

SCHEDA DI SINTESI

La S-adenosil-L-metionina (AdoMet o SAM) è un nucleoside solforato ubiquitariamente presente negli organismi viventi che esplica una varietà di funzioni biologiche ben documentate. Come è noto, infatti, il composto di solfonio rappresenta il principale donatore di gruppi metilici ed è anche il precursore della S-adenosilmetionina decarbossilata, il donatore di gruppi propilamminici nella biosintesi delle poliammine. La peculiare reattività dell'AdoMet è in gran parte legata alla presenza del polo di solfonio, che rende i tre atomi di carbonio legati allo zolfo siti elettrofili suscettibili di attacco nucleofilo, per cui la molecola è estremamente reattiva ed in grado di agire da donatore del gruppo metilico, del gruppo amminopropilico e del gruppo adenosilico (1-3). In conseguenza dei molteplici e complessi ruoli dell'AdoMet alla molecola sono stati attribuiti una serie di effetti farmacologici, fra i quali l'azione antiinfiammatoria, antidepressiva, analgesica, nonché numerosi effetti nel trattamento di patologie epatiche (4-7). Nell'ultimo decennio molti studi sia *in vitro* che *in vivo* hanno evidenziato un coinvolgimento dell'AdoMet in diversi processi cellulari, tra cui la proliferazione, il differenziamento, la regolazione del ciclo cellulare e l'apoptosi in diversi sistemi tumorali (8-15). Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base dell'effetto esercitato dalla molecola non sono stati ancora del tutto chiariti.

Il mio lavoro di ricerca durante il corso di Dottorato è stato finalizzato allo studio sia del ruolo antitumorale esercitato dall'AdoMet in cellule di carcinoma della laringe, sia della regolazione dell'espressione dei microRNA in seguito al trattamento con il composto di solfonio. Al fine di valutare l'effetto antiproliferativo e i possibili meccanismi relativi all'attività antitumorale di questo importante composto fisiologico, è stata impiegata come sistema sperimentale la linea cellulare JHU-SCC-011 di tumore alla laringe, una linea cellulare molto ben caratterizzata e largamente utilizzata per ricerche biomediche *in vitro* e *in vivo* che rientra nella più ampia categoria dei tumori testa-collo. I tumori della laringe rappresentano circa il 2-5% di tutte le neoplasie maligne dell'uomo e sono, assieme al cavo orale, le più frequenti della regione testa-collo. Nonostante la facile accessibilità del distretto testa-collo, la diagnosi di tali neoplasie è molto spesso tardiva e la relativa prognosi non è migliorata negli ultimi decenni. Frequentemente, vengono combinate per il trattamento di tale classe di neoplasie chirurgia, radioterapia e chemioterapia (16-21). Il cisplatino (cDDP) è il principale farmaco usato per il trattamento di questa classe di tumori sebbene la sua applicazione clinica sia limitata dall'elevata tossicità e dallo sviluppo di meccanismi di resistenza. Dati gli effetti collaterali irreversibili legati alla somministrazione di questo chemioterapico, l'interesse della ricerca si è spostato all'individuazione di nuove molecole da associare in combinazione con il cDDP (22-24). Inizialmente sono stati condotti esperimenti di vitalità cellulare in seguito a trattamento per differenti tempi con dosi crescenti di AdoMet (da 3 μ M a 1mM). I risultati ottenuti hanno dimostrato che

