

Titolo divulgativo: Mitochondri e tumori: nuove frontiere nelle terapie mediche

Sottotitolo scientifico: “Dinamica mitocondriale nelle cellule tumorali: identificazione di nuovi target molecolari per strategie terapeutiche”

Responsabile Scientifico del Progetto: Prof.ssa Claudia Zanna, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna.

Gruppo di studio: Dott.ssa Silvia Grillini, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna; Dott. Riccardo Righetti, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna; Prof.ssa Alessandra Baracca, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna; Dott.ssa Alessandra Maresca, IRCCS Bellaria; Dott.ssa Danara Ormanbekova, IRCCS Bellaria; Dott. Claudio Fiorini, IRCCS Bellaria; Dott. Leonardo Caporali, IRCCS Bellaria.

RELAZIONE SCIENTIFICA

Introduzione

La riprogrammazione metabolica consente la sopravvivenza e la crescita delle cellule tumorali, che sono caratterizzate da un'elevata richiesta di ATP ed intermedi metabolici, necessari per i processi di biosintesi, per la replicazione cellulare e l'attivazione di meccanismi per tollerare stress associati alla malignità (stress ossidativo, ipossia, etc). I mitocondri sono importanti mediatori della tumorigenesi e della progressione del cancro, grazie alla loro flessibilità nell'adattarsi alle alterazioni cellulari e ambientali. (DeBerardinis RJ et al. 2016; Ward PS et al. 2012; Pavlova NN et al. 2016; Vyas S et al. 2016).

Svariate proteine mitocondriali sono coinvolte nella riprogrammazione metabolica con un'azione pro-oncogenica in tumori differenti. IF_1 , l'inibitore endogeno dell'ATP sintasi mitocondriale, è sovra-espresso in molti tumori ed ha un ruolo centrale nelle cellule tumorali promuovendo la riprogrammazione metabolica, la proliferazione e la resistenza alla morte cellulare. IF_1 inibisce l'idrolisi di ATP, da parte dell'ATP sintasi, quando le cellule tumorali sono esposte ad anossia/ipossia, favorendo la sopravvivenza cellulare e la crescita tumorale (Solaini G et al. 2021; Sgarbi G et al. 2018). Molteplici aspetti della biologia mitocondriale, oltre al metabolismo energetico, supportano la tumorigenesi, inclusa la biogenesi ed il turnover mitocondriale, la dinamica di fissione e fusione del reticolo e la suscettibilità alla morte cellulare programmata o apoptosi (Vyas S et al. 2016).

Il reticolo mitocondriale è una struttura definita ma enormemente plastica che cambia continuamente, attraverso eventi di fusione e fissione finemente bilanciati e regolati, in base alle esigenze metaboliche della cellula o alle situazioni di stress. Mancanza di nutrienti, stress contenuti ed aumentata fosforilazione ossidativa (OXPHOS; per la produzione di energia) sono associati ad un network filamentoso ed interconnesso, al contrario eccesso di nutrienti, stress severi e disfunzioni dell'OXPHOS sono accompagnati da frammentazione mitocondriale (Wai T et al. 2016; Mishra P et al. 2016).

Le principali proteine coinvolte nel rimodellamento delle membrane sono Mitofusine ed OPA1 regolano la fusione della membrana mitocondriale esterna ed interna, rispettivamente, mentre Drp1 guida la fissione (Del Dotto V. et al. 2018 a; b).

Alterazioni della dinamica del reticolo mitocondriale contribuiscono a vari aspetti della tumorigenesi e della progressione del cancro (Kumar S et al. 2021). La fissione del reticolo mitocondriale è necessaria per la duplicazione cellulare ed è quindi spesso associata ad elevati livelli di proliferazione tumorale, di invasività e di metastatizzazione (Kumar S et al. 2021), mentre la fusione potrebbe intervenire nell'innesco della tumorigenesi, quando la richiesta di energia è molto elevata (Li M et al. 2020). L'incremento di fusione ed il reticolo interconnesso promuovono un aumento della OXPHOS, meccanismo riportato in vari tumori (Li M et al. 2020). L'ipotesi è che il reticolo interconnesso favorisca il metabolismo mitocondriale, impedendo l'apoptosi ed alimentando il tumore.

