1B	-0.115
NDUFC2	-0.129					ATP5MF	-0.172
NDUFC1	-0.18					ATP5PD	-0.122
NDUFS7	-0.14					ATP5F1D	-0.144
NDUFA4L2	-0.155					ATP5PO	-0.123

 Tabella 4.10 Rappresentazione della signature OXPHOS di CD133.

Inoltre, parallelamente, sono stati analizzati i geni che mostrano un coefficiente R positivo (Fig 4.31).



Figura 4.31 Valutazione dei geni positivamente correlati ai marcatori di staminalità. A. Schematizzazione dei geni positivamente associati agli alti livelli di espressione dei geni di staminalità. B. Rappresentazione schematica dei pathway significativamente coinvolti

L'analisi di correlazione dell'espressione genica ha portato all'identificazione di 37 geni, la maggior parte dei quali sono regolati da *KLF4 e SOX2 o CXCR4 e SOX2*; solo due geni sono stati associati a tre marcatori: *KLF4, NANOG e SOX2* (Fig 4.31A).

Le vie metaboliche identificate sono la β -ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale e perossisomiale, la via PPAR e la regolazione del metabolismo lipidico effettuata da *PPAR* α (Fig 4.31B).

Al fine di avere una visione completa delle vie metaboliche che principalmente caratterizzano il fenotipo staminale le liste di geni provenienti da entrambe le analisi sono state unificate e, mediante il web tool Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kegg) pathways²²⁴, sono state identificate le vie metaboliche maggiormente rappresentate. Inoltre per ogni singolo gene estratto, dall'analisi

di espressione differenziale e di correlazione genica, è stata effettuata una ricerca in letteratura per identificare la funzione e il contributo nelle differenti vie metaboliche.

Gli alti livelli di espressione del fattore retinoid X receptor (*RXR*) che eterodimerizza con i tre fattori della via PPAR (*PPARa, PPARb, PPARy*) ha suggerito nuovamente il coinvolgimento della via di PPAR.

È da notare la sovraespressione del gene *TBL1X* (Fig 4.31A), la cui funzione è considerata indispensabile per l'attivazione di geni mediata da recettori nucleari, quali appunto PPAR. *TBL1X*, infatti, recluta il proteasoma per degradare il corepressore N-CoR and SMRT e favorisce lo scambio con il coattivatore²²⁵, promuovendo così l'attivazione della via di PPAR nei tumori caratterizzati da alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità.

L'analisi effettuata con Kegg pathways ha altresì portato all'estrazione della via: *Lipid metabolism regulation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha),* la quale vede il coinvolgimento di molteplici geni, tra i quali: *WWTR1, RXRA, CPT2, ACSL1, ME1, RORA, TBL1X, ANGPTL4, GRHL1, RGL1, TNFRSF21* e *SULT2A1.* La sovraespressione di tali geni risulta essere associata agli elevati livelli di espressione di *KLF4, SOX2, CXCR4.* Questo indica la presenza di un meccanismo volto a regolare il metabolismo dei lipidi che in questo caso sembrerebbe essere indotto da PPARα.

Dal punto di vista metabolico, le vie identificate sono rappresentate dalla β-ossidazione a livello dei perossisomi con il coinvolgimento di *ABCD1, CRAT,* e la β-ossidazione mitocondriale con *carnitina palmitoiltransferasi 2 (CPT2)* e *Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 1 (ACSL1)*. In particolare, questi ultimi catalizzano alcune delle tappe limitanti della degradazione degli acidi grassi a livello mitocondriale. La CPT2 è localizzata sulla membrana mitocondriale interna ed è coinvolta nel trasporto degli acidi grassi dal citosol nei mitocondri. ACSL1 è localizzata nel citosol ed è

coinvolta nell'attivazione degli acidi grassi in Acil-CoA, mediante una reazione di acilazione ATP dipendente.

Questi dati nel complesso suggeriscono l'attivazione della via di PPAR in associazione al fenotipo staminale, ed in particolare, tra i tre differenti fattori, sembrerebbe esserne responsabile il $PPAR\alpha$.

Tuttavia poiché tutti e tre i fattori PPAR sono coinvolti nella regolazione del metabolismo dei lipidi e nel mantenimento dell'omeostasi, rimane da definire se la via attivata sia coinvolta nel catabolismo o nell'anabolismo lipidico. Un'ipotesi plausibile è che il PPARα sia principalmente coinvolto nell'attivazione delle vie cataboliche, il che potrebbe giustificare gli alti livelli di espressione dei geni coinvolti nella β-ossidazione mitocondriale e perossisomiale.

In conclusione questa analisi bioinformatica suggerisce una correlazione positiva tra l'elevata espressione dei marcatori di staminalità e l'attivazione della via di PPAR, suggerendo un'importante ruolo nella regolazione e nel mantenimento dell'omeostasi del metabolismo lipidico nelle cellule staminali. Le principali vie metaboliche coinvolte sono rappresentate della β-ossidazione a livello dei perossisomi e la β-ossidazione mitocondriale.

Inoltre occorre mettere in evidenza la signature di CD133. Gli alti livelli sono associati ad una ridotta regolazione di alcune delle subunità dei complessi mitocondriali a codifica nucleare. Il rallentamento del metabolismo OXPHOS rappresenta un meccanismo di regolazione specifico del marcatore CD133.

Una quantità crescente di dati indica il coinvolgimento del metabolismo lipidico nelle CSC. L'alterazione del metabolismo lipidico esercita una forte influenza sulle proprietà delle CSC come la capacità di autorinnovamento, di differenziamento, di invasione, di metastatizzazione e di resistenza ai chemioterapici²²⁶. In OC la progressione nello stadio avanzato include la formazione di metastasi ovariche e intraperitoneali e l'80% delle pazienti presenta metastasi omentali²². L'omento funge da sito di accumulo per i lipidi dunque il metabolismo lipidico è stato fortemente associato alla progressione dell'OC ^{19,22,227}. D'altra parte, le cellule tumorali impongono il metabolismo negli adipociti inducendo l'idrolisi dei trigliceridi immagazzinati nei LD degli adipociti in acidi grassi e glicerolo che poi agiscono come fonte energetica per le cellule tumorali²². Quindi, i tumori ovarici metastatici che crescono in un microambiente ricco di lipidi hanno un tasso maggiore di βossidazione e di internalizzazione dei lipidi al fine di fornire una fonte di energia prontamente disponibile^{22,227}.

È interessante notare che l'aumento dell'assorbimento dei lipidi indica il ruolo cruciale che svolge il microambiente a supporto delle CSC: gli acidi grassi degli adipociti omentali potrebbero dunque supportare la crescita, la sopravvivenza e la chemioresistenza e il potenziale metastatico delle CSC²²⁶. Infatti, i lipidi immagazzinati nei LD svolgono un ruolo cruciale nel supportare la tumorigenicità delle CSC *in vivo*²²⁸. Dunque l'accumulo di lipidi nei LD può costituire un utile marcatore di CSC, come dimostrato nel cancro del colon-retto e dell'ovaio^{37,228}. Inoltre, in OC le CSC sono caratterizzate da maggiori percentuali di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) rispetto alle loro controparti non staminali²²⁸. I MUFA possiedo anche una funzione strutturale e alti livelli attenuano la tensione di membrana e inibiscono la divisione simmetrica, indicando l'importanza dei MUFA nel mantenimento delle CSC²²⁹. Dunque oltre alla glicolisi e alla fosforilazione ossidativa, i lipidi che risiedono nel microambiente sono anche utilizzati come fonte di energia nell'OC e come componenti strutturali al fine di favorire il mantenimento delle CSC^{22,226}.

In definitiva, l'analisi bioinformatica fornisce a questo studio molteplici informazioni poiché, oltre a definire le vie metaboliche preferenzialmente attivate dalla sottopopolazione staminale, mette in evidenza un'eterogeneità di popolazione tumorale e la presenza di CSC è già presente nel tumore primario.

La presenza dei marcatori staminali nel tumore primario suggerisce che un eventuale trattamento in CDDP porterebbe alla selezione di questa popolazione. Nelle linee resistenti al CDDP l'investigazione della via di PPAR e il metabolismo lipidico diventano le principali via da investigare.

4.8. Le linee resistenti mostrano un'attivazione della via di PPAR.

L'analisi bioinformatica effettuata sulle pazienti del TGCA suggerisce l'attivazione della via di PPAR nei tumori che mostrano alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità.

I PPAR sono fattori di trascrizione attivati da ligandi che appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari²³⁰. I PPAR eterodimerizzano con il recettore X dei retinoidi (RXR), attivando la trascrizione dei geni responsivi²³¹. Le sequenze responsive PPAR (PPRE) sono localizzate nel promotore dei geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi e nell'omeostasi energetica, inclusi il deposito, il catabolismo, il trasporto e l'assorbimento degli acidi grassi²³². Sono stati identificati tre fattori appartenenti alla famiglia dei PPAR, ovvero PPARα, PPARδ e PPARγ.

Alti livelli di espressione di PPAR α sono stati riscontrati nei tessuti caratterizzati da un elevato catabolismo degli acidi grassi. Il PPAR α regola l'espressione dei geni che codificano per enzimi implicati nella β -ossidazione perossisomiale, nell'assorbimento e nell'attivazione degli acidi grassi in esteri acil-CoA e nella β -ossidazione mitocondriale²³³.

Il PPARδ regola l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo energetico cellulare, nell'utilizzo dei lipidi e del glucosio e mantiene l'equilibrio energetico²³⁴.

Il PPARγ regola la trascrizione di più geni coinvolti nel differenziamento dei precursori delle cellule adipose²³⁵. Favorisce l'assorbimento degli acidi grassi da parte degli adipociti, la sintesi e l'accumulo del triacilglicerolo mantenendo l'omeostasi lipidica²³⁶. Inoltre è di cruciale importanza nella regolazione delle vie metaboliche coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi del glucosio, incluso l'aumento dell'espressione del trasportatore del glucosio di tipo 4 (Glut4)²³⁷.

Al fine di determinare se, come mostrato nell'analisi bioinformatica, le linee resistenti, caratterizzate da alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità, mostrino l'attivazione della via di PPAR, mediante qRT-PCR sono stati analizzati i livelli di espressione genica dei fattori PPAR nelle linee resistenti rispetto alle controparti sensibili (Fig 4.32).



Figura 4.32 Le linee resistenti caratterizzate da un fenotipo stem-like mostrano un'attivazione della via PPAR. Analisi di qRT-PCR dell'espressione **A**. della via PPAR, **B**. dei geni target di PPAR α , **C**. dei geni target di PPAR γ . Per la normalizzazione sono stati utilizzati i dati relativi al gene housekeeping HPRT. Il fold change è stato calcolato usando il metodo $\Delta\Delta$ CT e utilizzando i valori delle linee sensibili come controllo. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 4. (*p<0.05, ** p<0.01, ****p < 0.0001)

La linea OC314R mostra un aumento dei livelli di espressione di *PPARa* di 1,8 volte e di *PPARy* di 7,60 volte rispetto alla linea sensibile. Non vi sono significative differenze dei livelli di espressione in *PPARδ* tra la linea resistente e sensibile (Fig 4.32A). Parallelamente, le cellule OV90R mostrano un incremento di 2 volte per *PPARa* e di 1,3 volte per *PPARy* rispetto alla linea sensibile. Non mostrano differenze dei livelli di espressione in *PPARδ*. Questi dati suggeriscono che le linee resistenti, aventi un fenotipo *stem-like*, sono caratterizzate da un'incrementata espressione dei fattori *PPARα* e *PPARγ*.

Per confermare l'attivazione di entrambi i fattori sono stati analizzati i livelli di espressione dei geni target, ovvero *ABCA4 e APOA1* per *PPAR* α (Fig 4.32B), e *HSPD1, TXNIP3, DGAT1* per *PPAR* γ (Fig 4.32C).

