

Scheda di sintesi della Tesi:

“L’integrazione di AdipoRon nella terapia con Gemcitabina per il trattamento del PDAC & l’ereditarietà del centromero nella stabilità del genoma: possibili approcci terapeutici per la cura del cancro in Medicina di Precisione”

Nel corso degli anni, la Medicina di Precisione ha acquisito grande importanza affermandosi come "il futuro della Medicina". Diversamente dall'approccio terapeutico tradizionale, che, con meno considerazione per le differenze intrinseche presenti tra i singoli individui, è universale e propone “una cura uguale per tutti”, usando strategie di trattamento e prevenzione sviluppate sulla meta-analisi dei dati derivati dai pazienti; la Medicina di Precisione offre una terapia ottimizzata che invece tiene conto delle caratteristiche e dell'individualità di ciascun caso/paziente. [1] Nonostante la sfida, questo approccio terapeutico è attualmente impiegato in diversi campi medici ed in particolare in Oncologia, rivoluzionando completamente la ricerca e la clinica. Ad oggi, i tipi di trattamento appartenenti alla Medicina di Precisione più utilizzati in Oncologia sono: i) la terapia farmacologica mirata, che fa uso di farmaci progettati per colpire un bersaglio specifico sulle cellule tumorali; ii) l'immunoterapia, che viene utilizzata per aiutare il sistema immunitario del paziente ad attaccare la neoplasia. Purtroppo, mentre determinati tipi di tumore hanno risposta limitata all'immunoterapia, l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici è particolarmente lenta sia a causa dell'alto tasso di fallimento sia per i costi eccessivi. [2] Pertanto, nuovi approcci terapeutici sono necessari per lotta contro il cancro.

Prendendo in considerazione quanto sopra menzionato, la mia Tesi di Dottorato è strutturata in due parti: la prima incentrata sullo studio di un possibile approccio terapeutico alternativo per il cancro del pancreas, una delle neoplasie più letali; la seconda parte, invece, sulla caratterizzazione della proteina centromerica A (CENP-A), la variante del canonico istone H3, che risulta essere pienamente coinvolta nella stabilità del genoma ed è considerata un promettente bersaglio terapeutico per la cura del cancro. [3-4]

In dettaglio, la parte I riporta i dati pubblicati in *Ragone et. al., 2022* riguardanti il trattamento combinatorio AdipoRon e Gemcitabina nell’adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC). [5] Il PDAC rappresenta quasi la totalità dei casi di tumore al pancreas e anche se l’incidenza del tumore del pancreas non è tra le più alte, la prognosi del PDAC è fatale. [3] Il tasso di sopravvivenza a 5 anni, infatti, non supera il 10% sia per la diagnosi tardiva, che avviene solitamente in fase avanzata quando il tumore è inoperabile, sia per le poche opzioni terapeutiche disponibili. [6-8] Infatti, il PDAC purtroppo mostra poca responsività alla terapia

farmacologica mirata e all'immunoterapia, che ad oggi rappresenta la strategia più innovativa e promettente nella lotta contro i tumori, a causa dell'eterogeneità genetica e del complesso microambiente tumorale, che difende il tumore dall'attacco del sistema immunitario. [9-10] Quindi, la chemioterapia costituisce l'unico approccio terapeutico marginalmente efficace e la Gemcitabina è di fatto ancora oggi il farmaco d'elezione per la cura del carcinoma pancreatico. [11] Di contro, però, il suo uso massivo ha portato ad un basso tasso di risposta e all'acquisizione di meccanismi di resistenza del tumore. [12-13]

Per le suddette ragioni, identificare nuove strategie terapeutiche per la cura del PDAC costituisce oggetto di grande interesse scientifico.

In aggiunta, AdipoRon, il primo agonista sintetico oralmente attivo dei recettori dell'adiponectina, è stato recentemente proposto come agente anticancro in molti tumori, compreso il PDAC. [14-18] Perciò, per avvalorare e supportare il suo potenziale terapeutico e proporre una nuova potenziale strategia terapeutica alternativa per il PDAC, ho investigato sulla sua interazione farmacodinamica con la Gemcitabina nelle linee cellulari umane di PDAC. [5]

Inizialmente, AdipoRon è stato testato nelle linee cellulari, MIA PaCa-2 e Panc-1, e in accordo con i dati presenti in letteratura, si è dimostrato capace di inibire la crescita cellulare e di rallentare al progressione del ciclo cellulare. Successivamente, AdipoRon e Gemcitabina sono stati combinati in tre diverse condizioni per ogni tipo cellulare, ed in ognuna, l'azione antiproliferativa è risultata essere maggiore che in risposta ai singoli trattamenti.