l'AdoMet esercita un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare in maniera dose e tempo dipendente, inducendo alla concentrazione di 300 μ M una riduzione del 50% della vitalità cellulare dopo 72 ore. Per valutare l'effetto biologico esercitato dall'AdoMet sono stati effettuati esperimenti di analisi dei principali meccanismi di morte cellulare tra i quali il processo apoptotico, il meccanismo autofagico, e il meccanismo di stress del reticolo endoplasmatico (ER-stress). In particolare, l'analisi citofluorimetrica ha evidenziato che l'AdoMet alla dose di 300 μ M è in grado di indurre il 4% e il 19% di apoptosi rispettivamente dopo 48 e 72 ore dal trattamento. L'attivazione del processo apoptotico è stato anche confermato dall'aumento del rapporto pro-apoptotico Bax/Bcl2 e dalla riduzione nei livelli della pro-caspasi iniziatrice 9, delle pro-caspasi effettrici 6 e 7 e della poli (ADP ribosio) polimerasi (PARP), i cui livelli di espressione sono stati valutati mediante Western blotting. L'analisi del processo autofagico è stata valutata mediante marcatura cellulare con lysotracker red, un composto che lega ed evidenzia le vescicole cellulari a pH acido, come le vescicole autofagolisomiche. L'aumento dell'intensità di fluorescenza media nei campioni trattati alla concentrazione di 200 e 300 μ M AdoMet dopo 24 e 48 ore è risultata maggiore rispetto ai controlli, fornendo così una prima indicazione che AdoMet è in grado di innescare l'attivazione del processo autofagico. Tale risultato è accompagnato dall'aumento dei livelli del principale marcatore autofagico "microtubule-associated protein light chain 3B" (LC3II). Inoltre, nella linea cellulare JHU-SCC-011 è stata valutata la capacità dell'AdoMet di indurre ER-stress. A tale scopo le cellule trattate con 200 e 300 μ M AdoMet per 48 e 72 ore e marcate con ER-Tracker, un colorante vitale che si accumula nel reticolo endoplasmatico, sono state analizzate mediante microscopia a fluorescenza. L'AdoMet aumenta notevolmente la fluorescenza delle cellule JHU-SCC-011 rispetto alle cellule non trattate e causa un cambiamento morfologico del reticolo endoplasmatico, dato ascrivibile all'attivazione dell'ER-stress. L'attivazione dei marcatori coinvolti nel meccanismo di ER-stress è stata valutata tramite qRT-PCR e Western blotting. I dati ottenuti mostravano un incremento trascrizionale dell'isoforma di splicing del gene XBP1 (sXBP1) ed un aumento trascrizionale e traduzionale della proteina CHOP, principale mediatore del processo apoptotico attivato dall'ER-stress. Nella linea cellulare JHU-SCC-011, inoltre, è stato dimostrato che il trattamento con AdoMet induceva l'incremento del rapporto pERK/ERK, pJNK/JNK e p38/P38, proteine appartenenti alla famiglia delle proteine chinasi attivate dai mitogeni (MAPK). Uno studio approfondito della letteratura ha evidenziato una correlazione tra l'attivazione dell'apoptosi mediata dall'ER-stress e l'aumento dell'espressione delle MAPK, identificando l'ER-stress come il possibile meccanismo mediante il quale l'AdoMet innesca l'apoptosi. L'attività anti-proliferativa e pro-apoptotica dell'AdoMet, unitamente al fatto che esso rappresenta un composto naturale la cui somministrazione non induce effetti collaterali, ci ha portati ad approfondire un possibile uso del composto di solfonio in sinergia

con chemioterapici già impiegati per la terapia dei tumori testa-collo. È stato valutato, quindi, il possibile effetto sinergico dell'AdoMet con il cDDP. La combinazione delle due molecole è risultata fortemente sinergica, quando i due farmaci sono stati usati a concentrazioni di 200 μ M AdoMet e 0,18 μ M cDDP. L'analisi al FACS ha mostrato un incremento dell'apoptosi in seguito alla somministrazione dei due farmaci confermata dall'analisi mediante Western blotting che ha evidenziato un decremento evidente delle pro-caspasi 9 e 6 e della proteina PARP, ed un aumento del rapporto Bax/Bcl2, pERK/ERK1/2 e pJNK/JNK. Complessivamente questi dati indicano che l'effetto pro-apoptotico dell'AdoMet potrebbe essere mediato dall'attivazione dell'ER-stress e che il suo utilizzo in combinazione con cDDP potrebbe indurre un miglioramento nell'approccio farmacologico al trattamento del carcinoma della laringe, associando all'efficacia terapeutica una minore tossicità del farmaco.