L'analisi dei geni target di *PPAR* α mostra un significativo aumento di espressione di *APOA1* di 1,5 volte e una tendenza non significativa di *ABCA4* nella linea OC314R rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.32B). Nella linea cellulare OV90R si verifica l'effetto opposto, ovvero un significativo aumento di *ABCA4* di 10 volte e una tendenza non significativa per *APOA1* rispetto alla linea sensibile (Fig 4.32B).

L'analisi dei geni target di *PPARy* mostra che nelle cellule OC314R i livelli di espressione dei geni *HSPD1, TXNIP3, DGAT1* aumentano rispettivamente di 1,5, 2,6 e 1,4 volte rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.32C). Questi incrementi correlano con l'alto livello di espressione *PPARy* osservato nella linea OC314R rispetto alla linea sensibile (Fig 4.32A) Nella linea OV90R si apprezza un aumento dei livelli di espressione di *HSPD1* di 1,3 volte e di *DGAT1* di 1,2 volte in confronto alla linea sensibile. Non si osservano differenze significative tra la linea sensibile e resistenti di *TXNIP3*.

125

Questi dati, oltre a validare alcuni dati ottenuti dall'analisi bioinformatica realizzata nel dataset TCGA, suggeriscono l'attivazione dei fattori *PPAR* α e *PPAR* γ nelle linee resistenti, le quali sono caratterizzate da un fenotipo *stem-like*.

I fattori *PPARα* e *PPARγ* hanno un ruolo nella regolazione del metabolismo lipidico ed un'attivazione di entrambi i fattori potrebbe favorire un'alta efficienza nel trasporto dei lipidi nello spazio intracellulare. Poiché *PPARα* e *PPARγ* sono coinvolti rispettivamente nell'attivazione di vie cataboliche e anaboliche, la loro attivazione potrebbe essere necessaria nel mantenimento di un delicato equilibrio. È plausibile ipotizzare che l'eccesso dei lipidi incorporato nello spazio intracellulare potrebbe essere in parte indirizzato verso la sintesi del triacilglicerolo (TAG) e il conseguente inglobamento nei LD mediante l'attivazione del *PPARγ*, ed in parte utilizzato per la βossidazione mediante l'attivazione del *PPARα*. L'equilibrio tre le vie anaboliche e cataboliche potrebbe inoltre essere coinvolto nel mantenimento del *self-renewal*²³⁸. In accordo, l'inibizione della β-ossidazione induce una perdita del fenotipo staminale favorendo la divisione simmetrica a scapito del *self-renewal*.

L'insieme di questi dati mette in evidenza che le linee resistenti acquisiscono un metabolismo ibrido. I dati precedenti hanno dimostrato l'acquisizione di un metabolismo prevalentemente glicolitico (Fig 4.10B). In aggiunta l'analisi bioinformatica, confermata in qPCR (Fig. 4.32), mostra un'attivazione della via PPAR, suggerendo il coinvolgimento del metabolismo lipidico nelle linee resistenti aventi caratteristiche *stem-like*. Dunque, il trattamento cronico con CDDP favorisce la selezione di cellule resistenti che vanno incontro ad una riprogrammazione metabolica verso il metabolismo glicolitico e la β-ossidazione. Il metabolismo ibrido, in associazione ad un tasso di proliferazione più lento, suggerisce che i cambiamenti metabolici potrebbero svolgere un ruolo importante nel consentire l'acquisizione della resistenza e di caratteristiche *stem-like*. Infine, degno di nota è il coinvolgimento della via di PPAR nella regolazione diretta e indiretta di *ABCG2*. La regolazione diretta avviene grazie alla presenza di sequenze responsive a PPAR a monte della regione *enhancer* di *ABCG2*, il cui legame con *PPARa* e *PPARy* determina l'aumento di espressione^{239,240}. La regolazione indiretta viene esercitata sulla funzione di *ABCG2*. Tali fattori sono in grado di regolare i livelli di lipidi, quali il colesterolo. Questo è importante nel mantenimento della struttura delle membrane cellulari e nella modulazione dell'attività di *ABCG2*²⁴¹. Infatti il colesterolo è un modulatore del trasporto, in quanto aumenta l'attività di ATPasi di *ABCG2*. La localizzazione del trasportatore ABC nei *rafts lipidici* è, dunque, vantaggiosa per la funzione di *ABCG2*²⁴¹.

Concludendo, le linee resistenti sono caratterizzate dall'attivazione della via PPAR, la quale essendo coinvolta in molteplici vie contribuisce al mantenimento del *self renewal* e quindi della staminalità mantenendo l'omeostasi dei lipidi. Inoltre, potrebbe contribuire al mantenimento della resistenza al CDDP mediante la regolazione di *ABCG2*.

4.9. La popolazione CD133⁺ resistente al CDDP mostra un elevato accumulo di lipid droplets.

Il coinvolgimento del metabolismo lipidico in associazione ai marcatori di staminalità, evidenziato dall'analisi bioinformatica, apre una serie di riflessioni sul coinvolgimento di questa via nella fisiopatologia del tumore ovarico. L'importanza del metabolismo lipidico in OC è stata riportata da Nieman e collaboratori²². Il principale sito di metastasi dell'OC è l'omento e l'80% delle pazienti affette da OC presenta delle metastasi omentali¹⁹. Gli adipociti dell'omento, mediante il rilascio di adipochine, promuovono la metastatizzazione delle cellule di OC. Inoltre, forniscono gli acidi grassi alle cellule tumorali, le quali, mediante l'attivazione dei sistemi di trasporto degli acidi grassi e la β-ossidazione, vanno incontro ad una rapida crescita e a metastatizzazione²². Inoltre il metabolismo lipidico potrebbe indurre una protezione dello stress ossidativo indotto dal chemioterapico

attraverso la formazione dei LD. Questi, infatti, inglobano molecole dannose come ROS o lipidi perossidati²⁴², dunque potrebbero proteggere le cellule dallo stress ossidativo, aumentando così la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Alla luce di queste considerazioni, è stata valutata la capacità delle CSC e delle linee resistenti al CDDP di internalizzare e accumulare i lipidi. La presenza di LD e il contenuto totale dei lipidi sono stati quantificati in associazione al marcatore di staminalità CD133 coniugato al fluorocromo APC. L'analisi è stata condotta in citofluorimetria su cellule in coltura in 2D. Al tal fine sono state utilizzate due sonda specifiche per i LD e per il contenuto totale dei lipidi: rispettivamente LD540 coniugata al fluorocromo PE e Bodipy 493/503 coniugata al fluorocromo FITC (Fig 4.33).



Figura 4.33 Le linee resistenti sono caratterizzate da una popolazione CSC con un elevato contenuto di LD e di lipidi totali. A Marcatori di staminalità in citofluorimetria. L'analisi è stata effettuata in basale in 2D. Gli istogrammi nero e grigio rappresentano le linee sensibili. Nel grafico sono mostrate le percentuali di cellule positive a CD133 (APC). **B** Analisi del contenuto dei LD in citofluorimetria in associazione al marcatore di staminalità. LD540 (PE) e CD133 (APC). Nel grafico sono mostrate le percentuali di cellule *CD133⁺LD540^{high}*. **C** Analisi del contenuto totale dei lipidi intracellulari in citofluorimetria in associazione al marcatore di staminalità. Bodipy 493/503 (FITC) e CD133 (APC). Nel grafico sono mostrate le percentuali di cellule *CD133⁺B0dipy^{high}*. In tutte le analisi per ogni linea sono stati analizzati 50.000 eventi. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 4. (*p<0.05, ** p<0.01, ****p < 0.0001).

Come visto precedentemente, vi è una differenza nel quantitativo di CSC tra la linea OC314R e OV90R in termini di positività CD133⁺/CXCR4⁺ (Fig 4.23A). Poiché è stato possibile analizzare il contenuto di LD e di lipidi totali in associazione ad un solo marcatore di staminalità, in questo esperimento la positività è stata valutata solo in funzione di CD133⁺. La linea OC314R è caratterizzata dal 2% di popolazione CD133⁺, invece, nelle cellule OV90R si osserva quasi una completa selezione della popolazione con il 90% di popolazione positiva per CD133 (Fig 4.33A).

In questo studio, è stata analizzata la percentuale di popolazione CSC caratterizzata da un elevato contenuto di LD e di lipidi totali.

Le linee cellulari OC314R e le OV90R mostrano un significativo aumento della popolazione CD133⁺LD540^{high} e CD133⁺Bodipy^{high} rispetto alla controparte sensibile. Le cellule OC314R sono caratterizzate dal'1,94% CD133⁺LD540^{high} rispetto allo 0,18% della linea sensibile (p=0,005) (Fig 4.33B). Parallelamente, la linea cellulare OV90R mostra l'8,6% CD133⁺LD540^{high} rispetto allo 0,3% della controparte sensibile (p=0,003) (Fig 4.33B). Questo dato è stato ulteriormente confermato mediante l'uso della sonda Bodipy 493/503, la quale consente di quantificare la popolazione CSC avente un elevato contenuto lipidico intracellulare. Nello specifico la linea cellulare OC314R mostra l'1,40% di popolazione CD133⁺Bodipy^{high} rispetto allo 0,2% della popolazione sensibile (p=0,04) (Fig 4.33C). Un andamento simile è stato osservato anche nelle cellule OV90R, le quali sono caratterizzate dal 2,2% CD133⁺Bodipy^{high} rispetto allo 0,12% della controparte sensibile (p=0,01) (Fig 4.33C).

Questi risultati suggeriscono che la popolazione CD133⁺, nelle linee resistenti al platino, presenti un incremento del contenuto lipidico intracellulare, suggerendo che i LD potrebbero essere considerati come marcatori specifici per identificare la popolazione staminale³⁷, confermando la specifica *signature* morfologica correlata ad un alto potenziale tumorigenico³⁷.

Inoltre, è stata valutata la capacità della popolazione CSC di accumulare lipidi in seguito al trattamento con l'acido oleico (OA), un acido grasso esogeno monoinsaturo a 18 atomi di carbonio. Le analisi metaboliche sulla composizione degli acidi grassi presenti nell'omento hanno infatti identificato che i MUFA rappresentano il 33,5% delle specie lipidiche associate agli adipociti dell'omento²⁴³. In particolare, l'OA (18:1) rappresenta il 27,2%. Pertanto è stato valutato se la presenza dell'OA, mimando il microambiente dell'omento, possa favorire l'accumulo dei LD nella popolazione staminale. Il trattamento è stato effettuato per 20h in 2D utilizzando due diverse concentrazioni di OA: 50μM e 100 μM. In seguito è stata monitorata la capacità della popolazione CD133⁺LD540^{high} e CD133⁺Bodipy^{high} di internalizzare e accumulare lipidi. L'analisi è stata condotta in citofluorimetria su cellule in coltura in 2D dopo 20h di trattamento con OA (Fig 4.34, 4.35).



Figura 4.34 Linee resistenti OC314R CD133⁺LD540^{high} e OV90R CD133⁺LD540^{high} mostrano una maggiore capacità di accumulare LD in risposta ad uno stimolo esogeno. Analisi del contenuto dei LD in citofluorimetria in associazione al marcatore di staminalità. LD540 (PE) e CD133 (APC). È stato effettuato un trattamento in 2D per 20h con OA utilizzando le concentrazioni di 50-100µM. Nel grafico sono mostrate le percentuali di cellule CD133⁺LD540^{high}. In tutte le analisi per ogni linea sono stati analizzati 50.000 eventi. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 4. (*p<0.05, ** p<0.01).