Per definire il tipo di interazione farmacodinamica, è stato calcolato il combination index (CI) secondo l'analisi CompuSyn. Il CI ha suggerito una potenziale sinergia tra le due molecole. Inoltre, per monitorare la capacità di queste cellule di crescere in maniera indipendente dall'ancoraggio, l'effetto della combinazione è stato testato anche sulla capacità di riduzione del potenziale clonogenico delle linee cellulari in esame. Il saggio ha dimostrato che il trattamento combinatorio presentava una maggiore efficacia anche in questi termini.

Inoltre, per cercare di comprendere come il co-trattamento esercitava una maggiore azione antiproliferativa rispetto ai singoli trattamenti, l'analisi del ciclo cellulare ha evidenziato che entrambe le molecole mantenevano le proprie peculiarità nel trattamento combinatorio. Infatti, la popolazione trattata simultaneamente con entrambi presentava caratteristiche intermedie rispetto a quelle trattate con i singoli, che erano rispettivamente l'accumulo in G₀/G₁ esercitato da AdipoRon ed il blocco della fase S causato dalla Gemcitabina. La sommatoria di questi due eventi nella popolazione trattata con la combinazione si traduceva in effetti in un maggiore rallentamento della crescita cellulare.

Esperimenti mirati alla caratterizzazione dei meccanismi d'azione alla base dell'effetto combinatorio, hanno poi messo in evidenza un coinvolgimento dei pathways delle MAPK, in particolare quello di p44/42. Evidenza supportata soprattutto dalla riduzione dell'efficacia del co-trattamento in presenza del composto PD98059, noto inibitore di MEK1/MEK2.

A sostegno dell'impiego di AdipoRon come partner ideale nella terapia combinatoria con Gemcitabina, i dati ottenuti hanno messo inoltre in risalto un'evidenza di un certo rilievo, ovvero che il co-trattamento preveniva la crescita cellulare e la formazione di colonie anche nella linea MIA PaCa-2 resa resistente alla Gemcitabina.

Complessivamente, i risultati riportati nella parte I del lavoro di Tesi forniscono prova di una maggiore efficacia di AdipoRon e Gemcitabina nel contrastare la progressione del tumore PDAC quando sono combinate e, oltre a supportare l'azione antineoplastica di AdipoRon, ne riconoscono un ulteriore nuovo uso nella terapia dell'adenocarcinoma pancreatico come potenziale partner della Gemcitabina in terapia combinata in casi di tumori resistenti e non al chemioterapico.

Infine, considerando l'attuale status orfano di questa malattia, scoprire strategie farmacologiche nuove e più efficaci potrebbe aiutare a migliorare sia la prognosi dei pazienti PDAC che la sopravvivenza. A questo proposito, i promettenti risultati ottenuti in vitro in questo studio sono incoraggianti per lo sviluppo di futuri studi supplementari volti ad affrontare la fattibilità della combinazione AdipoRon e Gemcitabina per l'approvazione nella pratica clinica.

La parte II del lavoro di Tesi, invece, riporta i risultati ottenuti a riguardo del progetto su CENP-A, di cui mi sono occupata nell'ultimo anno del mio Dottorato di Ricerca durante l'Internship con il programma Erasmus+ al Max Planck Institute of Molecular Physiology di Dortmund, in Germania, presso Dipartimento di Biologia Cellulare Meccanicistica diretto dal Prof. Dr. Andrea Musacchio.

CENP-A è la variante centromerica dell'istone H3 e svolge un ruolo cruciale nell'ereditarietà del centromero, il locus specializzato dei cromosomi che dirige l'assemblaggio del complesso proteico del cinetocore, fondamentale per la corretta trasmissione del genoma durante la divisione cellulare. [19-21] Specificamente, CENP-A interagisce in maniera selettiva con il complesso di proteine noto con il nome di "Constitutive Centromere Associated Network" (CCAN). Il CCAN costituisce la parte più interna del cinetocore, "inner kinetokore", ed è necessaria per la formazione della parte più esterna, "outer kinetokore", che rappresenta l'interfaccia per il legame con i microtubuli. Recenti lavori strutturali hanno delucidato l'organizzazione delle subunità del CCAN. [22] Come il CCAN interagisca con CENP-A, tuttavia non è noto. Dati presenti in letteratura riportano che CENP-A, similmente ad H3,

interagisce con l'istone H4 e può essere assemblato nel "classico" nucleosoma ottamerico. [23] La localizzazione dei nucleosomi di CENP-A al centromero, tuttavia, non dipende da una specifica sequenza di DNA. Piuttosto, è stato dimostrato che CENP-A viene ereditato attraverso un meccanismo epigenetico che richiede un particolare sistema composto dal suo chaperone, HJURP, e un complesso proteico, "MIS18 complex". [24]

