

Ricerca Proposta

“RIPK1- targeting in Cancer: modulazione del processo di morte cellulare programmata per la cura del cancro”

Tema della ricerca

Il modo in cui gli organismi regolano il corretto equilibrio tra la produzione di cellule "nuove" e l'eliminazione di quelle "vecchie" rimane un'importante questione biologica in fase di studio, considerando che molte patologie, tra cui il cancro, sorgono dall'interruzione dell'omeostasi. Caratteristica principale di una cellula tumorale è sfuggire alla morte cellulare programmata (PCD), andando incontro ad una sregolata proliferazione cellulare e conseguente trasformazione maligna. La deregolazione della morte cellulare nel cancro può portare alla resistenza ai farmaci e di conseguenza al fallimento terapeutico; quindi, è necessario rafforzare l'idea che il targeting della PCD nella tumorigenesi possa rappresentare uno strumento strategico in oncologia. Un approccio per la cura delle malattie neoplastiche è il ripristino delle normali vie di trasduzione del segnale di “death” silenziate. A tal proposito particolarmente interessante si è rivelato lo studio delle epigenetic-drugs. I farmaci epigenetici sono piccole molecole di derivazione sintetica o naturale che prendono di mira specifiche modificazioni epigenetiche [1]. Queste molecole, oltre a regolare lo stato funzionale della cromatina, sono in grado sia di riattivare l'espressione dei soppressori tumorali silenziate e dei geni riparatori del DNA, sia di ripristinare il corretto funzionamento di specifiche vie cellulari, come la morte cellulare, inibite in molte patologie. Quella dei farmaci epigenetici rappresenta un'idea talmente promettente che ha portato all'approvazione da parte della *Food and Drug Administration* con la speranza che presto entrino a far parte della terapia farmacologica. Grazie alle loro proprietà terapeutiche e alla bassa tossicità, possono essere più attivi nei sistemi neoplastici e non agire o agire meno nei normali sistemi cellulari [1,2].

Recentemente il concetto di morte cellulare si è abbastanza esteso ed il Comitato per la Nomenclatura sulla Morte Cellulare (NCCD) ha formulato linee guida per la definizione e l'interpretazione delle varie tipologie di morte cellulare regolata, le quali presentano un certo grado di interconnettività ma caratterizzate da uno specifico pathway di segnalazione e con specifiche caratteristiche morfologiche, biochimiche e immunogeniche [3,4]. In questo scenario particolarmente notevole, un mediatore appartenente sia alla via apoptotica che a quella necrotica è la proteina chinasi Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1), la quale interpreta i segnali extracellulari attivando differenti pathway di segnalazione responsabili della sopravvivenza cellulare o della morte cellulare e, sebbene la sua funzione sia ampiamente discussa in patologie infiammatorie, il suo ruolo nel cancro resta ancora da investigare. Un recente lavoro collega RIPK1 al processo di tumorigenesi e di morte cellulare, dove ne è stato per la prima volta discusso il ruolo dell'acetilazione in quanto nel complesso molecolare RIPK1-mediato, è stata dimostrata la co-presenza di proteine con differenti attività enzimatiche quali acetil-transferasi, chinasi e deacetilasi [5].

“Targeting RIPK1” ha lo scopo di investigare i meccanismi molecolari che sono alla base di patologie ad elevato impatto sociale come il cancro mediante una migliore caratterizzazione della PCD e di uno dei suoi principali effettori quale RIPK1. A partire dalla necrostatina-1s (Nec-1s), la prima piccola molecola inibitrice dell'attività chinasi di RIPK1, molti programmi di sviluppo di farmaci hanno perseguito il targeting di RIPK1 ma, finora, gli studi clinici sugli inibitori di RIPK1 per il trattamento dei tumori non hanno avuto successo [6,7]. Quindi lo sviluppo di inibitori selettivi, potenti e sicuri di RIPK1, rimangono sfide chiave per il futuro sviluppo clinico.