I risultati dimostrano che, in generale, la linea cellulare OC314R ha una maggiore capacità di accumulare LD in risposta all'AO rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.34). La controparte sensibile mostra lo 0,5% CD133⁺LD540^{high} nella condizione di 50 μM e 100μM rispetto allo 0,18% osservato nella condizione in assenza di trattamento (p=0,001). Si potrebbe ipotizzare che la linea sensibile OC314 CD133⁺LD540^{high} raggiunga la capacità massima di accumulare LD a basse

concentrazioni di OA (50μM), e che pertanto non si osservano degli effetti a concentrazioni di OA più elevate. La linea OC314R CD133⁺LD540^{high} è caratterizzata da aumento dell'accumulo dei LD non significativo. Parallelamente le linee cellulari OV90 CD133⁺LD540^{high} e OV90R CD133⁺LD540^{high} mostrano un incremento dei LD solo in seguito ad alte concentrazioni di OA (Fig 4.35). La popolazione sensibile OV90 CD133⁺LD540^{high} mostra l'1% CD133⁺LD540^{high} dopo il trattamento con 100μM di OA rispetto allo 0,3% della condizione priva di OA. La popolazione OV90R CD133⁺LD540^{high} è caratterizzata dal 17% CD133⁺LD540^{high} dopo il trattamento con 100μM di OA rispetto all'8,6% in assenza di OA (p=0,03).

Complessivamente, questi dati suggeriscono una maggiore capacità delle linee resistenti OC314R CD133⁺LD540^{high} e OV90R CD133⁺LD540^{high} di accumulare LD in seguito ad uno stimolo esogeno rispetto alle controparti sensibili.

Un andamento simile è stato ottenuto utilizzando la sonda Bodipy 493/503 (Fig 4.35), la quale consente di quantificare il contenuto lipidico totale, ovvero anche i lipidi non inglobati nei LD.



*Figura 4.35 Linee resistenti OC314R CD133*Bodipy*^{high} *e OV90R CD133*Bodipy*^{high} *mostrano una maggiore capacità di accumulare lipidi in risposta ad uno stimolo esogeno*. Analisi del contenuto dei LD in citofluorimetria in associazione al marcatore di staminalità. Bodipy (FITC) e CD133 (APC). Nel grafico sono mostrate le percentuali di cellule $CD133^+Bodipy^{high}$. È stato effettuato un trattamento in 2D per 20h con OA utilizzando le concentrazioni di 50-100µM. In tutte le analisi per ogni linea sono stati analizzati 50.000 eventi. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 4. (*p<0.05, ** p<0.01).

Anche in questo caso, i risultati dimostrano che la linea resistente OC314R CD133⁺Bodipy^{high} mostra un incremento non significativo del contenuto totale di lipidi in risposta ad alte concentrazioni di OA (p=0,06), con un 2,8% CD133⁺Bodipy^{high} rispetto all'1,4% osservato nella condizione in assenza di trattamento con OA (Fig 4.36). Parallelamente la controparte sensibile OC314 CD133⁺Bodipy^{high} è caratterizzata da un significativo incremento. Il 2,15% delle cellule CD133⁺Bodipy^{high} aumentano il contenuto totale dei lipidi in risposta ad alte concentrazioni di OA rispetto all'0,2% della condizione in assenza di trattamento con OA (p=0,04). Nella popolazione OV90R CD133⁺Bodipy^{high}, in risposta all'OA si osserva un incremento significativo del 6,4% CD133⁺Bodipy^{high} rispetto al 2,2% del non trattato (p=0,02) (Fig 4.35). Non si osservano significative differenze nella linea sensibile OV90.

Questi dati suggeriscono che le popolazioni resistenti OC314R CD133⁺LD540^{high} e OV90R CD133⁺LD540^{high}, in risposta alla presenza di acidi grassi esogeni, presentino una maggiore capacità di incrementare il contenuto totale dei lipidi intracellulari.

Dunque, la presenza dell'OA e di un microambiente ricco di lipidi, quale l'omento potrebbero favorire l'accumulo di LD nelle cellule resistenti. Nieman e collaboratori dimostrarono che la cocoltura di adipociti con cellule di OC promuove una maggiore lipolisi negli adipociti favorendo un incremento dell'internalizzazione dei lipidi e β-ossidazione nelle cellule tumorali. In aggiunta, nel nostro studio è stato dimostrato che queste caratteristiche sono una maggiore peculiarità delle cellule tumorali che mostrano una resistenza al CDDP e presentano caratteristiche *stem-like*. Dunque, il microambiente riscontrato nell'omento potrebbe favorire la selezione e il mantenimento delle cellule resistenti con caratteristiche aggressive favorendo i processi di recidiva.

L'insieme di questi dati mette in evidenza la possibilità di identificare la popolazione CSC mediante i LD o attraverso il contenuto totale di lipidi, i quali pertanto si propongono come specifici marcatori della popolazione staminale. L'acquisizione della resistenza al CDDP rafforza la capacità delle CSC di incrementare l'accumulo dei lipidi. Tuttavia, poiché il trattamento con OA mima il microambiente dell'omento, sono necessari ulteriori studi al fine di valutare se l'incremento dei LD e del contenuto lipidico osservato nella popolazione CD133⁺ possa essere correlato, oltre che ad un incremento della tumorigenicità, anche ad un incremento della resistenza al platino.

Studi recenti hanno mostrato che elevati livelli di LD sono associati all'aggressività del tumore e alla chemioresistenza³⁷.

134

In relazione alla chemioresistenza, la presenza di LD potrebbe rappresentare un sistema di protezione per i danni indotti dal CDDP. Infatti, solo l'1% del CDDP intracellulare agisce sul DNA determinando la formazione di addotti, mentre la restante parte interagisce con diverse componenti cellulari²⁴⁴. In questo caso la presenza dei LD potrebbe favorire l'inglobamento dei lipidi per evitare che questi vengano danneggiati dallo stress ossidativo indotto dal CDDP, garantendo la sopravvivenza.

Dal punto di vista energetico, i LD potrebbero rappresentare un'alternativa fonte di ATP, NADPH mediante la β -ossidazione^{24,34}. Infatti, questa è caratterizzata da una serie di reazioni cicliche che generano in ogni ciclo il NADH, il FADH₂ e l'acetil CoA, dove il NADH e il FADH₂ alimentano la catena di trasporto degli elettroni per produrre ATP, mentre l'Acetil-CoA entra nel ciclo di Krebs e, insieme all'ossalacetato, dà origine al citrato che può andare incontro ad una reazione di ossidazione. Questa è una delle principali fonti di produzione cellulare di NADPH che è essenziale per la detossificazione dei ROS²⁴.

Infine, il contenuto dei LD è una riserva di lipidi sia per la sintesi di nuove membrane, sia per la sintesi di molecole con funzione di signaling, le quali, rilasciate nello spazio extracellulare, potrebbero attivare altre vie coinvolte nella migrazione e nell'invasione²⁴⁵.

In questo contesto, ancora una volta svolge un ruolo importante *ABCG2* che, oltre ad avere un ruolo nel mantenimento e nella sopravvivenza delle CSC, è anche coinvolto nell'esportazione dei lipidi con funzione di signaling, quali ad esempio il colesterolo, ormoni steroidei e metaboliti²⁴⁶. L'insieme di questi dati mette in evidenza la presenza di uno specifico marcatore metabolico che permette di identificare le CSC rispetto alla popolazione differenziata suggerendo la capacità delle CSC di internalizzare i lipidi. Diventa particolarmente importante se si considera la relazione simbiotica tra le cellule di OC e gli adipociti presenti nell'omento. Infatti, la capacità di internalizzare i lipidi è stata associata ad una maggiore capacità di metastatizzare e alla recidiva.

135

4.10. *Le linee resistenti mostrano un'attivazione dei trasportatori degli acidi grassi.*

In questa parte dello studio, è stata valutata l'attivazione di alcuni dei trasportatori degli acidi grassi nelle linee resistenti, caratterizzate da alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità, rispetto alle controparti sensibili. Nello specifico è stata analizzata l'espressione dei trasportatori degli acidi grassi *Cluster of differentiation 36 (CD36)* e *Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4)*.

CD36 è una glicoproteina di membrana appartenente alla famiglia dei recettori scavenger di classe B. Svolge diverse funzioni, tra le quali favorisce l'assorbimento degli acidi grassi, è coinvolta nel metabolismo dei lipidi²⁴⁷ e promuove il processo di metastatizzazione. In OC, il trasportatore è maggiormente espresso nelle metastasi rispetto al tumore primario²⁴⁸, ed è stato identificato come un importante fattore coinvolto nella riprogrammazione metabolica. L'espressione di *CD36* riduce l'ossidazione del glucosio da parte delle cellule tumorali e riprogramma il metabolismo favorendo l'assorbimento e l'immagazzinamento di lipidi esogeni mentre la sintesi lipidica endogena è inibita³³.

FABP4 è uno chaperone lipidico intracellulare che lega e ridistribuisce gli acidi grassi intracellulari. La funzione di *FABP4* è quella di partecipare al trasporto dei lipidi, di promuovere l'assorbimento degli acidi grassi a catena lunga e di regolare il metabolismo lipidico²⁴⁹. La sovraespressione di *FABP4* è stata riportata in diversi tipi di tumori come l'OC. Tale trasportatore favorisce l'interazione cellula tumorale-adipocita aumentando la disponibilità dei lipidi e supportando il processo di metastatizzazione^{22,31}. Inoltre gli alti livelli di espressione di *FABP4* sono stati associati alla presenza di specie lipidiche prevalentemente insature e al catabolismo degli acidi grassi³¹.

Al fine di valutare se l'accumulo dei LD sia associato all'aumentata capacità delle linee resistenti, aventi caratteristiche *stem-like*, di internalizzare i lipidi è stata valutata l'espressione genica di *CD36* e *FABP4*. Mediante qRT-PCR sono stati analizzati i livelli di espressione genica dei due trasportatori nelle linee resistenti, caratterizzate da un arricchimento della popolazione CSC, rispetto alle controparti sensibili. (Fig 4.37).



Figura 4.37 Le linee resistenti mostrano un'attivazione del trasportatore degli acidi grassi CD36. Analisi di qRT-PCR dell'espressione dei trasportatori di FA. Per la normalizzazione sono stati utilizzati i dati relativi al gene housekeeping HPRT. Il fold change è stato calcolato usando il metodo $\Delta\Delta$ CT e utilizzando i valori delle linee sensibili come controllo. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 4. (*** p<0.001, ****p < 0.0001)

La linea cellulare OC314R mostra un incremento dei livelli di espressione di *CD36* di 14,3 volte rispetto alla controparte sensibile. Parallelamente le cellule OV90R sono caratterizzate da un aumento dell'espressione di 7,6 volte rispetto alla linea sensibile. Questi dati suggeriscono che entrambe le linee resistenti presentino una maggiore capacità di internalizzare i lipidi esogeni. Invece, entrambe le linee cellulari OC314R e OV90R riducono significativamente i livelli di espressione di *FABP4* di 0,6 volte rispetto alla controparte sensibile.

In relazione al trasportatore *FABP4, ex-vivo,* è stato osservato che i livelli di espressione aumentano nelle cellule di OC nell'interfaccia adipociti-cancro, ma non sono stati rilevati nelle cellule di OC lontani da quest'ultima e nei tessuti benigni adiacenti all'OC²². Queste osservazioni, dunque, mettono in evidenza che l'aumento dell'espressione di *FABP4* richieda un particolare microambiente. Sembrerebbe, infatti, che la presenza degli adipociti sia in grado di modulare l'espressione del trasportatore, mettendo in evidenza che, al fine di metastatizzare sia necessario

l'instaurarsi di una simbiosi tra la cellula tumorale e l'adipocita. Queste premesse potrebbero giustificare i bassi livelli di espressione di *FABP4* osservati in questo studio.

In relazione al trasportatore *CD36*, questo potrebbe avere un duplice ruolo. Infatti, così come per *FABP4*, molteplici studi hanno dimostrato come la sua espressione sia dipendente da un microambiente ricco di adipociti ^{33,248}. Dal punto di vista del metabolismo lipidico CD36 promuove il processo di metastatizzazione regolando la β-ossidazione²⁵⁰. Allo stesso modo recenti studi hanno dimostrato come la sua funzione possa essere correlata al processo di metastatizzazione e all'acquisizione di caratteristiche *stem-like*²⁵¹. *CD36* è altamente espresso nelle CSC e la sua espressione permette di distinguere le cellule caratterizzate dal *self-renewal*. Inoltre è stato osservato che è co-espresso con CD133 e l'inibizione di *CD36* determina una perdita delle capacità di autorinnovamento e della capacità di dare origini alle metastasi²⁵¹. Inoltre, l'elevata espressione di *CD36* caratterizza le CSC del cancro della testa e del collo coinvolte nel processo di metastatizzazione. Il potenziale metastatico della sottopopolazione CD36⁺ dipende dalla capacità del trasportatore di internalizzare gli acidi grassi²⁷. L'insieme di questi dati suggerisce un ruolo protumorigenico di *CD36* e supporta il coinvolgimento del catabolismo lipidico in linee cellulari caratterizzate da un fenotipo *stem-like*. Conferma, inoltre, le caratteristiche *stem-like* acquisite dalle linee resistenti OC314R e OV90R, quali l'autorinnovamento.

L'insieme dei dati finora ottenuti ha messo in evidenza che le linee resistenti, oltre a presentare caratteristiche *stem-like*, mostrano un'attivazione della via del PPARα e del PPARγ, la quale potrebbe essere necessaria nel mantenimento dell'omeostasi del metabolismo lipidico. L'aumentata espressione di *CD36* nelle cellule OC314R e OV90R suggerisce una maggiore capacità di internalizzare i lipidi esogeni da parte di queste cellule. È plausibile ipotizzare che l'eccesso dei lipidi incorporato nello spazio intracellulare potrebbe essere, in parte, indirizzato verso la sintesi del triacilglicerolo (TAG) e il conseguente inglobamento nei LD, mediante l'attivazione del PPARγ, in parte utilizzato per la β -ossidazione mediante l'attivazione del PPAR α . L'insieme di questi dati mette in evidenza il coinvolgimento del metabolismo lipidico nell'acquisizione della chemioresistenza e delle caratteristiche *stem-like*. Associazione messa in evidenza anche dall'analisi bioinformatica effettuata sulle pazienti del TCGA.

4.11. Le linee resistenti, aventi caratteristiche stem-like, mostrano un metabolismo glicolitico.

I dati precedenti hanno mostrato che le linee resistenti presentano un'aumentata capacità di internalizzare il glucosio rispetto alla controparte sensibile. Questo, in associazione all'acquisizione di un basso profilo OXPHOS, indica una riprogrammazione metabolica verso il metabolismo glicolitico (Fig 4.10). Al fine di verificare se l'acquisizione del metabolismo glicolitico sia una caratteristica, oltre che della resistenza al platino, anche della sub-popolazione staminale è stata valutata l'internalizzazione del glucosio mediante l'utilizzo della sonda fluorescente analoga al glucosio 2-NBDG coniugata al fluorocromo FITC, in associazione al marcatore di staminalità CD133 coniugato al fluorocromo APC. Questa analisi ha permesso, mediante la valutazione della MFI internalizzata dalle cellule, di quantificare l'internalizzazione del glucosio (Fig 4.37A). L'analisi, condotta in citofluorimetria, ha permesso di quantificare parallelamente la popolazione CSC e l'internalizzazione del glucosio.



Figura 4.37 Le linee resistenti al CDDP sono caratterizzate da un aumento dell'internalizzazione del glucosio. A. Analisi in citofluorimetria dell'internalizzazione del glucosio 2-NDGB-FITC in associazione al marcatore di staminalità CD133-APC. I livelli di MFI della popolazione CD133⁺, CD133⁻ e della popolazione totale sono stati normalizzati sui rispettivi livelli di MFI delle rispettive popolazioni delle linee sensibili. La linea tratteggiata rappresenta le popolazioni della linea sensibile. La linea tratteggiata rappresenta la rispettiva popolazione sensibile. Per ogni linea sono stati analizzati 50.000 eventi. B. Analisi di qRT-PCR dell'espressione di PDK4. Per la normalizzazione sono stati utilizzati i dati relativi al gene housekeeping HPRT. Il fold change è stato calcolato usando il metodo $\Delta\Delta$ CT e utilizzando i valori delle linee sensibili come controllo. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 4. (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

La linea cellulare OC314R mostra un aumento della MFI relativa al fluorocromo FITC e dunque dell'internalizzazione del glucosio rispetto alla controparte sensibile. In particolare questo aumento, rispetto alla linea sensibile, è significativamente visibile nelle tre popolazioni osservate: nella CD133⁺, nella CD133⁻ e infine nella popolazione totale (Fig 4.37A). La popolazione CD133⁺ aumenta l'internalizzazione del glucosio di 3,14 volte, mentre la CD133⁻ e la popolazione totale di 1,6 volte rispetto alle popolazioni della controparte sensibile. Inoltre, si può osservare come l'incremento

dell'internalizzazione del glucosio sia una caratteristica non solo della linea cellulare resistente al platino ma anche, all'interno della popolazione resistente, delle CSC il cui incremento è pari a 2 volte rispetto alla controparte differenziata (Fig 4.37A). Anche nella linea cellulare OV90R si osserva l'aumento dell'internalizzazione del glucosio in due delle tre popolazioni caratterizzate. Nella popolazione CD133⁺ si manifesta un incremento di 1,3 volte e nella popolazione totale di 1,7 volte rispetto alle popolazioni sensibili delle OV90 (Fig 4.37A). All'interno della popolazione resistente si osserva un significativo aumento dell'internalizzazione del glucosio nella popolazione CSC rispetto alla non-CSC (OV90R CD133⁺ 1,27 MFI rispetto a OV90R CD133⁻ 0,81 MFI (p=0,03)). L'insieme di questi dati suggerisce come l'internalizzazione del glucosio possa essere considerata una caratteristica peculiare non solo delle linee resistenti alla chemioterapia ma anche della popolazione CSC. Dato l'incremento dei livelli di internalizzazione del glucosio, questi dati suggeriscono che la popolazione totale resistente, avente alti livelli di espressione dei marcatori di staminalità, sia caratterizzate da un fenotipo metabolico prevalentemente glicolitico.

Le CSC e la popolazione totale condividono le stesse caratteristiche metaboliche: l'internalizzazione del glucosio. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la popolazione CSC mascheri il fenotipo della componente differenziata, o che il CDDP abbia un ruolo sinergico con l'acquisizione delle caratteristiche *stem-like*.

A supporto di tale ipotesi, in uno studio condotto da Liao e collaboratori è stato mostrato che in OC le CSC sono caratterizzate da un incremento della glicolisi, in aggiunta il trattamento con CDDP ha favorito la selezione delle CSC rispetto alla controparte differenziata²⁵². Pertanto, il fenotipo metabolico osservato nelle cellule staminali potrebbe conferire sia una maggiore aggressività che una maggiore resistenza alla terapia.

Jiang e collaboratori hanno identificato l'isoforma della piruvato deidrogenasi chinasi 4 (PDK4) come marcatore molecolare di un fenotipo glicolitico in OC. La popolazione CSC isolata da ascite presentava una correlazione tra fenotipo staminale e gli alti livelli di espressione di *PDK4*²²¹. *PDK4* è un enzima che fosforila negativamente la piruvato deidrogenasi, inibisce la conversione del piruvato in Acetil-CoA, impedendo l'ossidazione nei mitocondri. Alla luce di queste considerazioni, in questo studio nelle linee cellulari resistenti OC314R e OV90R, caratterizzate da un fenotipo *stem-like* e da un aumento dell'internalizzazione del glucosio, è stata valutata l'espressione di *PDK4* (Fig 4.37B). Mediante qRT-PCR sono stati analizzati i livelli di espressione genica del marcatore nelle linee resistenti rispetto alle controparti sensibili.

Le linee resistenti OC314R e OV90R sono caratterizzate da un aumento dei livelli di espressione di *PDK4* rispettivamente di 2 volte e 2,3 volte rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.37B). Questi dati suggeriscono la dipendenza dal metabolismo glicolitico della popolazione resistente al chemioterapico. Inoltre poiché l'enzima PDK4 rallenta l'ossidazione del piruvato nei mitocondri, gli alti livelli di espressione osservati nelle linee resistenti, aventi caratteristiche *stem-like*, potrebbero giustificare il basso profilo OXPHOS (Fig. 4.10A).

L'attivazione della PDK4 potrebbe determinare la riprogrammazione metabolica dal catabolismo del glucosio verso l'utilizzo degli acidi grassi. Infatti, PDK4, limita la conversione del piruvato in acetil-CoA. Con meno acetil-CoA disponibile, la sintesi di malonil-CoA, un inibitore dell'ossidazione degli acidi grassi, è ridotta. Di conseguenza, l'ossidazione degli acidi grassi potrebbe essere sia forzata che facilitata dalla sovraespressione di *PDK4*^{253,254}. Pertanto, l'analisi di espressione genica dell'enzima *PDK4* da una duplice informazione: da un lato mette in evidenza che il basso profilo OXPHOS, osservato nelle linee resistenti aventi caratteristiche *stem-like*, potrebbe dipendere da una limitata conversione del piruvato in acetil-CoA, dall'altro suggerisce il catabolismo degli acidi grassi. Tuttavia sono necessari saggi funzionali per poter validare questa ipotesi.

L'insieme di questi dati mette in evidenza, come il trattamento cronico con CDDP e l'acquisizione del fenotipo *stem-like* siano associati ad una regolazione positiva del metabolismo glicolitico. Nel complesso le linee resistenti sono identificate da uno stato metabolico ibrido caratterizzato da un metabolismo glicolitico e lipidico.

Si potrebbe ipotizzare che, poiché il CDDP ha come principale bersaglio le cellule caratterizzate da un elevato tasso di proliferazione, lo scopo del riadattamento metabolico sia quello di ripristinare lo stato di crescita e di sopravvivenza. A tal proposito il metabolismo glicolitico potrebbe comportare la generazione di molteplici intermedi che potrebbero attivare la via PPP, la sintesi di purine/pirimidine, l'ossidazione dei lipidi, per supportare l'omeostasi redox e la sintesi di nucleotidi e nel frattempo, potrebbe ridurre la produzione di H₂O₂ aumentano il potenziale redox, mediante la produzione del NADPH che è, inoltre, richiesto per la generazione di GSH. Dal canto suo il metabolismo di lipidi riduce la produzione di ROS che sono dannosi per le CSC; ed è essenziale per il mantenimento della pluripotenza controllando la divisione asimmetrica.

4.12. Le linee resistenti, aventi caratteristiche stem-like, mostrano un incremento della massa mitocondriale

I mitocondri hanno la capacità di regolare le caratteristiche di staminalità, indipendentemente del fenotipo metabolico che caratterizza la cellula tumorale^{255,256}. Infatti, oltre a provvedere alla maggiore fonte di ATP nelle cellule, i mitocondri sono coinvolti nel controllo di molteplici pathway di signalling, quali il rilascio del Citocromo C per indurre apoptosi, il rilascio dei ROS e la produzione di metaboliti.

L'aumento della massa mitocondriale, un marcatore surrogato per un'elevata biogenesi mitocondriale, può identificare cellule con capacità di auto-rinnovamento e chemioresistenza indipendentemente dal tipo di cancro^{255,256}. Nello specifico, nell'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC), l'uso di questo biomarcatore metabolico ha permesso di identificare una
sottopopolazione di cellule CD133⁺/Mito^{high} caratterizzata da una maggiore capacità di autorinnovamento e una sottopopolazione CD133⁺/Mito^{low} con ridotte caratteristiche *stem-like*²⁵⁶. Dal punto di vista della chemioresistenza, Giddings e collaboratori dimostrarono che l'attività dei trasportatori ABC richiede necessariamente l'ATP mitocondriale, infatti, quello derivante dalla glicolisi potrebbe non essere sufficiente per sostenere l'attività dei trasportatori ABC. Dunque i mitocondri, in quanto organelli dinamici, potrebbero localizzare in prossimità della membrana citoplasmatica generando dei microdomini ATP aventi la funzione di sostenere l'attività dei trasportatori¹⁰⁸.