Recentemente una nuova classe di molecole di RNA non codificanti, noti come microRNA (miRNA), è stata associata a diverse malattie umane incluso il tumore della laringe (25-27). Nella seconda parte della tesi è stato studiato il profilo di espressione dei miRNA in cellule JHU-SCC-011 in seguito al trattamento con 300 μ M AdoMet per 72 ore, al fine di individuare il coinvolgimento diretto dei miRNA sull'inibizione della proliferazione cellulare esercitata dal composto di solfonio. L'analisi effettuata mediante la tecnica dei microarray ha evidenziato un gruppo di miRNA sensibilmente regolati dall'AdoMet, quali: miR-187, miR-487b, miR-615-5p, miR618 e miR-888-5p. Tra questi, il miR-888-5p è risultato significativamente down-regolato e tale dato è stato confermato mediante Real-Time PCR quantitativa (qRT-PCR). Per questo motivo si è scelto di proseguire gli studi con il miR-888-5p e trasfettare le cellule di carcinoma della laringe JHU-SCC-011 rispettivamente con miR-888-5p "mimic" ed "inhibitor", da soli, o con aggiunta di 300 μ M AdoMet, per 72 ore. I miRNA "mimic" sono 9 piccole molecole di RNA a doppio filamento chimicamente modificate che mimano i miRNA endogeni e ne consentono l'analisi funzionale mediante l'up-regolazione dell'attività biologica. Viceversa, i miRNA "inhibitor" sono in grado di legare specificamente e inibire molecole endogene di microRNA e consentirne l'analisi funzionale mediante la riduzione dell'attività biologica. I dati ottenuti mostrano che il miR-888-5p inhibitor da solo è in grado di indurre l'attivazione del processo apoptotico, effetto ulteriormente potenziato dal trattamento combinato con l'AdoMet. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi dei principali marcatori apoptotici, quali le pro-caspasi 9, 7 e 8 e della proteina PARP, i cui livelli di espressione risultano essere down-regolati dalla combinazione AdoMet e miRNA inhibitor.

Complessivamente questi dati contribuiscono alla comprensione del meccanismo d'azione esercitato dall'AdoMet nelle cellule di carcinoma alla laringe JHU-SCC-011, evidenziando il possibile coinvolgimento del miR-888-5p nell'inibizione dell'attivazione del processo apoptotico.

In conclusione, l'insieme di dati ottenuti durante la mia attività di tesi, suggeriscono che l'attività anti-proliferativa e pro-apoptotica dell'AdoMet, unitamente al fatto che tale molecola rappresenta un composto naturale la cui somministrazione non induce effetti collaterali, potrebbe essere sfruttata per la messa a punto di una nuova e meglio tollerata terapia antitumorale.

Referenze

1. Salvatore, F., Borek, E., Zappia, V., Williams-Ashman, H.G., Schlenk, F. (1977) In the Biochemistry of Adenosylmethionine. Columbia University Press, pp. 1-588.
2. Lu, S.C. (2000) S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 32: 391-395.
3. Fontecave, M., Atta, M., Mulliez, E. (2004) S-Adenosylmethionine: Nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences*, 29: 243–249.
4. Papakostas, G. I., Cassiello, C. F., and Iovieno, N. (2012) Folates and Sadenosylmethionine for major depressive disorder. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne de Psychiatrie*, 57: 406–413.
5. Soeken, K. L., Lee, W. L., Bausell, R. B., Agelli, M., and Berman, B. M. (2012) Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAME) for osteoarthritis. *Journal Farmacia Practice*, 51: 425–430.
6. Anstee, Q. M., and Day, C. P. (2012) S-Adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. *Journal of Hepatology*, 57: 1097– 1109.
7. Mato, J., Martínez-López, N., Lu, SC.(2013) S-Adenosylmethionine metabolism and liver disease. *Ann Hepatol.*, 12 (2): 183-189.
8. Martínez-López, N., Varela-Rey, M., Ariz, U., Embade, N., Vazquez-Chantada, M., Fernandez-Ramos, D., Gomez-Santos, L., Lu, SC., Mato, JM., Martinez-Chantar, ML. (2008) S-Adenosylmethionine and proliferation: new pathways, new targets. *Biochem. Soc. Trans.*, 36: 848-852.
9. Li, T.W., Peng, H., Yang, H., Kurniawidjaja. S., Panthaki, P., Zheng, Y., Mato, J.M., Lu, S.C. (2015) S-Adenosylmethionine and methylthioadenosine inhibit β -catenin signaling by multiple mechanisms in liver and colon cancer. *Mol. Pharmacol.*, 87(1): 77-86.
10. Zhao Y., Li J.S., Guo M.Z., Feng B.S., Zhang J.P. (2010) Inhibitory effect of Sadenosylmethionine on the growth of human gastric cancer cells in vivo and in vitro. *Chin. J. Cancer.*, 29: 752-760.
11. Luo J., Li Y.N., Wang F., Zhang W.M., Geng X. (2010) S-Adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer. *Int. J. Biol. Sci.*, 6: 784-795.
12. Li T.W., Zhang Q., Oh P., Xia M., Chen H., Berman S., et al. (2009) SAdenosylmethionine and methylthioadenosine inhibit cellular FLICE inhibitory protein expression and induce apoptosis in colon cancer cells. *Mol. Pharmacol.*, 76: 192-200.
13. Parashar S., Cheishvili D., Arakelian A., Hussain Z., Tanvir I., Khan H.A. (2015) SAdenosylmethionine blocks osteosarcoma cells proliferation and invasion in vitro and tumor metastasis in vivo: therapeutic and diagnostic clinical applications. *CancerMed.*, 4: 732-744.