L'attività di ricerca, essendo un progetto PON industriale, ha previsto la sinergia tra realtà accademiche, italiana ed estera, e una realtà aziendale che ha incrementato notevolmente la qualità del progetto. In particolare, il percorso di studi e formazione è stato così suddiviso: 16 mesi presso l'Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli" Dipartimento di Medicina di Precisione, 8 mesi presso Epi-C srl, e 12 mesi all'estero, presso la Radboud University in Olanda (Nijmegen).

Attività di ricerca proposta, metodologie e contenuti

Il progetto di ricerca proposto ha mirato ad una migliore caratterizzazione della necroptosi, un processo di PCD rappresentato dall'inattivazione di un gruppo di enzimi ad attività proteolitica (caspasi) e controllato dall'attività chinasi di RIPK1, RIPK3 e della proteina Mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) costituenti il necrosoma. Tra i recenti PCD caratterizzati, la necroptosi risulta alterata in molti tipi di cancro, mostrando un alto potenziale come bersaglio terapeutico per il trattamento di tutti i tumori resistenti agli agenti chemioterapici o induttori di apoptosi [8,9]. Considerato che l'indagine sull'interconnessione tra apoptosi e necroptosi (o altre PCDs) è attualmente scarsamente caratterizzata, sia la modulazione che il ripristino dell'equilibrio delle PCDs potrebbero rappresentare una strategia terapeutica nella terapia del cancro. A questo scopo l'attenzione si è concentrata sugli effetti biologici di un composto, MC2494, un pan-inibitore delle sirtuine precedentemente identificato e caratterizzato per la sua capacità di indurre l'apoptosi *in vivo*, *ex vitro* ed *in vitro* in diversi sistemi tumorali [5]. Il meccanismo d'azione è pienamente in linea con il concetto di terapia epigenetica, che mira a ripristinare la corretta esecuzione delle vie cellulari alterate e silenziate. Quindi, è stato evidenziato il ruolo antitumorale del composto epigenetico in un ampio pannello di tumori, ematologici (leucemia) e solidi (mammella), definendone gli effetti sulla progressione del ciclo cellulare, sulla regolazione della morte cellulare e sulla migrazione cellulare [10] (Figs. 1, 2). Il nostro studio ha rivelato che, tra le tre linee cellulari leucemiche utilizzate, le cellule di leucemia mieloide acuta erano più sensibili delle cellule di leucemia mieloide cronica e, al contrario, le linee cellulari di cancro al seno erano generalmente più resistenti al trattamento. Per la realizzazione di tali risultati ci si è avvalsi di analisi molecolare e di citofluorimetria a flusso (FACS) grazie all'expertise posseduta dal Dipartimento di Medicina di Precisione.