Alla luce di queste considerazioni al fine di verificare se la biogenesi mitocondriale possa essere associata all'acquisizione del fenotipo staminale e della resistenza al platino, è stata valutata la massa mitocondriale, nelle linee resistenti rispetto alla controparte sensibile mediate citofluorimetria. In associazione al marcatore di staminalità CD133 (coniugato al fluorocromo PE) è stata quindi utilizzata la sonda specifica per la massa mitocondriale Mitotracker Deep Red (coniugata al fluorocromo APC). Questa, essendo permeabile, attraversa passivamente la membrana plasmatica e si accumula nei mitocondri attivi. Questa analisi ha permesso, mediante la valutazione della MFI emessa dai mitocondri che hanno accumulato la sonda Mitotracker Deep Red, di quantificare la massa mitocondriale (Fig 4.38A). L'analisi è stata condotta in citofluorimetria su cellule in coltura in 2D.



Figura 4.38 Le linee resistenti al CDDP sono caratterizzate da un aumento della biogenesi mitocondriale. A. Analisi della massa mitocondriale mediante la sonda Mitotracker Deep Red (APC) in citofluorimetria in associazione al marcatore di staminalità CD133 (PE). La linea tratteggiata rappresenta la popolazione sensibile di ciascuna delle sottopopolazioni analizzate. Per ogni condizione sono stati analizzati 50.000 eventi. D. Analisi di qRT-PCR dell'espressione di PPARG1A. Per la normalizzazione sono stati utilizzati i dati relativi al gene housekeeping HPRT. Il fold change è stato calcolato usando il metodo $\Delta\Delta$ CT e utilizzando i valori delle linee sensibili come controllo. I dati sono rappresentati come media ± SD, n = 4. (*p<0.05, ** p<0.01)

La linea cellulare OC314R mostra un aumento della MFI relativa al fluorocromo APC, e dunque della massa mitocondriale, rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.38A). Questo aumento, rispetto alla linea sensibile, è significativamente visibile nelle tre popolazioni osservate: nella CD133⁺, nella CD133⁻ e infine nella popolazione totale. In particolare la popolazione CD133⁺ aumenta la massa mitocondriale di 1,99 volte, la CD133⁻ e la popolazione totale di 1,4 volte rispetto alle rispettive popolazioni della controparte sensibile (Fig 4.38A). É da notare che l'incremento della massa

mitocondriale è una caratteristica non solo della linea cellulare resistente al platino ma anche, all'interno della popolazione resistente, delle CSC (OC314R CD133⁺ 1,99 MFI rispetto OC314R CD133⁻ 1,4 MFI p=0,02) (Fig 4.38A). Nella linea cellulare OV90R si osserva un simile andamento. Nella popolazione CD133⁺ si manifesta un incremento di 1,3 volte e nella popolazione totale di 1,5 volte rispetto alle popolazioni sensibili OV90. All'interno della popolazione resistente si osserva una tendenza all'aumento della massa mitocondriale nella popolazione CSC rispetto alla non-CSC (p=0,06) (Fig 4.38A). L'insieme di questi dati suggerisce come la massa mitocondriale possa essere considerata una caratteristica peculiare non solo della popolazione CSC ma delle linee resistenti alla chemioterapia.

Al fine di confermare questo dato è stata valutata in qRT-PCR l'espressione genica del principale regolatore della biogenesi mitocondriale: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (*PGC1α*) (Fig 4.38B).

Le linee cellulari OC314R e OV90R mostrano un significativo aumento dei livelli di espressione di *PGC1a* rispetto alle controparti sensibili (Fig 4.38B). Le cellule resistenti OV90R mostrano un significativo incremento dell'espressione del gene target della biogenesi mitocondriale di 1,2 volte rispetto alla controparte sensibile. Inoltre, è da notare che nelle cellule OC314 non è stato rilevato il CT relativo all'espressione di *PGC1a*, pertanto non è stato possibile calcolare il $\Delta\Delta$ CT come differenza di espressione tra OC314 e OC314R.

L'insieme di questi dati suggerisce che, per il diverso ruolo svolto dai mitocondri, l'aumento della biogenesi mitocondriale potrebbe essere considerata una caratteristica peculiare della popolazione CSC. Inoltre, questa caratteristica sembrerebbe essere rafforzata dall'acquisizione della chemioresistenza. Infatti, in base ai dati ottenuti, la chemioresistenza e l'acquisizione di caratteristiche *stem-like* potrebbero svolgere un ruolo sinergico in relazione alla biogenesi mitocondriale. Nelle CSC la biogenesi mitocondriale è necessaria per il *self renewal* e il mantenimento del fenotipo staminale. Infatti, è stato visto che in seguito a divisione asimmetrica, le CSC sono arricchite di mitocondri di nuova sintesi; al contrario, i mitocondri "vecchi" segregano nella cellula differenziata²⁵⁷. Sancho e collaboratori hanno dimostrato che elevati livelli di espressione di *PGC1a*, oltre a promuovere l'incremento della biogenesi mitocondriale, inducono un aumento delle proprietà antiossidanti con una conseguente riduzione dei livelli di ROS mitocondriali, suggerendo che *PGC1a* mantenga la capacità di autorinnovamento delle CSC, probabilmente controllando i livelli di ROS intracellulari. Queste caratteristiche sono state definite come i prerequisiti per le funzioni staminali²⁵⁶.

Gli effetti del CDDP sulla biogenesi mitocondriale possono essere molteplici, quali l'inibizione dei segnali apoptotici²⁵⁸ e l'adattamento metabolico²⁵⁹. Inoltre, Giddings e collaboratori dimostrarono che l'attività dei trasportatori ABC sia mantenuta sostanzialmente dalla produzione di ATP mitocondriale mediante fosforilazione ossidativa¹⁰⁸. Nei nostri modelli resistenti OC314R e OV90R, gli alti livelli di espressione dell'enzima *PDK4* potrebbero determinare una limitata conversione del piruvato in acetil-CoA, con un conseguente basso profilo OXPHOS (Fig 4.37B, 4.10A), pertanto, l'aumento della massa mitocondriale osservata nella popolazione resistente OC314R e OV90R rispetto alla controparte sensibile (Fig 4.38), potrebbe essere il risultato di un effetto compensatorio avente la finalità di sostenere l'attività dei trasportatori ABC, con una conseguente riduzione della concentrazione del farmaco intracellulare e dunque favorire la chemioresistenza.

La resistenza al chemioterapico e l'acquisizione di caratteristiche *stem-like* potrebbero svolgere un'azione sinergica favorendo la biogenesi mitocondriale, sia per mantenimento del *self- renewal* come risposta ad uno stress citotossico e sia come adattamento metabolico. Infatti, un aumento della biogenesi potrebbe rappresentare un ulteriore suggerimento di un metabolismo implicato nella degradazione dei lipidi. L'aumento della massa mitocondriale potrebbe fornire i siti necessari affinchè venga avviata laβ-ossidazione.

In conclusione, l'aumento della massa mitocondriale, marcatore di un'elevata biogenesi, potrebbe identificare cellule con un'elevata capacità di *self renewal* e chemioresistenza.

5. Conclusioni

La chemioterapia e l'intervento chirurgico di rimozione del tumore sono, attualmente, i principali approcci terapeutici utilizzati nelle pazienti affette da OC. Il chemioterapico maggiormente utilizzato è il CDDP o alcuni dei suoi analoghi. Dopo un'iniziale risposta positiva, il 75% delle pazienti sviluppa la resistenza ai chemioterapici, con conseguente formazione di recidive. La resistenza, dunque, è uno dei maggiori ostacoli al successo della terapia. In questo progetto è stato valutato se l'acquisizione della resistenza al platino possa indurre un'alterazione del profilo metabolico e come questa riprogrammazione metabolica influisca sul fenotipo cellulare. È stato osservato che il trattamento cronico con CDDP induce un aumento dell'espressione dei trasportatori ABC, che agiscono riducendo la concentrazione intracellulare di CDDP ed un rallentamento della proliferazione cellulare, con conseguente blocco in fase G1, come meccanismo di sopravvivenza delle cellule che acquisiscono la resistenza. Inoltre, il chemioterapico ha selezionato le cellule resistenti, con caratteristiche stem-like che, in funzione del rallentamento del tasso di proliferazione, mostrano un incremento della capacità di internalizzare il glucosio ed una riprogrammazione metabolica verso il metabolismo glicolitico e lipidico. Infatti, la popolazione resistente, con caratteristiche stem-like, presenta alti livelli di espressione dell'enzima PDK4, che rallenta la conversione del piruvato in acetil-CoA ed alti livelli di espressione di CD133, che insieme contribuiscono ad un rallentamento del profilo OXPHOS. Inoltre, l'aumento dell'espressione di $PGC1\alpha$ e della massa mitocondriale, come effetto compensatorio, forniscono una maggiore disponibilità di siti per il catabolismo degli acidi grassi al fine di sostenere la sintesi di ATP. Infatti, le cellule resistenti, come dimostrato dagli elevati livelli di espressione di CD36, sono altresì più prone ad internalizzare i lipidi, i quali vengo mobilitati verso la degradazione a livello mitocondriale e inglobati nei LD mediante l'attivazione della via del PPAR α e del PPAR γ . In particolare, le linee cellulari resistenti, con caratteristiche stem-like, presentano un elevato contenuto di LD. Nel microambiente dell'omento, la selezione di un metabolismo lipidico potrebbe conferire notevoli vantaggi alla cellula resistente; potrebbe infatti favorire un incremento delle difese antiossidanti, fornire la produzione di ATP necessaria per il funzionamento dei trasportatori ABC e contribuire alla formazione dei *rafts lipidici*, i quali garantiscono il corretto assemblaggio e funzionamento dei trasportatori ABC. Risulta dunque evidente come il trattamento cronico con il chemioterapico selezioni le cellule resistenti aventi caratteristiche *stem-like* e un metabolismo lipidico. Le cellule resistenti aventi queste peculiarità presentano un vantaggio selettivo in un microambiente ricco di lipidi, quale l'omento, e inoltre grazie al maggiore potenziale tumorigenico delle CSC, potrebbero



Figura 5.1 Rappresentazione schematica dei processi metabolici e fenotipi associati all'acquisizione alla resistenza al platino.

6. Referenze

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).

2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).

3. Warburg, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research* **9**, 148–163 (1925).

4. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270 (1956).

5. Tan, A. S. *et al.* Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. *Cell Metabolism* **21**, 81–94 (2015).

6. Owen, O. E., Kalhan, S. C. & Hanson, R. W. The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *J. Biol. Chem.* **277**, 30409–30412 (2002).

7. Smolková, K. *et al.* Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**, 950–968 (2011).

8. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA A Cancer J Clin* **70**, 7–30 (2020).

9. Cannistra, S. A. Cancer of the Ovary. *N Engl J Med* **351**, 2519–2529 (2004).

10. Whittemore, A. Characteristics Relating to Ovarian Cancer Risk: Implications for Prevention and Detection. *Gynecologic Oncology* **55**, S15–S19 (1994).

11. Risch, H. A. Hormonal Etiology of Epithelial Ovarian Cancer, With a Hypothesis Concerning the Role of Androgens and Progesterone. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **90**, 1774–1786 (1998).

12. Vidal, J. D. & Dixon, D. Ovary. in *Boorman's Pathology of the Rat* 523–536 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-391448-4.00026-5.

13. Feeley, K. M. & Wells, M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* **38**, 87–95 (2001).

14. Bast, R. C., Hennessy, B. & Mills, G. B. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* **9**, 415–428 (2009).

15. Brett M., R. *et al.* Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine* **14**, 9–32 (2017).

16. Green, G. E., Mortele, K. J., Glickman, J. N. & Benson, C. B. Brenner Tumors of the Ovary: Sonographic and Computed Tomographic Imaging Features. *Journal of Ultrasound in Medicine* **25**, 1245–1251 (2006).