Nelle cellule umane, la deposizione del nuovo CENP-A ad opera di HJURP e MIS18 complex avviene nella fase G1 del ciclo cellulare, ed è quindi temporalmente disaccoppiata dalla replicazione del DNA, che avviene in fase S. La quantità del nuovo CENP-A depositato in G1 è simile alla quantità del CENP-A già presente sulla cromatina, suggerendo che quest'ultimo modelli la reazione di deposizione. [25] Questo concetto è consistente con un meccanismo di natura epigenetica, in cui è il CENP-A preesistente, piuttosto che una specifica sequenza di DNA, a dirigere la deposizione sulla cromatina della nuova proteina. Questo spiega perché i livelli di CENP-A si mantengono costanti durante le successive divisioni cellulari.

I meccanismi di deposizione di CENP-A sulla cromatina non sono ben caratterizzati. Prima della nuova deposizione, è probabile che il CENP-A esistente sui cromosomi sia incorporato in un nucleosoma ottamerico contenente due molecole (protomeri) di CENP-A. Il CENP-A appena depositato fa anche parte di un nucleosoma o adotta un'organizzazione insolita? Secondo, cosa succede al CENP-A appena depositato durante la replicazione del DNA, che è temporalmente disgiunta dalla deposizione di CENP-A? Il nuovo CENP-A si mescola con il preesistente CENP-A in nuovi nucleosomi ibridi, o resta in nucleosomi distinti? Queste domande hanno implicazioni molto importanti per la comprensione delle basi molecolari dell'ereditarietà del centromero e per questo ho cercato di fare luce su di esse. Queste domande, infatti, sono di grande importanza quando si considera il ruolo cruciale di CENP-A nel garantire la corretta trasmissione del materiale genetico durante la divisione cellulare nelle cellule eucariotiche. [4;26-28] È importante capire come CENP-A svolge la sua funzione e come la sua disregolazione può causare tumorigenesi. Pertanto, il progetto ha lo scopo di studiare la composizione del nucleosoma di CENP-A prima e dopo la replicazione del DNA.

Per far luce su questo problema, è stato necessario trovare un metodo per distinguere la preesistente proteina CENP-A, già incorporata nella cromatina, dalla nuova proteina CENP-A depositata all'inizio della fase G1, identificate rispettivamente come "old CENP-A" e "new CENP-A". Questo avrebbe consentito di stabilire se i nucleosomi di CENP-A sui cromatidi fratelli dopo la replicazione del DNA sono composti da un "old CENP-A" e un "new CENP-A" (nucleosoma misto – I ipotesi), o, piuttosto, ereditati dai cromatidi fratelli come due "old"

e due "new CENP-A", rispettivamente, per ciascun cromatidio fratello (nucleosoma non-mixed - II ipotesi).

Per iniziare il progetto, il sistema CRISPR/Cas9 è stato usato per generare una linea di cellule epiteliali del pigmento retinico umano RPE-1 (hTERT RPE-1), che esprimesse la proteina CENP-A fusa ad uno SNAP, un piccolo tag che consente l'etichettatura covalente intra-cellulare con varie molecole. La decisione di utilizzare questa linea cellulare deriva dal fatto che sono geneticamente stabili, quasi diploidi, ed un modello ampiamente utilizzato per gli studi di divisione cellulare.

Per riuscire nell'obiettivo di differenziare le due forme di CENP-A, si è puntato a contrassegnare "old CENP-A" e "new CENP-A" con due distinte molecole fluorescenti. Dato che la traduzione di CENP-A avviene durante la fase G2 mentre la sua deposizione avviene nell'arco di tempo che va dalla fase telofase alla fase G1 iniziale, ed i punti oggetto di questo di studio sono prima e dopo la fase S, l'etichettatura differenziale ha richiesto lo sviluppo e la standardizzazione di un sofisticato protocollo di sincronizzazione, che avrebbe fornito un programma di etichettatura prevedibile per ulteriori esperimenti di convalida.