14. Ilisso C.P., Castellano M., Zappavigna S., Lombardi A., Vitale G., Dicitore A., et al. (2015) The methyl donor S-adenosylmethionine potentiates doxorubicin effects on apoptosis of hormone-dependent breast cancer cell lines. *Endocrine*, 50: 212-222.
15. Cave D.D., Ilisso C.P., Mosca L., Pagano M., Martino E., Porcelli M., Cacciapuoti G. (2017) The Anticancer Effects of S-Adenosylmethionine on Breast Cancer Cells. *JSM Chemistry*, 2333-6633
16. Chin, D., Boyle, G.M., Porceddu, S., Theile, D.R., Parsons, P.G., & Coman, W.B. (2006). Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Review Anticancer Therapy*, 6(7): 1111-1118.
17. Cognetti MD, Weber R.S., Lai S.Y. (2008) Head and Neck Cancer: An Evolving Treatment Paradigm. *Cancer*, 1911-32.
18. Cattaruzza M.S., Maisonneuve P., Boyle P. (1996) Epidemiology of laryngeal cancer. *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.*, (5):293-305.
19. Mastronikolis N.S., Papadas T.A., Goumas, P.D., Triantaphyllidou I.E., Theocharis D.A., Papageorgakopoulou, N., Vynios D.H. (2009) Head and neck: Laryngeal tumors: An overview. *Atlas. Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, 13, 888-893.
20. Conor E., Steuer M.D., Mark El-Deiry M.D., Jason R., Parks M.D., Kristin A., Higgins M.D., Nabil F., Saba M. (2017) An update on larynx cancer. *C.A. Cancer J. Clin.*, 67:31-50.
21. Cossu A.M., Mosca L., Zappavigna S., Misso G., Bocchetti M., De Micco F., Quagliuolo L., Porcelli M., Caraglia M., Boccellino M. (2019) Long Non-coding RNAs as Important Biomarkers in Laryngeal Cancer and Other Head and Neck Tumours. *Int J Mol. Sci.*, 20(14) : 3444.
22. Dasari, S. & Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 5: 364-378.
23. Cognetti M.D., Weber R.S., Lai S.Y. (2008). Head and Neck Cancer: An Evolving Treatment Paradigm. *Cancer*, 1911-32.
24. Dasari S., Tchounwou P.B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 5: 364-378.
25. Shuibin L., Richard I.G.; (2015) MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, pg 321–333
26. Felekis K., Touvana E., Stefanou C., Deltas C. (2010) MicroRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*, 14(4): 236-240.
27. Xin Y., Zheng L. (2015) The role of MicroRNAs expression in laryngeal cancer. *Oncotarget.*; 15; 6(27): 23297–23305.