17. Matz, M. *et al.* The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2). *Gynecologic Oncology* **144**, 405–413 (2017).

18. Lo Riso, P. *et al.* A cell-of-origin epigenetic tracer reveals clinically distinct subtypes of high-grade serous ovarian cancer. *Genome Med* **12**, 94 (2020).

19. Lengyel, E. Ovarian Cancer Development and Metastasis. *The American Journal of Pathology* **177**, 1053–1064 (2010).

20. Naora, H. & Montell, D. J. Ovarian Cancer Metastasis: Integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* **5**, 355–366 (2005).

21. Matulonis, U. A. et al. Ovarian cancer. Nat Rev Dis Primers 2, 16061 (2016).

22. Nieman, K. M. *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* **17**, 1498–1503 (2011).

23. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism* **23**, 27–47 (2016).

24. Carracedo, A., Cantley, L. C. & Pandolfi, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* **13**, 227–232 (2013).

25. Fritz, I. B. & McEWEN, B. Effects of carnitine on fatty-acid oxidation by muscle. *Science* **129**, 334–335 (1959).

26. Wahl, D. R. *et al.* Glioblastoma Therapy Can Be Augmented by Targeting IDH1-Mediated NADPH Biosynthesis. *Cancer Res* **77**, 960–970 (2017).

27. Pascual, G. *et al.* Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* **541**, 41–45 (2017).

28. Mitsuishi, Y. *et al.* Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. *Cancer Cell* **22**, 66–79 (2012).

29. Deep, G. & Schlaepfer, I. Aberrant Lipid Metabolism Promotes Prostate Cancer: Role in Cell Survival under Hypoxia and Extracellular Vesicles Biogenesis. *IJMS* **17**, 1061 (2016).

30. Mukherjee, A. *et al.* Adipocyte-Induced FABP4 Expression in Ovarian Cancer Cells Promotes Metastasis and Mediates Carboplatin Resistance. *Cancer Res* **80**, 1748–1761 (2020).

31. Gharpure, K. M. *et al.* FABP4 as a key determinant of metastatic potential of ovarian cancer. *Nat Commun* **9**, 2923 (2018).

32. Kim, H. *et al.* Unsaturated Fatty Acids Stimulate Tumor Growth through Stabilization of β-Catenin. *Cell Reports* **13**, 495–503 (2015).

33. Ladanyi, A. *et al.* Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene* **37**, 2285–2301 (2018).

34. Olzmann, J. A. & Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 137–155 (2019).

35. de Gonzalo-Calvo, D. *et al.* Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer* **15**, 460 (2015).

36. Guillaumond, F. *et al.* Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 2473–2478 (2015).

37. Tirinato, L. *et al.* Lipid Droplets: A New Player in Colorectal Cancer Stem Cells Unveiled by Spectroscopic Imaging: Lipid Droplets: A New Player in Colorectal Cancer Stem Cells. *Stem Cells* **33**, 35–44 (2015).

38. Zhang, Q. *et al.* Metabolic reprogramming of ovarian cancer involves ACSL1-mediated metastasis stimulation through upregulated protein myristoylation. *Oncogene* **40**, 97–111 (2021).

39. Kim, S., Kim, B. & Song, Y. S. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci* **107**, 1173–1178 (2016).

40. Ghoneum, A., Afify, H., Salih, Z., Kelly, M. & Said, N. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. *Oncotarget* **9**, 22832–22849 (2018).

41. Yamada, T. *et al.* Lysophosphatidic Acid (LPA) in Malignant Ascites Stimulates Motility of Human Pancreatic Cancer Cells through LPA1. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 6595–6605 (2004).

42. Pua, T. L., Wang, F. & Fishman, D. A. Roles of LPA in ovarian cancer development and progression. *Future Oncology* **5**, 1659–1673 (2009).

43. Chen, R. R. *et al.* Targeting of lipid metabolism with a metabolic inhibitor cocktail eradicates peritoneal metastases in ovarian cancer cells. *Commun Biol* **2**, 281 (2019).

44. Piché, A. Malignant peritoneal effusion acting as a tumor environment in ovarian cancer progression: Impact and significance. *WJCO* **9**, 167–171 (2018).

45. Hui, L. & Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters* **368**, 7–13 (2015).

46. Latifi, A. *et al.* Isolation and Characterization of Tumor Cells from the Ascites of Ovarian Cancer Patients: Molecular Phenotype of Chemoresistant Ovarian Tumors. *PLoS ONE* **7**, e46858 (2012).

47. Huang, H. *et al.* Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *neo* **60**, 546–552 (2013).

48. Lai, I. *et al.* Correlation of differential ascites volume with primary cytoreductive surgery outcome, lymph node involvement, and disease recurrence in advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **29**, 922–928 (2019).

49. Benton, G., DeGray, G., Kleinman, H. K., George, J. & Arnaoutova, I. In Vitro Microtumors Provide a Physiologically Predictive Tool for Breast Cancer Therapeutic Screening. *PLoS ONE* **10**, e0123312 (2015).

50. Hirschmann-Jax, C. *et al.* A distinct 'side population' of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 14228–14233 (2004).

51. Basta, A. *et al.* Recommendations of the Polish Gynecological Oncology Society for the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *Curr. Gynecol. Oncol.* **15**, 5–23 (2017).

52. Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie *et al.* Polish clinical practice guideline on hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) with cytoreductive surgery in peritoneal malignancy treatment. *Curr Gynecol Oncol* **12**, 86–97 (2014).

53. Jain, R. K. Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia. *Cancer Cell* **26**, 605–622 (2014).

54. Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A. & Lisowska, K. M. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **81**, 17–38 (2018).

55. Lord, C. J. & Ashworth, A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **481**, 287–294 (2012).

56. Jones, P., Wilcoxen, K., Rowley, M. & Toniatti, C. Niraparib: A Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor for the Treatment of Tumors with Defective Homologous Recombination. *J. Med. Chem.* **58**, 3302– 3314 (2015). 57. Lord, C. J. & Ashworth, A. Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. *Nat Med* **19**, 1381–1388 (2013).

58. Oza, A. M. *et al.* Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology* **16**, 87–97 (2015).

59. Agarwal, R. & Kaye, S. B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 502–516 (2003).

60. Eastman, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & Therapeutics* **34**, 155–166 (1987).

61. Buß, I. & Jaehde, U. Platinum Complexes. in *Encyclopedia of Cancer* (ed. Schwab, M.) 2358–2363 (Springer Berlin Heidelberg, 2009). doi:10.1007/978-3-540-47648-1_4616.

62. Browning, R. J. *et al.* Drug Delivery Strategies for Platinum-Based Chemotherapy. *ACS Nano* **11**, 8560–8578 (2017).

63. Hu, J., Lieb, J. D., Sancar, A. & Adar, S. Cisplatin DNA damage and repair maps of the human genome at single-nucleotide resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 11507–11512 (2016).

64. Auersperg, N., Edelson, M. I., Mok, S. C., Johnson, S. W. & Hamilton, T. C. The biology of ovarian cancer. *Semin Oncol* **25**, 281–304 (1998).

65. Desoize, B. & Madoulet, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **42**, 317–325 (2002).

66. Wakai. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* **23**, (2010).

67. Sakamoto, M. *et al.* Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Hum Cell* **14**, 305–315 (2001).

68. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869–1883 (2012).

69. Stallons, L. J. & McGregor, W. G. Translesion Synthesis Polymerases in the Prevention and Promotion of Carcinogenesis. *Journal of Nucleic Acids* **2010**, 1–10 (2010).

70. Chen, Y.-C. *et al.* High-Throughput Single-Cell Derived Sphere Formation for Cancer Stem-Like Cell Identification and Analysis. *Sci Rep* **6**, 27301 (2016).

71. Dragu, D. L., Necula, L. G., Bleotu, C., Diaconu, C. C. & Chivu-Economescu, M. Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World J Stem Cells* **7**, 1185–1201 (2015).

72. Gilbert, C. A. & Ross, A. H. Cancer stem cells: Cell culture, markers, and targets for new therapies. *J. Cell. Biochem.* **108**, 1031–1038 (2009).

73. Chen, L.-S. *et al.* A new prospect in cancer therapy: targeting cancer stem cells to eradicate cancer. *Chin J Cancer* **31**, 564–572 (2012).

74. Tang, C., Ang, B. T. & Pervaiz, S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB j.* **21**, 3777–3785 (2007).

75. Morrison, S. J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068–1074 (2006).

76. Clevers, H. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat Genet* **37**, 1027–1028 (2005).

77. Frank, N. Y., Schatton, T. & Frank, M. H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* **120**, 41–50 (2010).

78. Yadav, A. K. & Desai, N. S. Cancer Stem Cells: Acquisition, Characteristics, Therapeutic Implications, Targeting Strategies and Future Prospects. *Stem Cell Rev and Rep* **15**, 331–355 (2019).

79. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).

80. Yan, X. *et al.* iPS Cells Reprogrammed From Human Mesenchymal-Like Stem/Progenitor Cells of Dental Tissue Origin. *Stem Cells and Development* **19**, 469–480 (2010).

81. Brambrink, T. *et al.* Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell* **2**, 151–159 (2008).

82. Polo, J. M. *et al.* A Molecular Roadmap of Reprogramming Somatic Cells into iPS Cells. *Cell* **151**, 1617–1632 (2012).

83. Yang, Y. *et al.* Emerging agents that target signaling pathways in cancer stem cells. *J Hematol Oncol* **13**, 60 (2020).

84. MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* **17**, 9–26 (2009).

85. Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H. & Young, R. A. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes & Development* **22**, 746–755 (2008).

86. Nagaraj, A. B. *et al.* Critical role of Wnt/ β -catenin signaling in driving epithelial ovarian cancer platinum resistance. *Oncotarget* **6**, 23720–23734 (2015).

87. Venkatesh, V. *et al.* Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investig.* **5**, 5–5 (2018).

88. Choi, J.-H. *et al.* Jagged-1 and Notch3 Juxtacrine Loop Regulates Ovarian Tumor Growth and Adhesion. *Cancer Res* **68**, 5716–5723 (2008).

89. Shih, I.-M. & Wang, T.-L. Notch Signaling, γ-Secretase Inhibitors, and Cancer Therapy: Figure 1. *Cancer Res* **67**, 1879–1882 (2007).

90. Karamboulas, C. & Ailles, L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**, 2481–2495 (2013).

91. Takebe, N. *et al.* Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol* **12**, 445–464 (2015).

92. Zhang, S. *et al.* Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Research* **68**, 4311–4320 (2008).

93. Li, S.-S., Ma, J. & Wong, A. S. T. Chemoresistance in ovarian cancer: exploiting cancer stem cell metabolism. *J Gynecol Oncol* **29**, e32 (2018).

94. Yeung, T.-L. *et al.* Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **309**, C444–C456 (2015).

95. Rizzo, S. *et al.* Ovarian Cancer Stem Cell-Like Side Populations Are Enriched Following Chemotherapy and Overexpress EZH2. *Molecular Cancer Therapeutics* **10**, 325–335 (2011).

96. Glumac, P. M. & LeBeau, A. M. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clinical and Translational Medicine* **7**, (2018).

97. Stemberger-Papić, S. *et al.* Expression of CD133 and CD117 in 64 Serous Ovarian Cancer Cases. *Coll Antropol* **39**, 745–753 (2015).

98. Curley, M. D. *et al.* CD133 Expression Defines a Tumor Initiating Cell Population in Primary Human Ovarian Cancer. *Stem Cells* N/A-N/A (2009) doi:10.1002/stem.236.

99. Zhang, J. *et al.* CD133 expression associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Mod Pathol* **25**, 456–464 (2012).

100. Roy, L. *et al.* CD133 Promotes Adhesion to the Ovarian Cancer Metastatic Niche. *Cancer* Growth Metastasis **11**, 117906441876788 (2018).

101. Figueras, A. *et al.* A Role for CXCR4 in Peritoneal and Hematogenous Ovarian Cancer Dissemination. *Mol Cancer Ther* **17**, 532–543 (2018).