Tuttavia, trattandosi di cellule non trasformate, le hTERT RPE-1 sono altamente sensibili agli stress e quindi alla manipolazione del ciclo cellulare che comporta la sincronizzazione. Questa caratteristica ha complicato di molto la finalizzazione del protocollo. Le hTERT RPE-1 CENP-A SNAP risultavano altamente sensibili sia all'azione dei comuni inibitori del ciclo cellulare ma anche alla densità cellulare.

Nel dettaglio, essendo la deposizione e la produzione della proteina temporalmente separate, per riuscire nell'obiettivo di marcare in maniera differenziale le due forme di CENP-A esistenti in cellula, è necessario mantenere la sincronizzazione per due cicli cellulari consecutivi. A questo proposito, il principale ostacolo era trovare la giusta combinazione tra densità cellulare ed inibitori da utilizzare, tenendo conto non solo di individuare le concentrazioni efficaci ma anche i tempi di trattamento, le modalità di wash-out e di rilascio, che non portassero a stress cellulare e quindi ad un blocco di fase dopo la prima divisione cellulare.

L'individuazione delle giuste condizioni e la messa appunto del protocollo hanno permesso poi la convalida di un'altra parte importante del progetto, ovvero la marcatura differenziale di CENP-A e l'immunoprecipitazione della proteina marcata dal lisato cellulare. A questo proposito, sono stati analizzati diversi fluorofori, commerciali e non, per verificarne la loro efficacia nel marcare e far precipitare CENP-A-SNAP. Quest'ultimo step permette quindi di visualizzare se la fluorescenza abbinata ad ogni singolo nucleosoma di CENP-A è singola o doppia. In questo senso, l'ausilio di microscopie sofisticate ad altissima risoluzione chiarirà se

è soddisfatta la prima o la seconda ipotesi. Nel caso la I ipotesi sia soddisfatta, entrambe le fluorescenze utilizzate per la marcatura differenziale di CENP-A saranno associate ad ogni singolo nucleosoma di CENP-A precipitato; nell'ipotesi II soltanto uno dei due segnali fluorescenti sarà abbinato al nucleosoma.

Attualmente, il progetto è in fase di ultimazione e sto continuando ad occuparmene personalmente grazie alla posizione di Post-Doc che ora ricopro allo stesso Istituto di Ricerca. In conclusione, considerando come CENP-A è pienamente coinvolto nell'ereditarietà del genoma umano, si prospetta che questa scoperta sarà di rivoluzionaria importanza.

Bibliografia:

1. König IR, Fuchs O, Hansen G, von Mutius E, Kopp MV. What is precision medicine? *Eur Respir J*. 2017 Oct 19;50(4):1700391. doi: 10.1183/13993003.00391-2017.
2. Tsimberidou AM, Fountzilas E, Nikanjam M, Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treat Rev*. 2020 Jun;86:102019. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102019. Epub 2020 Mar 31.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
4. Renaud-Pageot C, Quivy JP, Lochhead M, Almouzni G. CENP-A Regulation and Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Jun 2;10:907120. doi: 10.3389/fcell.2022.907120.
5. Ragone A, Salzillo A, Spina A, Naviglio S, Sapio L. Integrating Gemcitabine-Based Therapy With AdipoRon Enhances Growth Inhibition in Human PDAC Cell Lines. *Front Pharmacol*. 2022 Feb 22;13:837503. doi: 10.3389/fphar.2022.837503.
6. Christenson ES, Jaffee E, Azad NS. Current and emerging therapies for patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: a bright future. *Lancet Oncol*. 2020 Mar;21(3):e135-e145. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30795-8.
7. Huang L, Jansen L, Balavarca Y, Molina-Montes E, Babaei M, van der Geest L, et al. Resection of pancreatic cancer in Europe and USA: an international large-scale study highlighting large variations. *Gut*. 2019 Jan;68(1):130-139. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314828.
8. Qian Y, Gong Y, Fan Z, Luo G, Huang Q, Deng S, et al. Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol*. 2020 Oct 2;13(1):130. doi: 10.1186/s13045-020-00958-3.
9. Bai RL, Wang NY, Zhao LL, Zhang YF, Cui JW. Diverse and precision therapies open new horizons for patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2022 Feb;21(1):10-24. doi: 10.1016/j.hbpd.2021.08.012.
10. Sapio L, Ragone A, Spina A, Salzillo A, Naviglio S. AdipoRon and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: a future perspective in overcoming chemotherapy-induced resistance? *Cancer Drug Resist*. 2022 Jun 21;5(3):625-636. doi: 10.20517/cdr.2022.34.
11. Oba A, Ho F, Bao QR, Al-Musawi MH, Schulick RD, Del Chiaro M. Neoadjuvant Treatment in Pancreatic Cancer. *Front Oncol*. 2020 Feb 28;10:245. doi: 10.3389/fonc.2020.00245.