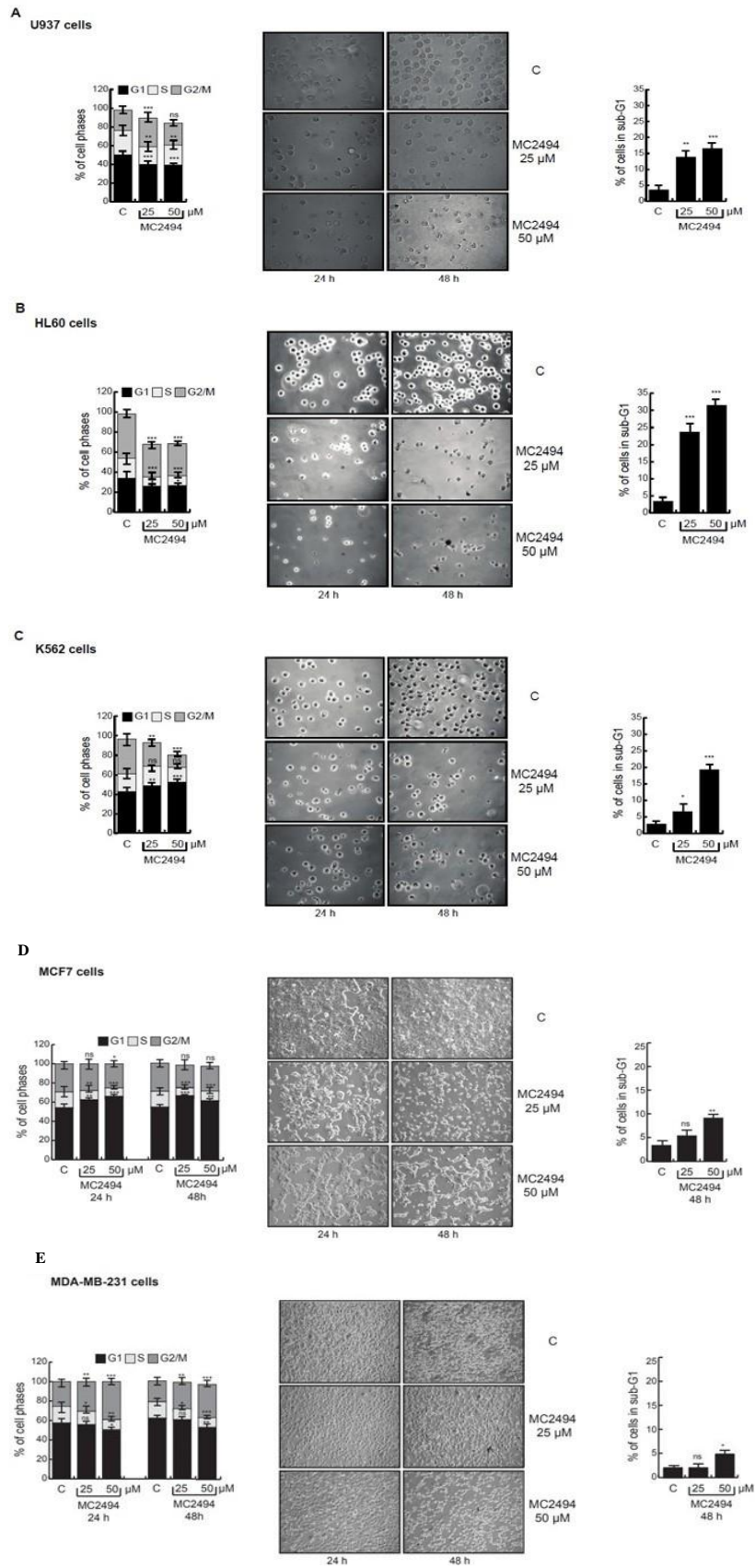


Figura 1. MC2494 influenza la proliferazione nelle linee cellulari leucemiche e nelle linee cellulari di cancro al seno. Le cellule U937, HL60, K562, MCF7, MDA-MB-231 (MDA-MB-453 and T47D dati non mostrati) sono state trattate con MC2494 per 24 ore e 48 ore a due diverse concentrazioni (25 μ M e 50 μ M). Analisi del ciclo cellulare (pannelli di sinistra), analisi morfologica eseguita con microscopia ottica in campo chiaro (40 \times) (pannelli centrali), analisi sub-G1 (pannelli di destra). (A) Esperimenti eseguiti con cellule U937. (B) Esperimenti eseguiti con cellule HL60. (C) Esperimenti eseguiti con cellule K562. (D) Esperimenti eseguiti con cellule MCF7. (E) Esperimenti eseguiti con cellule MDA-MB-231.

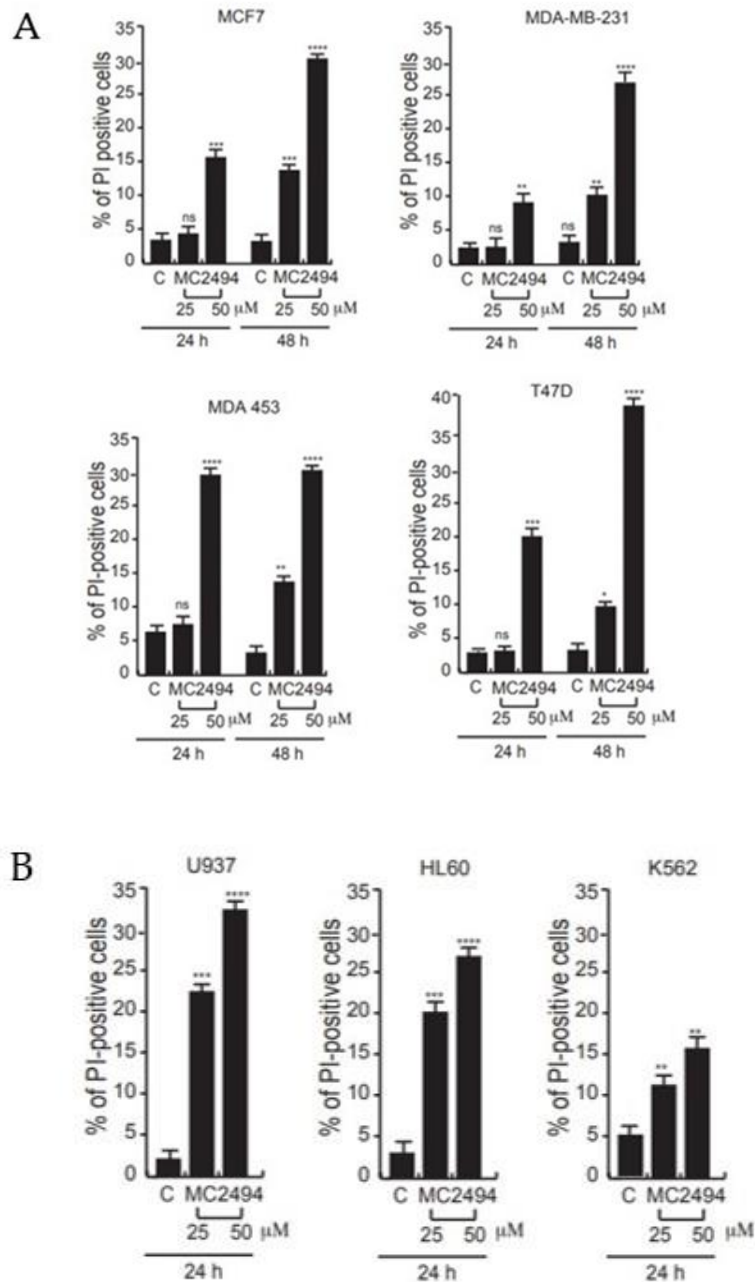


Figura 2. MC2494 induce la morte cellulare. (A) Valutazione delle cellule di cancro al seno positive al propidio ioduro (PI) eseguita con MC2494 a 25 μ M e 50 μ M dopo 24 ore e 48 ore di induzione. (B) Valutazione delle cellule leucemiche positive al propidio ioduro (PI) eseguita con MC2494 a 25 μ M e 50 μ M dopo 24 ore di induzione.

Particolarmente interessante è stato lo studio degli effetti di tale composto sulla funzionalità mitocondriale, sottolineando la già ben discussa valenza di determinati composti, meglio conosciuti come Mitocans, come adiuvanti nella terapia anticancro [11].

La valutazione dell'espressione proteica di RIPK1 ha mostrato che la proteina si esprime in maniera ubiquitaria nelle varie linee di cancro (ematologiche e solide) testate (Fig. 3A). Di notevole interesse è risultato lo studio dell'espressione proteica in varie linee leucemiche evidenziando come nella linea mieloide acuta (AML), U937, tale espressione risulti variabile, mettendo in risalto ancora di più una funzione biologica poco chiara. Considerando il ruolo enigmatico di RIPK1 a causa delle sue funzioni pleiotropiche in diversi pathways di segnalazione e le scarse evidenze nella leucemogenesi, abbiamo

indirizzato i nostri esperimenti nelle cellule leucemiche, esplorando l'effetto di MC2494 sui componenti del necrosoma.

A livello proteico l'induzione con MC2494 a vari tempi provoca una sostanziale diminuzione dell'espressione di un solo componente necrosomiale, RIPK1 (Fig. 3B) [12].

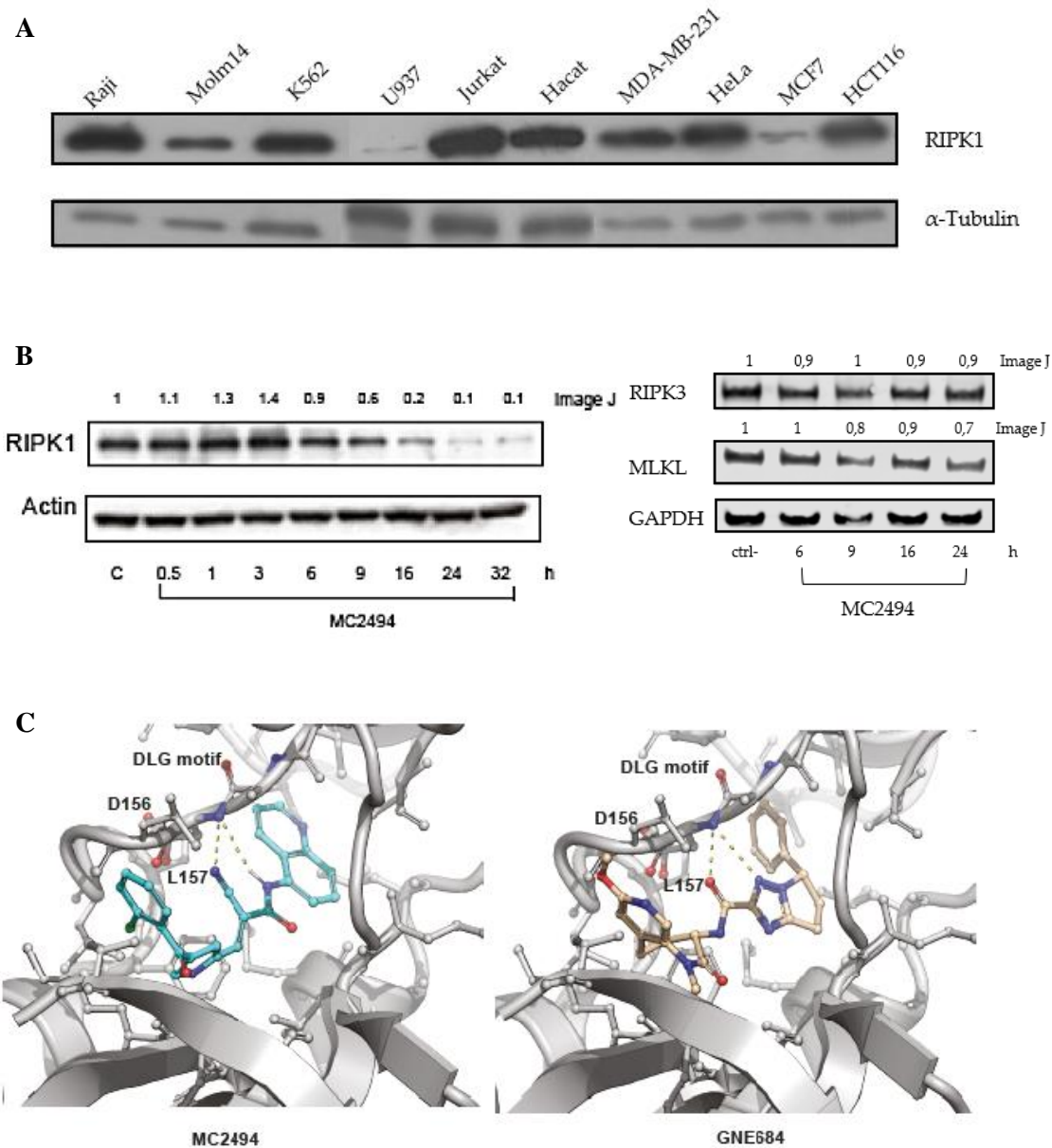


Figure 3. (A) Espressione della proteina RIPK1 in diverse linee cellulari tumorali. (B) MC2494 regola il necrosoma. Analisi Western blot di RIPK1, RIPK3 e MLKL. Actin e GAPDH sono stati usati come controlli di caricamento. (C) Rappresentazione schematica dell'aggancio di MC2494 (bastoncini ciano - pannello sinistro) e GNE684 (bastoni rosa - pannello destro) con RIPK1 (PDB: 6NYH). Gli atomi di azoto e ossigeno sono colorati rispettivamente di blu e rosso. Le interazioni polari tra i composti e la porzione proteica sono mostrate con linee tratteggiate gialle.

Questa (de) regolazione è stata osservata esclusivamente a livello proteico; infatti, esplorando i geni differenzialmente espressi (DE) dall'analisi genomica, né RIPK1 né RIPK3 risultano regolati dopo il trattamento con MC2494. Esperimenti di RNA-seq hanno permesso di identificare i processi biologici maggiormente influenzati dal trattamento con l'*epidrug*. Come previsto, i geni modulati dopo il trattamento sono quelli coinvolti nella regolazione delle vie di segnalazione della morte cellulare e del ciclo cellulare, confermando così l'azione antitumorale del MC2494, che mira a ripristinare la

corretta esecuzione delle vie cellulari alterate e silenziate. Inoltre, nonostante la capacità prevista di MC2494 di legare RIPK1 nella sua tasca enzimatica (Fig. 3C), un test specifico della chinasi ha mostrato che MC2494 non è un inibitore diretto di RIPK1, dati supportati dal Cellular thermal shift assay (CETSA), rivelando la mancanza di un'interazione diretta tra il composto e la proteina.

L'insieme di questi dati ha supportato l'idea dell'attivazione di una via necroptotica non canonica, in cui RIPK1 è complessato ad altre proteine responsabili della sua degradazione. Considerando che il mal ripiegamento proteico (UPR) e i processi di ubiquitinazione sono alcuni dei principali processi biologici che promuovono la degradazione delle proteine, abbiamo cercato questi processi biologici dai dati di RNA-seq. Dopo il trattamento è stata osservata una sovra regolazione globale di questi geni.

È già noto, inoltre, che il meccanismo alternativo di necroptosi non richiede RIPK1 e può essere indotto da recettori diversi rispetto al pathway canonico [13]. A valle di questi recettori, l'interazione tra RIPK3 ed MLKL determina l'attivazione del necrosoma e l'inizio della necroptosi. Considerato quanto già noto dalla letteratura, insieme alla sovra regolazione solo a livello genomico dell'ultimo interagente del complesso di morte del necrosoma, MLKL, ci hanno portato a ipotizzare che RIPK1 sia mal ripiegato e degradato tramite ubiquitinazione, dall'azione di MC2494, probabilmente a causa dell'attivazione del sistema UPR nel reticolo endoplasmatico (ER) sotto stress. MC2494 potrebbe avere un ruolo fondamentale nell'attivazione delle proteine effettrici dell'UPR portando alla degradazione di RIPK1, al silenziamento del pathway correlato alla sopravvivenza e all'attivazione di una via di segnalazione di PCD non canonica [14].

Grado di innovazione della ricerca proposta

Sebbene questi studi preliminari necessitino un approfondimento, l'MC2494 assume un ruolo chiave nella regolazione della tumorigenesi e nei programmi di PCD mediata da RIPK1, rendendola un evento farmacologicamente controllabile nella terapia del cancro.

Il nostro studio, coerente con la Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente (SNSI) approvata dalla Commissione Europea, ha evidenziato l'importanza nell'uso di composti epigenetici, in grado di bloccare la crescita del cancro mediante l'attivazione selettiva di una specifica via di morte cellulare. Il targeting del necrosoma può portare a una riprogrammazione della morte cellulare e del destino cellulare. La modulazione del complesso RIPK1 potrebbe essere cruciale per superare la deregolazione della morte cellulare nel cancro e per migliorare la sensibilità alle terapie antitumorali. La spiegazione di "come" RIPK1 regoli gli esiti delle diverse vie di morte cellulare e il loro coinvolgimento nella leucemogenesi, sarà utile per definire come possa essere un bersaglio per tentativi farmaceutici, aumentando e rafforzando il già ben discusso concetto di terapia personalizzata. Sarà necessaria un'ulteriore indagine per chiarire meglio la via molecolare guidata da MC2494 che è responsabile della degradazione di RIPK1 nella leucemia mieloide acuta. Dopo questo studio si potrà eventualmente ipotizzare di ampliare le attuali visioni della terapia, rendendola più efficace grazie a una bassa tossicità e maggiore specificità aumentando l'indice terapeutico e riducendo lo sviluppo della resistenza terapeutica. Pertanto, particolare attenzione sarà prestata anche all'utilizzo di campioni biologici umani come potenziale materiale di partenza per molteplici indagini sperimentali.

Bibliografia

1. Miranda Furtado, Cristiana Libardi et al. "Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment." *Epigenetics* vol. 14,12 (2019): 1164-1176. doi:10.1080/15592294.2019.1640546
2. Sharma, Shikhar et al. "Epigenetics in cancer." *Carcinogenesis* vol. 31,1 (2010): 27-36. doi:10.1093/carcin/bgp220
3. Galluzzi, Lorenzo et al. "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell death and differentiation* vol. 25,3 (2018): 486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
4. Della Torre, Laura et al. "The Role of Necroptosis: Biological Relevance and Its Involvement in Cancer." *Cancers* vol. 13,4 684. 8 Feb. 2021, doi:10.3390/cancers13040684
5. Carafa, Vincenzo et al. "RIP1-HAT1-SIRT Complex Identification and Targeting in Treatment and Prevention of Cancer." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 24,12 (2018): 2886-2900. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3081
6. Hou, Jue et al. "Discovery of potent necroptosis inhibitors targeting RIPK1 kinase activity for the treatment of inflammatory disorder and cancer metastasis." *Cell death & disease* vol. 10,7 493. 24 Jun. 2019, doi:10.1038/s41419-019-1735-6
7. Mifflin, Lauren et al. "Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) as a therapeutic target." *Nature reviews. Drug discovery* vol. 19,8 (2020): 553-571. doi:10.1038/s41573-020-0071-y
8. Wang, Tianzhen et al. "Necroptosis in cancer: An angel or a demon?." *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* vol. 39,6 (2017): 1010428317711539. doi:10.1177/1010428317711539
9. Najafov, Ayaz et al. "Necroptosis and Cancer." *Trends in cancer* vol. 3,4 (2017): 294-301. doi:10.1016/j.trecan.2017.03.002
10. Carafa, Vincenzo et al. "Enzymatic and Biological Characterization of Novel Sirtuin Modulators against Cancer." *International journal of molecular sciences* vol. 20,22 5654. 12 Nov. 2019, doi:10.3390/ijms20225654
11. Carafa, Vincenzo et al. "The Pan-Sirtuin Inhibitor MC2494 Regulates Mitochondrial Function in a Leukemia Cell Line." *Frontiers in oncology* vol. 10 820. 21 May. 2020, doi:10.3389/fonc.2020.00820
12. <https://biomedres.us/fulltexts/BJSTR.MS.ID.003920.php>
13. Rickard, James A et al. "RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis." *Cell* vol. 157,5 (2014): 1175-88. doi:10.1016/j.cell.2014.04.019
14. Stack, H.; Hill, C.; Gahan, C. Stress Responses. In: *Handbook of Listeria Monocytogenes*. CRC Press; 2008. p. 61–96. doi:10.1201/9781420051414.ch3