102. Doyle, L. A. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 15665–15670 (1998).

103. Polgar, O., Robey, R. W. & Bates, S. E. ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **4**, 1–15 (2008).

104. Eckenstaler, R. & Benndorf, R. A. 3D structure of the transporter ABCG2—What's new? *Br J Pharmacol* **177**, 1485–1496 (2020).

105. Manolaridis, I. *et al.* Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature* **563**, 426–430 (2018).

106. McDevitt, C. A. *et al.* Is ATP binding responsible for initiating drug translocation by the multidrug transporter ABCG2?: The power stroke in ABCG2. *FEBS Journal* **275**, 4354–4362 (2008).

107. Patzlaff, J. S., van der Heide, T. & Poolman, B. The ATP/Substrate Stoichiometry of the ATP-binding Cassette (ABC) Transporter OpuA. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29546–29551 (2003).

108. Giddings, E. L. *et al.* Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nat Commun* **12**, 2804 (2021).

109. Storch, C. H., Ehehalt, R., Haefeli, W. E. & Weiss, J. Localization of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Lipid Rafts/Caveolae and Modulation of Its Activity by Cholesterol in Vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **323**, 257–264 (2007).

110. Telbisz, Á., Özvegy-Laczka, C., Hegedűs, T., Váradi, A. & Sarkadi, B. Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein. *Biochemical Journal* **450**, 387–395 (2013).

111. Li, H. & Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Function in Cholesterol Transport. Identification of a Putative Cholesterol Recognition/Interaction Amino Acid Sequence and Consensus Pattern ¹. *Endocrinology* **139**, 4991–4997 (1998).

112. Ferreira, J. A. *et al.* Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug Resistance Updates* **24**, 34–54 (2016).

113. Zhou, S. *et al.* The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* **7**, 1028–1034 (2001).

114. Muñoz-Galván, S. *et al.* New markers for human ovarian cancer that link platinum resistance to the cancer stem cell phenotype and define new therapeutic combinations and diagnostic tools. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 234 (2019).

115. Raspollini, M. R. *et al.* c-KIT expression and correlation with chemotherapy resistance in ovarian carcinoma: an immunocytochemical study. *Annals of Oncology* **15**, 594–597 (2004).

116. Menendez, J. A. Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) - *Molecular and Cell Biology of Lipids* **1801**, 381–391 (2010).

117. 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* **11**, 1–19 (2014).

118. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**, 85–95 (2011).

119. Dar, S. *et al.* Bioenergetic Adaptations in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. *Sci Rep* **7**, 8760 (2017).

120. Obre, E. & Rossignol, R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: Metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **59**, 167–181 (2015).

121. Gentric, G., Mieulet, V. & Mechta-Grigoriou, F. Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. *Antioxidants & Redox Signaling* **26**, 462–485 (2017).

122. Gentric, G. *et al.* PML-Regulated Mitochondrial Metabolism Enhances Chemosensitivity in Human Ovarian Cancers. *Cell Metabolism* **29**, 156-173.e10 (2019).

123. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).

124. Mai, T. T. *et al.* Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nature Chem* **9**, 1025–1033 (2017).

125. Loar, P. *et al.* Inhibition of glycolysis enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **202**, 371.e1-371.e8 (2010).

126. Locasale, J. W. *et al.* Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet* **43**, 869–874 (2011).

127. Qian, X. *et al.* Enolase 1 stimulates glycolysis to promote chemoresistance in gastric cancer. *Oncotarget* **8**, 47691–47708 (2017).

128. Xu, W. *et al.* TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer. *Cell Death Dis* **5**, e1055–e1055 (2014).

129. Zhang, X.-Y. *et al.* Hexokinase 2 confers resistance to cisplatin in ovarian cancer cells by enhancing cisplatin-induced autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **95**, 9–16 (2018).

130. Kamarajugadda, S. *et al.* Glucose Oxidation Modulates Anoikis and Tumor Metastasis. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 1893–1907 (2012).

131. Lu, J., Tan, M. & Cai, Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters* **356**, 156–164 (2015).

132. Stowe, D. F. & Camara, A. K. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**, 1373–1414 (2009).

133. Ghanbari Movahed, Z., Rastegari-Pouyani, M., Mohammadi, M. hossein & Mansouri, K. Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? *Biomedicine & Pharmacotherapy* **112**, 108690 (2019).

134. Friesen, C., Kiess, Y. & Debatin, K.-M. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death Differ* **11**, S73–S85 (2004).

135. Patra, K. C. & Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences* **39**, 347–354 (2014).

136. Silva, M. M., Rocha, C. R. R., Kinker, G. S., Pelegrini, A. L. & Menck, C. F. M. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep* **9**, 17639 (2019).

137. Catanzaro, D. *et al.* Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase sensitizes cisplatin-resistant cells to death. *Oncotarget* **6**, 30102–30114 (2015).

138. Ryan, M. T. & Hoogenraad, N. J. Mitochondrial-Nuclear Communications. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 701–722 (2007).

139. Rossignol, R., Malgat, M., Mazat, J.-P. & Letellier, T. Threshold Effect and Tissue Specificity: IMPLICATION FOR MITOCHONDRIAL CYTOPATHIES. *J. Biol. Chem.* **274**, 33426–33432 (1999).

140. Carelli, V. *et al.* Biochemical-Clinical Correlation in Patients With Different Loads of the Mitochondrial DNA T8993G Mutation. *Arch Neurol* **59**, 264 (2002).

141. Wong, L.-J. C. & Boles, R. G. Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta* **354**, 1–20 (2005).

142. Fernández-Silva, P., Enriquez, J. A. & Montoya, J. Replication and Transcription of Mammalian Mitochondrial Dna. *Experimental Physiology* **88**, 41–56 (2003).

143. Iommarini, L. *et al.* Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. *Human Molecular Genetics* **23**, 1453–1466 (2014).

144. Gasparre, G. *et al.* Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 9001–9006 (2007).

145. Gasparre, G. *et al.* A Mutation Threshold Distinguishes the Antitumorigenic Effects of the Mitochondrial Gene MTND1, an Oncojanus Function. *Cancer Research* **71**, 6220–6229 (2011).

146. Guerra, F. *et al.* Mitochondrial DNA Mutation in Serous Ovarian Cancer: Implications for Mitochondria-Coded Genes in Chemoresistance. *JCO* **30**, e373–e378 (2012).

147. Girolimetti, G. *et al.* Platinum-induced mitochondrial DNA mutations confer lower sensitivity to paclitaxel by impairing tubulin cytoskeletal organization. *Human Molecular Genetics* **26**, 2961–2974 (2017).

148. Ni, J. *et al.* Pathogenic Heteroplasmic Somatic Mitochondrial DNA Mutation Confers Platinum-Resistance and Recurrence of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *CMAR* Volume 12, 11085–11093 (2020). 149. Alama, A. *et al.* Establishment and Characterization of Three New Cell Lines Derived from the Ascites of Human Ovarian Carcinomas. *Gynecologic Oncology* **62**, 82–88 (1996).

150. Provencher, D. M. *et al.* Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **36**, 357–361 (2000).

151. Calabrese, C. *et al.* MToolBox: a highly automated pipeline for heteroplasmy annotation and prioritization analysis of human mitochondrial variants in high-throughput sequencing. *Bioinformatics* **30**, 3115–3117 (2014).

152. Rubino, F. *et al.* HmtDB, a genomic resource for mitochondrion-based human variability studies. *Nucleic Acids Research* **40**, D1150–D1159 (2012).

153. Pesole, G. & Saccone, C. A novel method for estimating substitution rate variation among sites in a large dataset of homologous DNA sequences. *Genetics* **157**, 859–865 (2001).

154. Li, B. *et al.* Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* **25**, 2744–2750 (2009).

155. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248–249 (2010).

156. Capriotti, E. *et al.* WS-SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. *BMC Genomics* **14**, S6 (2013).

157. Thomas, P. D. & Kejariwal, A. Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: Evolutionary evidence for differences in molecular effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15398–15403 (2004).

158. Lott, M. T. *et al.* mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current Protocols in Bioinformatics* **44**, (2013).

159. Putz, J., Dupuis, B., Sissler, M. & Florentz, C. Mamit-tRNA, a database of mammalian mitochondrial tRNA primary and secondary structures. *RNA* **13**, 1184–1190 (2007).

160. Preste, R., Vitale, O., Clima, R., Gasparre, G. & Attimonelli, M. HmtVar: a new resource for human mitochondrial variations and pathogenicity data. *Nucleic Acids Research* **47**, D1202–D1210 (2019).

161. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611–622 (2009).

162. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).

163. Lupia, M. & Cavallaro, U. Ovarian cancer stem cells: still an elusive entity? *Mol Cancer* 16, 64 (2017).

164. Sun, Y.-L., Patel, A., Kumar, P. & Chen, Z.-S. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chin J Cancer* **31**, 51–57 (2012).

165. Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 219–234 (2006).

166. Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* **5**, 275–284 (2005).

167. Kasherman, Y., Sturup, S. & Gibson, D. Is Glutathione the Major Cellular Target of Cisplatin? A Study of the Interactions of Cisplatin with Cancer Cell Extracts. *J. Med. Chem.* **52**, 4319–4328 (2009).

168. Ishikawa, T. & Ali-Osman, F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* **268**, 20116–20125 (1993).

169. Jagust, P., Alcalá, S., Jr, B. S., Heeschen, C. & Sancho, P. Glutathione metabolism is essential for self-renewal and chemoresistance of pancreatic cancer stem cells. *WJSC* **12**, 1410–1428 (2020).

170. Maliepaard, M. *et al.* Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* **59**, 4559–4563 (1999).

171. Vesel, M. *et al.* ABCB1 and ABCG2 drug transporters are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling. *Respir Res* **18**, 52 (2017).

172. Komiya, Y. & Habas, R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68–75 (2008).

173. Yun, U.-J. *et al.* Lipid raft modulation by Rp1 reverses multidrug resistance via inactivating MDR-1 and Src inhibition. *Biochemical Pharmacology* **85**, 1441–1453 (2013).

174. Li, J., Zhang, Z., Wang, L. & Zhang, Y. The oncogenic role of Wnt10a in colorectal cancer through activation of canonical Wnt/β-catenin signaling. *Oncol Lett* (2019) doi:10.3892/ol.2019.10035.

175. Jho, E. *et al.* Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol Cell Biol* **22**, 1172–1183 (2002).

176. Piotrowska, Ż., Niezgoda, M., Młynarczyk, G., Acewicz, M. & Kasacka, I. Comparative Assessment of the WNT/β-Catenin Pathway, CacyBP/SIP, and the Immunoproteasome Subunit LMP7 in Various Histological Types of Renal Cell Carcinoma. *Front. Oncol.* **10**, 566637 (2020).

177. Lin, X. *et al.* HBV Infection Promotes the Occurrence and Development of Hepatocellular Carcinoma through Impairing the Inhibitory Effect of PPP2R5A on MAPK/AKT/WNT Signaling Pathway. *ENG* **13**, 197–214 (2021).

178. Shi, W. *et al.* RhoA/Rock activation represents a new mechanism for inactivating Wnt/ β -catenin signaling in the aging-associated bone loss. *Cell Regen* **10**, 8 (2021).

179. Jia, L. *et al.* SMAD4 Suppresses AURKA-Induced Metastatic Phenotypes via Degradation of AURKA in a TGFβ-Independent Manner. *Mol Cancer Res* **12**, 1779–1795 (2014).

180. Katoh, M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep* **14**, 1583–1588 (2005).

181. Katoh, M., Kirikoshi, H., Terasaki, H. & Shiokawa, K. WNT2B2 mRNA, Up-Regulated in Primary Gastric Cancer, Is a Positive Regulator of the WNT– β -Catenin–TCF Signaling Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289**, 1093–1098 (2001).

182. Nie, X., Liu, H., Liu, L., Wang, Y.-D. & Chen, W.-D. Emerging Roles of Wnt Ligands in Human Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **10**, 1341 (2020).

183. Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M. R. & Ross, D. D. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology* **83**, 1084–1103 (2012).

184. Ruan, X. *et al.* Silencing LGR6 Attenuates Stemness and Chemoresistance via Inhibiting Wnt/ β -Catenin Signaling in Ovarian Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics* **14**, 94–106 (2019).

185. Qin, L. *et al.* WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget* **6**, 10239–10252 (2015).

186. Cocetta, V., Ragazzi, E. & Montopoli, M. Links between cancer metabolism and cisplatin resistance. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 354 107–164 (Elsevier, 2020).

187. Xu, Y. *et al.* ABT737 reverses cisplatin resistance by targeting glucose metabolism of human ovarian cancer cells. *Int J Oncol* (2018) doi:10.3892/ijo.2018.4476.

188. Jingwen, B., Yaochen, L. & Guojun, Z. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer Biology & Medicine* **14**, 348 (2017).

189. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265–7279 (2003).

190. Antico Arciuch, V. G., Elguero, M. E., Poderoso, J. J. & Carreras, M. C. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation. *Antioxidants & Redox Signaling* **16**, 1150–1180 (2012).

191. Cantó, C. & Auwerx, J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3407–3423 (2010).

192. Owusu-Ansah, E., Yavari, A., Mandal, S. & Banerjee, U. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat Genet* **40**, 356–361 (2008).

193. Birsoy, K. *et al.* Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature* **508**, 108–112 (2014).

194. Keightley, J. A. *et al.* Mitochondrial Encephalomyopathy and Complex III Deficiency Associated with a Stop-Codon Mutation in the Cytochrome b Gene. *The American Journal of Human Genetics* **67**, 1400–1410 (2000).

195. Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L. & Brand, M. D. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology* **1**, 304–312 (2013).

196. O'Donnell, L. *et al.* Chronic Progressive External Ophthalmoplegia due to a Rare de novo m.12334G>A MT-TL2 Mitochondrial DNA Variant1. *JND* **7**, 355–360 (2020).

197. Yang, Z. *et al.* Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and Voltage-Dependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial Membrane of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Role in Apoptosis. *Clinical Cancer Research* **12**, 5817–5825 (2006).

198. Yao, Z. *et al.* PGC-1β mediates adaptive chemoresistance associated with mitochondrial DNA mutations. *Oncogene* **32**, 2592–2600 (2013).

199. Phi, L. T. H. *et al.* Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells International* **2018**, 1–16 (2018).

200. Yadav, U. P. et al. Metabolic Adaptations in Cancer Stem Cells. Front. Oncol. 10, 1010 (2020).

201. Menendez, J. A. & AlarcÃ³n, T. Metabostemness: A New Cancer Hallmark. *Front. Oncol.* **4**, (2014).

202. Teperino, R., Schoonjans, K. & Auwerx, J. Histone Methyl Transferases and Demethylases; Can They Link Metabolism and Transcription? *Cell Metabolism* **12**, 321–327 (2010).

203. Belenky, P., Bogan, K. L. & Brenner, C. NAD+ metabolism in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 12–19 (2007).

204. Zhao, S. *et al.* Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science* **327**, 1000–1004 (2010).

205. Gao, M.-Q., Choi, Y.-P., Kang, S., Youn, J. H. & Cho, N.-H. CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene* **29**, 2672–2680 (2010).

206. Cioffi, M. *et al.* Identification of a distinct population of CD133+CXCR4+ cancer stem cells in ovarian cancer. *Sci Rep* **5**, 10357 (2015).

207. Zinzi, L. *et al.* ABC transporters in CSCs membranes as a novel target for treating tumor relapse. *Front. Pharmacol.* **5**, (2014).

208. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. & Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* **13**, 714–726 (2013).

209. Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell* **8**, 486–498 (2011).

210. Olejniczak, A., Szaryńska, M. & Kmieć, Z. In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines. *Int J Oncol* (2017) doi:10.3892/ijo.2017.4206.

211. Kipps, E., Tan, D. S. P. & Kaye, S. B. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer* **13**, 273–282 (2013).

212. Ma, X.-L. *et al.* Sphere-forming culture enriches liver cancer stem cells and reveals Stearoyl-CoA desaturase 1 as a potential therapeutic target. *BMC Cancer* **19**, 760 (2019).

213. Thakur, B. & Ray, P. Cisplatin triggers cancer stem cell enrichment in platinum-resistant cells through NF-κB-TNFα-PIK3CA loop. *J Exp Clin Cancer Res* **36**, 164 (2017).

214. Wiechert, A. et al. Cisplatin induces stemness in ovarian cancer. Oncotarget 7, 30511–30522 (2016).

215. Ma, L., Lai, D., Liu, T., Cheng, W. & Guo, L. Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **42**, 593–602 (2010).

216. Zhang, F. *et al.* Cisplatin treatment increases stemness through upregulation of hypoxia-inducible factors by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* **107**, 746–754 (2016).

217. Lu, H. *et al.* Chemotherapy-induced S100A10 recruits KDM6A to facilitate OCT4-mediated breast cancer stemness. *Journal of Clinical Investigation* **130**, 4607–4623 (2020).

218. Abubaker, K. *et al.* Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. *Mol Cancer* **12**, 24 (2013).

219. Jagust, P., de Luxán-Delgado, B., Parejo-Alonso, B. & Sancho, P. Metabolism-Based Therapeutic Strategies Targeting Cancer Stem Cells. *Front. Pharmacol.* **10**, 203 (2019).

220. Pastò, A. *et al.* Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget* **5**, 4305–4319 (2014).

221. Jiang, Y.-X. *et al.* Ascites-derived ALDH+CD44+ tumour cell subsets endow stemness, metastasis and metabolic switch via PDK4-mediated STAT3/AKT/NF-κB/IL-8 signalling in ovarian cancer. *Br J Cancer* **123**, 275–287 (2020).

222. Sancho, P., Barneda, D. & Heeschen, C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer* **114**, 1305–1312 (2016).

223. Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* **44**, W90–W97 (2016).

224. Kanehisa, M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science* **28**, 1947–1951 (2019).

225. Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C. K., Rose, D. W. & Rosenfeld, M. G. A Corepressor/Coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors. *Cell* **116**, 511–526 (2004).

226. Li, H., Feng, Z. & He, M.-L. Lipid metabolism alteration contributes to and maintains the properties of cancer stem cells. *Theranostics* **10**, 7053–7069 (2020).

227. Chkourko Gusky, H., Diedrich, J., MacDougald, O. A. & Podgorski, I. Omentum and bone marrow: how adipocyte-rich organs create tumour microenvironments conducive for metastatic progression: Omentum and bone marrow in tumour metastasis. *Obesity Reviews* **17**, 1015–1029 (2016).

228. Li, J. *et al.* Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell* **20**, 303-314.e5 (2017).

229. Wang, L. *et al.* Fatty acid synthesis is critical for stem cell pluripotency via promoting mitochondrial fission. *EMBO J* **36**, 1330–1347 (2017).

230. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).

231. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors and. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 4318–4323 (1997).

232. Schoonjans, K., Staels, B. & Auwerx, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* **37**, 907–925 (1996).

233. Aoyama, T. *et al.* Altered Constitutive Expression of Fatty Acid-metabolizing Enzymes in Mice Lacking the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPARα). *J. Biol. Chem.* **273**, 5678–5684 (1998).

234. Dressel, U. *et al.* The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ Agonist, GW501516, Regulates the Expression of Genes Involved in Lipid Catabolism and Energy Uncoupling in Skeletal Muscle Cells. *Molecular Endocrinology* **17**, 2477–2493 (2003).

235. Lehrke, M. & Lazar, M. A. The Many Faces of PPARy. *Cell* **123**, 993–999 (2005).

236. Way, J. M. *et al.* Comprehensive Messenger Ribonucleic Acid Profiling Reveals ThatPeroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation HasCoordinate Effects on Gene Expression in Multiple Insulin-SensitiveTissues. *Endocrinology* **142**, 1269–1277 (2001).

237. Sarruf, D. A. *et al.* Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ in Key Neuronal Subsets Regulating Glucose Metabolism and Energy Homeostasis. *Endocrinology* **150**, 707–712 (2009).

238. Ito, K. *et al.* A PML–PPAR-δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* **18**, 1350–1358 (2012).

239. Hoque, Md. T., Robillard, K. R. & Bendayan, R. Regulation of Breast Cancer Resistant Protein by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Human Brain Microvessel Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* **81**, 598–609 (2012).

240. Szatmari, I. *et al.* Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ-regulated ABCG2 Expression Confers Cytoprotection to Human Dendritic Cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 23812–23823 (2006).

241. Hegedüs, C., Telbisz, Á., Hegedűs, T., Sarkadi, B. & Özvegy-Laczka, C. Lipid Regulation of the ABCB1 and ABCG2 Multidrug Transporters. in *Advances in Cancer Research* vol. 125 97–137 (Elsevier, 2015).

242. Petan, T., Jarc, E. & Jusović, M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Molecules* **23**, 1941 (2018).

243. Garaulet, M. *et al.* Site-specific differences in the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in an obese population from a Mediterranean area: relation with dietary fatty acids, plasma lipid profile, serum insulin, and central obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 585–591 (2001).

244. Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C. & Perez, J. M. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Mol Pharmacol* **59**, 657–663 (2001).

245. Begicevic, R.-R., Arfuso, F. & Falasca, M. Bioactive lipids in cancer stem cells. *WJSC* **11**, 693–704 (2019).

246. Sabnis, N. G., Miller, A., Titus, M. A. & Huss, W. J. The Efflux Transporter ABCG2 Maintains Prostate Stem Cells. *Mol Cancer Res* **15**, 128–140 (2017).

247. Park, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* **46**, e99–e99 (2014).

248. Wang, S. *et al.* Development of a prosaposin-derived therapeutic cyclic peptide that targets ovarian cancer via the tumor microenvironment. *Sci. Transl. Med.* **8**, 329ra34-329ra34 (2016).

249. Lee, D. *et al.* Expression of fatty acid binding protein 4 is involved in the cell growth of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* **31**, 1116–1120 (2014).

250. Sp, N. *et al.* Nobiletin Inhibits CD36-Dependent Tumor Angiogenesis, Migration, Invasion, and Sphere Formation Through the Cd36/Stat3/Nf-Kb Signaling Axis. *Nutrients* **10**, 772 (2018).

251. Hale, J. S. *et al.* Cancer Stem Cell-Specific Scavenger Receptor CD36 Drives Glioblastoma Progression: CD36 and Glioblastoma Stem Cells. *Stem Cells* **32**, 1746–1758 (2014).

252. Liao, J. *et al.* Ovarian Cancer Spheroid Cells with Stem Cell-Like Properties Contribute to Tumor Generation, Metastasis and Chemotherapy Resistance through Hypoxia-Resistant Metabolism. *PLoS ONE* **9**, e84941 (2014).

253. Sugden, M. C. & Holness, M. J. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Archives of Physiology and Biochemistry* **112**, 139–149 (2006).

254. Woolbright, B. L. *et al.* The Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-4 (PDK4) in Bladder Cancer and Chemoresistance. *Mol Cancer Ther* **17**, 2004–2012 (2018).

255. De Luca, A. *et al.* Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget* **6**, 14777–14795 (2015).

256. Sancho, P. *et al.* MYC/PGC-1α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metabolism* **22**, 590–605 (2015).

257. Katajisto, P. *et al.* Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* **348**, 340–343 (2015).

258. Shen, L. *et al.* PGC1α promotes cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells through upregulation of mitochondrial biogenesis. *Int J Oncol* (2018) doi:10.3892/ijo.2018.4401.

259. Shen, L. *et al.* PGC1α regulates mitochondrial oxidative phosphorylation involved in cisplatin resistance in ovarian cancer cells via nucleo-mitochondrial transcriptional feedback. *Experimental Cell Research* 112369 (2020) doi:10.1016/j.yexcr.2020.112369.

##