Internamente i mitocondri presentano un'organizzazione strutturale molto particolare denominata *cristae*, le quali sono generate dall'invaginazione ripetuta della membrana mitocondriale interna, e sono compartimenti funzionali essenziali per la produzione di energia. Inoltre sono strutture dinamiche che adattano la loro architettura in risposta agli stimoli, in particolare l'apoptosi (Quintana-Cabrera R et al. 2018a). Questi compartimenti comunicano con lo spazio intermembrana (spazio esistente tra le membrane mitocondriale interna ed esterna) attraverso strette giunzioni tubolari denominate *cristae junctions* (CJ), che agiscono come barriere di diffusione e delimitano spazialmente i processi biochimici associati alle *cristae*. In condizioni fisiologiche le CJ restano strette, mentre a seguito dell'attivazione del processo apoptotico si allargano e rilasciano le proteine solubili (citocromo c, AIF, etc.) nello spazio intermembrana, compromettono i processi metabolici mitocondriale ed innescano la cascata apoptotica (Quintana-Cabrera R et al. 2018a).

Tre grandi complessi controllano la biogenesi, la struttura e la funzione delle *cristae*: OPA1, i dimeri dell'ATP sintasi ed il complesso MICOS (Mitochondrial contact site and cristae organizing system) (Yang Z et al. 2022).

IF1 sembra svolgere la sua azione pro-oncogenica anche inibendo l'apoptosi. L'ipotesi è che possa stimolare OPA1 a mantenere serrate le CJ, impedendo il rilascio di citocromo c nel citoplasma ed il completamento del processo apoptotico (Faccenda D et al. 2017).

Obiettivi dello studio

L'obiettivo del progetto è di studiare e modulare le possibili interconnessioni tra i processi di fusione e fissione del reticolo mitocondriale, fortemente implicati nei vari stadi di progressione tumorale, e l'espressione/attività di IF1, proteina pro-oncogenica mitocondriale altamente espressa nei tumori e coinvolta nella riprogrammazione metabolica tipica delle cellule tumorali. La modulazione combinata dei processi di fusione-fissione e dei livelli intracellulari di IF1, attraverso approcci genetici e farmacologici, potrebbe fornire le basi molecolari per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Metodi

Modelli cellulari: Linee cellulari di osteosarcoma (143B) e di colon carcinoma umano (HCT116). Queste linee cellulari sfruttano metabolismi energetici differenti (143B sono glicolitiche, mentre le HCT116 sono maggiormente dipendenti dalla fosforilazione ossidativa) e presentano livelli di espressione di IF1 differenti (Sgarbi G et al. 2018).

Gli esperimenti sono stati condotti su queste linee e sui cloni con silenziamento di IF1 (IF1 knock-down KD) in diverse condizioni metaboliche: 25mM glucosio, 5mM glucosio (fisiologiche del corpo umano) e senza glucosio con 5mM galattosio (per stimolare la fosforilazione ossidativa).

Risultati

Obiettivo 1. Analisi della dinamica mitocondriale tramite studio delle proteine/complessi coinvolti nei processi di fusione/fissione mitocondriale e nell'organizzazione delle *cristae* e microscopia confocale del reticolo in linee cellulari tumorali con o senza IF1.

Le HCT116, che sovra-esprimono IF1 rispetto alle 143B, hanno un assetto delle proteine coinvolte nella dinamica mitocondriale completamente diverso. OPA1 (Figura 1 A-C) e MFN1 (fusione del reticolo) così come Dnm2 (fissione) risultano significativamente meno espresse nelle HCT116 ed il reticolo mitocondriale appare meno interconnesso (Figura 1 D-E).