12. Amrutkar M, Gladhaug IP. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers (Basel)*. 2017 Nov 16;9(11):157. doi: 10.3390/cancers9110157.
13. Fu Y, Ricciardiello F, Yang G, Qiu J, Huang H, Xiao J, et al. The Role of Mitochondria in the Chemoresistance of Pancreatic Cancer Cells. *Cells*. 2021 Feb 25;10(3):497. doi: 10.3390/cells10030497.
14. Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*. 2013 Nov 28;503(7477):493-9. doi: 10.1038/nature12656.
15. Messaggio F, Mendonsa AM, Castellanos J, Nagathihalli NS, Gorden L, Merchant NB, VanSaun MN. Adiponectin receptor agonists inhibit leptin induced pSTAT3 and in vivo pancreatic tumor growth. *Oncotarget*. 2017 Aug 3;8(49):85378-85391. doi: 10.18632/oncotarget.19905.
16. Akimoto M, Maruyama R, Kawabata Y, Tajima Y, Takenaga K. Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis. *Cell Death Dis*. 2018 Jul 23;9(8):804. doi: 10.1038/s41419-018-0851-z.
17. Sapio L, Salzillo A, Illiano M, Ragone A, Spina A, et al. Chlorogenic acid activates ERK1/2 and inhibits proliferation of osteosarcoma cells. *J Cell Physiol*. 2020 Apr;235(4):3741-3752. doi: 10.1002/jcp.29269.
18. Nigro E, Daniele A, Salzillo A, Ragone A, Naviglio S, Sapio L. AdipoRon and Other Adiponectin Receptor Agonists as Potential Candidates in Cancer Treatments. *Int J Mol Sci*. 2021 May 25;22(11):5569. doi: 10.3390/ijms22115569.
19. Bodor DL, Mata JF, Sergeev M, David AF, Salimian KJ, Panchenko T, et al. The quantitative architecture of centromeric chromatin. *Elife*. 2014 Jul 15;3:e02137. doi: 10.7554/eLife.02137.
20. Fukagawa T, Earnshaw WC. The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Dev Cell*. 2014 Sep 8;30(5):496-508. doi: 10.1016/j.devcel.2014.08.016.
21. Musacchio A, Desai A. A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function. *Biology (Basel)*. 2017 Jan 24;6(1):5. doi: 10.3390/biology6010005.
22. Pesenti ME, Raisch T, Conti D, Walstein K, Hoffmann I, Vogt D, et al. Structure of the human inner kinetochore CCAN complex and its significance for human centromere organization. *Mol Cell*. 2022 Jun 2;82(11):2113-2131.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2022.04.027.
23. Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, et al. Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature*. 2011 Jul 10;476(7359):232-5. doi: 10.1038/nature10258.
24. Pan D, Walstein K, Take A, Bier D, Kaiser N, Musacchio A. Mechanism of centromere recruitment of the CENP-A chaperone HJURP and its implications for centromere licensing. *Nat Commun*. 2019 Sep 6;10(1):4046. doi: 10.1038/s41467-019-12019-6.
25. Jansen LE, Black BE, Foltz DR, Cleveland DW. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol*. 2007 Mar 12;176(6):795-805. doi: 10.1083/jcb.200701066.
26. Barra V, Fachinetti D. The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. *Nat Commun*. 2018 Oct 18;9(1):4340. doi: 10.1038/s41467-018-06545-y.
27. Black EM, Giunta S. Repetitive Fragile Sites: Centromere Satellite DNA As a Source of Genome Instability in Human Diseases. *Genes (Basel)*. 2018 Dec 7;9(12):615. doi: 10.3390/genes9120615.

28. Mahlke MA, Nechemia-Arbely Y. Guarding the Genome: CENP-A-Chromatin in Health and Cancer. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 16;11(7):810. doi: 10.3390/genes11070810.