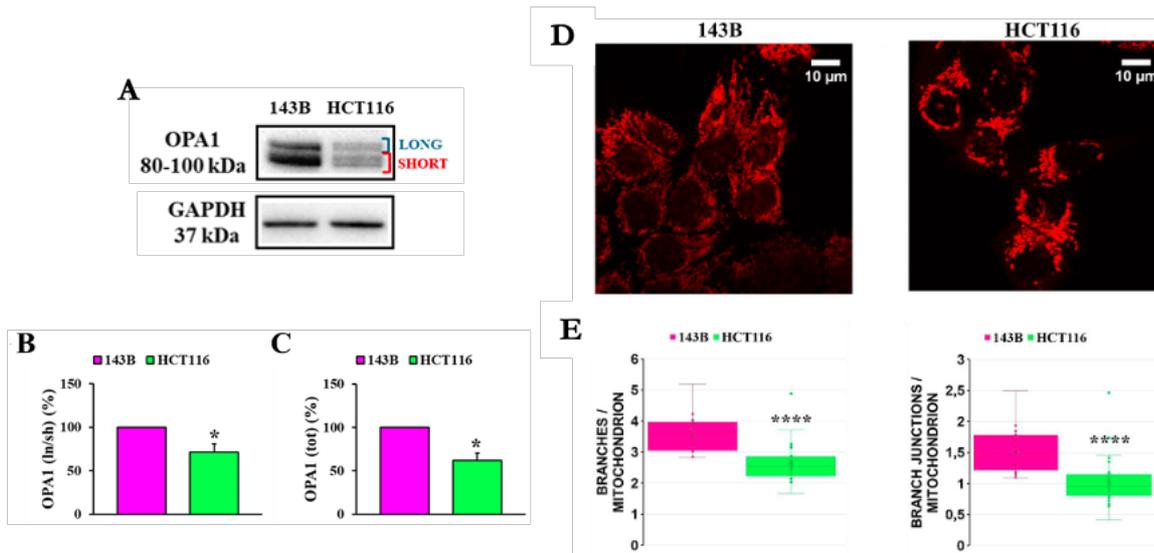


Figura 1

In entrambe le linee tumorali cresciute in terreno con un'alta concentrazione di glucosio, l'assenza di IF1 non altera la morfologia del reticolo mitocondriale (analizzata in microscopia confocale), così come i livelli di espressione delle proteine coinvolte nella fusione/fissione mitocondriale, delle proteasi che processano OPA1 e dei componenti del complesso MICOS (organizzazione delle cristae).

In terreno con una bassa concentrazione di glucosio (corrispondente alla concentrazione fisiologica umana), nelle HCT116 la presenza di IF1 permette il mantenimento del reticolo mitocondriale filamentoso con un incremento dei livelli proteici di OPA1 e del rapporto long/short, mentre il suo silenziamento promuove una notevole frammentazione con calo drastico di OPA1 e del rapporto long/short. In maniera simile, in basso glucosio le 143B che over-esprimono IF1 presentano una maggiore interconnessione del reticolo mitocondriale e livelli proteici di OPA1 e rapporto long/short incrementati, processo che viene bloccato dall'assenza di IF1.

In terreno senza glucosio e contenente galattosio (noto induttore dell'attività OXPHOS), la linea di osteosarcoma senza IF1 è maggiormente sensibile presentando una notevole frammentazione del reticolo mitocondriale accompagnata dal calo significativo dei livelli di OPA1 e del rapporto long/short. Mentre le HCT116 pur avendo una riduzione importante dei livelli di OPA1 e del rapporto long/short, mostrano una frammentazione meno spinta del reticolo.

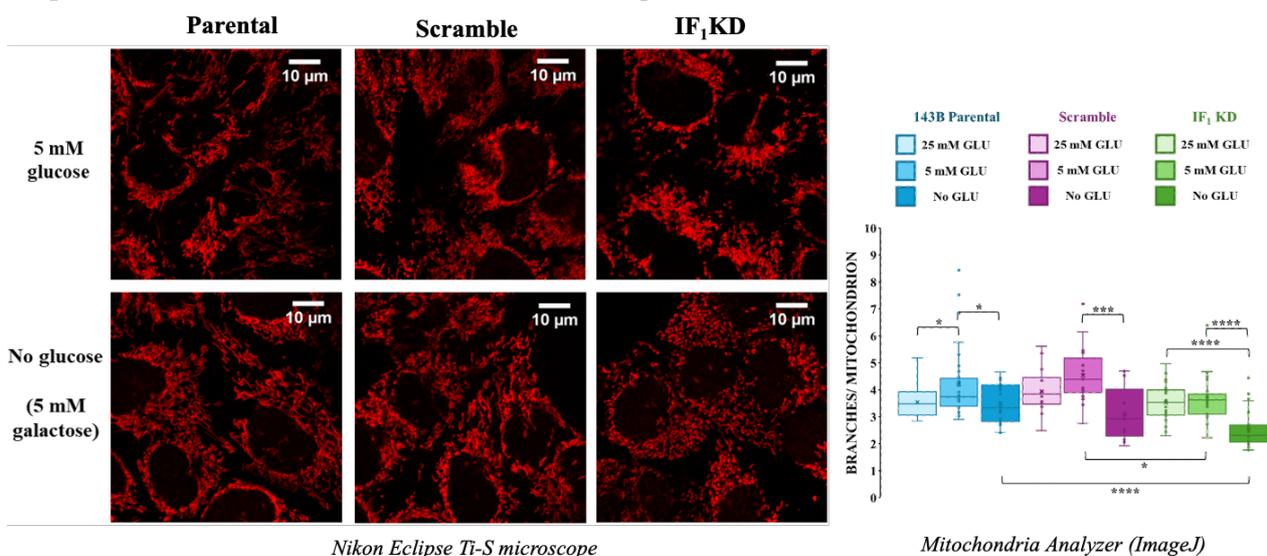


Figura 2

Pertanto a concentrazioni di glucosio fisiologiche o in galattosio, la presenza/assenza di IF1 influenza l'interconnessione del reticolo mitocondriale in relazione alla linea tumorale analizzata. In particolare le 143B con il silenziamento di IF1 sembrano essere più prone alla frammentazione del reticolo in galattosio mentre le HCT IF1 ko lo sono in basso glucosio.

Obiettivo 2. Analisi di trascrittomiche mediante sequenziamento dell'RNA, utilizzando una piattaforma Illumina (sistema NextSeq 500), per identificare i pathways potenzialmente coinvolti a seguito della modulazione della dinamica mitocondriale in presenza/assenza di IF1.

L'analisi di PCA (Principal Component Analysis) tramite trascrittomiche ha permesso di evidenziare nelle HCT116 una notevole diversità di trascritti tra le cellule con e senza IF1 in tutte le condizioni sperimentali statiche (25mM glucosio, 5mM glucosio e 5mM galattosio).

La ricerca dei pathways coinvolti è in corso. Analisi preliminari indicano che in alto glucosio assorbimento e digestione dei glucidi, glicolisi, metabolismo azotato e metabolismo delle pirimidine siano particolarmente interessati in entrambe le linee tumorali.

Conclusioni

La presenza di IF1 tende a favorire l'interconnessione del reticolo mitocondriale, favorendo la fosforilazione ossidativa e quindi la produzione di ATP, mentre il suo silenziamento promuove la frammentazione del reticolo mitocondriale.

L'ipotesi è che IF1 possa promuovere l'interconnessione del reticolo mitocondriale ed bloccarne la frammentazione, interagendo con OPA1 e con l'ATP sintasi nelle cristae ed inibendo il processamento di OPA1, per stimolare l'adattamento delle cellule tumorali alle condizioni di stress che si generano nei micro-ambienti tumorali.

Bibliografia

DeBerardinis RJ et al. (2016) *Sci Adv* 2: e1600200. Fundamentals of cancer metabolism.

Del Dotto V et al. (2018a) *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*1859: 263–269. Eight human OPA1 isoforms, long and short: what are they for?

Del Dotto V et al. (2018b) *Pharmacol. Res.* 131: 199–210. OPA1: how much do we know to approach therapy?

Faccenda D et al. (2017) *Cell Reports*, 18: 869-1883. Control of Mitochondrial Remodeling by the ATPase Inhibitory Factor 1 Unveils a Pro-survival Relay via OPA1.

Kumar S et al. (2021) *Cell Biol Toxicol.* 2021 Oct 18. Mitochondrial dynamics regulators: implications for therapeutic intervention in cancer.

Li M et al. (2020) *Cells* 9:121. Mitochondrial Fusion Via OPA1 and MFN1 Supports Liver Tumor Cell Metabolism and Growth

Mishra P et al. (2016) *J Cell Biol.* 212:379-87. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics.

Pavlova NN et al. (2016) *Cell Metabolism* 23: 27-47. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism.

Quintana-Cabrera R et al. (2018a) *Biochem Biophys Res Commun* 500:94-101. Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function

Quintana-Cabrera R et al. (2018b) *Nat Commun.* 9:3399. The cristae modulator Optic atrophy 1 requires mitochondrial ATP synthase oligomers to safeguard mitochondrial function.

Sgarbi G et al. (2018) BBA - Bioenergetics, 1859: 99-109. The role of the ATPase inhibitor factor 1 (IF1) in cancer cells adaptation to hypoxia and anoxia.

Solaini G et al. (2021) Biochemical Society Transactions 49: 815–827. The F1Fo-ATPase inhibitor, IF1, is a critical regulator of energy metabolism in cancer cells.

Vyas S et al. (2016) Cell 166: 555–566. Mitochondria and Cancer.

Yang Z et al. (2022) Frontiers In Bioengineering And Biotechnology 9: 786806.
Mitochondrial Membrane Remodeling

Wai T et al. (2016) Trends Endocrinol Metab 27:105-117. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation.

Ward PS et al. (2012) Cancer Cell 21: 297-308. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate.