

## MODELLO PER INVIO RELAZIONE DI METÀ E FINE PERIODO

**NOME E COGNOME:** Elena Catanzaro

**UNIVERSITÀ:** Università degli Studi di Bologna – Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita- Campus di Rimini

**DIPARTIMENTO (in caso di borsa per soggiorno all'estero specificare l'ente presso cui si è svolta la**

**ricerca):** Laboratory of Cell Death Research and Therapy, Department of Cellular and Molecular Medicine, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium

**TUTOR (in caso di borsa per soggiorno all'estero specificare il tutor dell'ente presso cui si è svolta la**

**ricerca):** Prof.ssa Patrizia Agostinis

**TIPOLOGIA DI BORSA RICEVUTA:** Borsa per soggiorno all'estero

**TIPOLOGIA DI RELAZIONE (es.: metà periodo o finale):** Periodo finale

**TITOLO DELLA RELAZIONE:** Studio preclinico *in vitro* di composti sintetici come induttori di morte cellulare immunogenica

### **RELAZIONE:**

Le neoplasie maligne rappresentano una delle principali cause di morte a livello mondiale. Nonostante i miglioramenti delle competenze diagnostiche, le strategie preventive e il controllo dei fattori di rischio abbiano portato nel loro insieme ad una diminuzione della mortalità da cancro (WHO, 2015), non esistono ancora strategie terapeutiche completamente efficaci. Da tempo, la ricerca si è interessata all'attività antitumorale di sostanze di origine naturale. Ad esempio, gli isotiocianati (ITC), una classe di molecole riccamente presente sotto forma di precursori in molte specie della famiglia delle brassicacee, quali i broccoli, hanno mostrato interessanti attività biologiche, validate attraverso studi *in vitro*, *in vivo* e studi clinici. Il più studiato tra gli ITC è il sulforafane, il quale è in grado di modulare il ciclo cellulare, indurre apoptosi, produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS), potenziare l'attività citotossica di alcuni farmaci antitumorali, interferire nei punti chiave del processo di neovascolarizzazione e inibire il potenziale metastatico delle cellule tumorali (Fimognari e Hrelia, 2007).

Un'interessante strategia per l'eradicazione tumorale è quella che associa ad un massiccio danno alle cellule tumorali un riconoscimento di queste da parte del sistema immunitario. In questo contesto, si

inserisce una recente area di ricerca indirizzata ad esplorare nuove strategie in grado di indurre morte cellulare immunogenica (ICD), un particolare tipo di morte cellulare che si differenzia dalla via classica per la capacità di stimolare il sistema immunitario e indurre un effetto paragonabile a quello di un vaccino antitumorale basato su cellule dendritiche (DC) (Caseres e coll., 2005). L'induzione della ICD risiede nella capacità di un composto di produrre stress a livello del reticolo endoplasmatico (ER) concertatamente al rilascio di ROS. Entrambi i processi sono essenziali per innescare la cascata di segnalazione intracellulare del pericolo che governa la ICD, tuttavia l'immunogenicità risulta più efficace se promossa da stress a livello del ER causato direttamente dall'alterazione dell'equilibrio ossidativo. Sono state, infatti, recentemente delineate due classi di induttori di ICD, a seconda della relazione dei due avvenimenti. Gli induttori di classe I, quale la terapia fotodinamica basata sull'ipericina, i quali agiscono producendo ROS che causano stress a livello del ER, e gli induttori di classe II, quali mitoxantrone e oxaliplatino, capaci di indurre stress attraverso vie alternative, ma avendo comunque la capacità di alterare l'equilibrio redox delle cellule (Krysko e coll, 2012). Queste combinazioni di eventi attivano, ad ogni modo, un percorso di segnalazione del pericolo che favorisce l'esposizione sulla membrana esterna o il rilascio di DAMP (damage-associated molecular patterns) nello spazio extracellulare (Krysko e coll., 2012). I DAMP, quali la calreticulina (CRT), le heat shock protein 70 e 90 (HSP-70 e 90), l'adenosintrifosfato (ATP) e la high mobility group 1 (HMGB-1), sono molecole normalmente presenti all'interno di cellule vive, che acquisiscono proprietà immunostimolanti in caso di esposizione o secrezione da parte di cellule danneggiate/morenti. Queste molecole hanno la capacità di esercitare vari effetti sulle cellule presentanti l'antigene, come le DC, quali maturazione, attivazione ed elaborazione/presentazione dell'antigene (Seong e Matzinger, 2004).

Durante la mia permanenza nei laboratori di Cell Death Research and Therapy, Department of Cellular and Molecular Medicine, Katholieke Universiteit Leuven diretti dalla Prof.ssa Agostinis, la mia attività di ricerca si è rivolta al delineamento del profilo farmacologico e alla valutazione della capacità di indurre stress del ER e stress ossidativo da parte di MG28 e MG46. I composti MG28 e MG46 sono stati forniti dal dott. Andrea Milelli del Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita dell'*Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna e sono costituiti da un gruppo funzionale isotiocianato legato ad una catena laterale sintetizzata allo scopo di direzionare il gruppo funzionale specificatamente al ER (Meinig e coll, 2015). Queste due molecole differiscono tra loro per il numero di atomi di carbonio e la presenza di un ossigeno nella catena laterale, il cui scopo è quello di rendere più attiva la molecola favorendo la rottura del legame tra l'isotiociano e la catena laterale stessa, ossia favorendo la liberazione della parte attiva. La sperimentazione è stata svolta su una linea cellulare di tumore della cervice uterina (HeLa) e su una linea cellulare murina di tumore del colon-retto (CT-26). In particolare, l'intento dell'utilizzo della linea cellulare murina è stata quella di rendere possibile un'eventuale traslazione dei risultati ottenuti *in vitro* su topi singenici.

Per prima cosa è stata indagata la capacità di MG28 e MG46 di raggiungere il ER su una linea cellulare di tumore della cervice uterina (HeLa). MG28 e MG46 sono entrambe dotate di fluorescenza propria, con i due principali picchi di assorbimento che cadono a 458 e 485 nm e la cui emissione copre tutte le lunghezze d'onda a partire da 500 nm fino a circa 650 nm. In questa prima fase della ricerca, questa proprietà è stata sfruttata per valutare la localizzazione delle molecole stesse all'interno della cellula. Le cellule HeLa sono state, quindi, trasfettate con CellLight® ER-RFP per permettere la localizzazione del ER e trattate con una concentrazione sub-tossica di MG28. Come auspicato, a partire da 1 h di trattamento fino a 24 h, MG28 raggiunge e si localizza nel ER, anche se in maniera non selettiva.

La ricerca è proseguita valutando il profilo farmacologico di MG28 e MG46 sulla linea cellulare murina. Per prima cosa è stato valutato il potenziale citotossico e proapoptotico delle due molecole. In seguito a 24 h di trattamento, MG28 e MG46 risultano avere un IC<sub>50</sub> (concentrazione che inibisce la vitalità cellulare del 50%) pari a 7,80 e 10,54 µM, rispettivamente. L'ampio spettro di emissione delle due molecole ha reso impossibile valutare la capacità di indurre apoptosi attraverso via citofluorimetrica e si è quindi optato per valutare la capacità di MG28 e MG46 di alterare l'espressione delle proteine maggiormente coinvolte nel processo apoptotico tramite western blot. È stata analizzata l'espressione di PARP e della caspasi 3, nelle loro forme intere e clivate, in quanto marker specifici del processo di morte cellulare programmata. Sia MG28 che MG46 hanno indotto l'espressione di entrambe le proteine e, in accordo con i risultati dell'analisi citotossica, MG28 è capace di indurre cleavage di entrambe le proteine ad una concentrazione più bassa rispetto a MG46.

Lo studio si è poi indirizzato alla valutazione della capacità di MG28 e MG46 di generare gli eventi chiave per innescare la ICD: l'induzione di stress ossidativo e del ER. In prima istanza, è stata valutata la capacità di MG28 e MG46 di aumentare i livelli di ROS intracellulari. Anche in questo caso, l'autofluorescenza dei composti ha impedito di avvalersi dei più comuni reagenti utilizzati per la valutazione spettrofotometrica o citofluorimetrica dei livelli di ROS. Di conseguenza, la capacità di MG28 e MG46 di alterare l'equilibrio ossidativo è stata valutata per via indiretta, ossia ne è stato analizzato il potenziale citotossico in seguito a pre-trattamento e co-trattamento con l'antiossidante N-acetilcisteina (NAC). Per entrambe le molecole, si è registrato un decremento significativo del numero di cellule morte in seguito a pre- e co-trattamento con il NAC rispetto all'azione della singola molecola, MG28 o MG46, lasciando presumere che i ROS svolgano un ruolo chiave nel meccanismo d'azione delle due molecole di interesse. In seguito, è stata valutata la capacità di MG28 e MG46 di indurre stress a livello del ER attraverso la valutazione dell'espressione di alcuni dei più importanti sensori di stress legati alla risposta a proteine malpiegate (UPR), quali la Binding Immunoglobulin Protein (Bip), la Pancreatic ER Kinase (PERK) e i suoi effettori eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) e C/EBP homologous protein (CHOP). I risultati ottenuti sono contrastanti e non hanno prodotto alcuna evidenza certa di stress al ER e, nonostante l'analisi morfologica

delle cellule HeLa trattate con MG28 e MG46 avvalorò l'ipotesi della loro capacità di indurre stress a livello del ER, ulteriori studi sono necessari per confermare i dati ottenuti.

Infine, per valutare l'effettiva capacità di MG28 e MG46 di indurre ICD, è stato analizzato il rilascio di ATP nello spazio extracellulare, come DAMP, ossia effettore della morte cellulare immunogenica. Entrambe le molecole, già a partire da un 1 h di trattamento, a concentrazioni simili o pari all' $IC_{50}$ , sono state in grado di indurre un significativo rilascio extracellulare di ATP, valutato attraverso analisi in luminescenza.

I promettenti risultati ottenuti durante il mio soggiorno estero mettono, dunque, in evidenza un interessante profilo farmacologico per le molecole MG28 e MG46 e pongono le basi per l'approfondimento dei meccanismi di azione coinvolti nella loro attività nonché la conferma della capacità di indurre morte cellulare immunogenica. La funzionalizzazione di composti naturali attivi con trasportatori per il ER rappresenta, quindi, una promettente strategia farmacologica in area oncologica, che potrebbe consentire un miglioramento della risposta terapeutica attraverso il coinvolgimento del sistema immunitario.

Fimognari e Hrelia (2007). *Mutat Res.* 635, 90-104.

Krysko et al. (2012). *Nat Rev Cancer.* 12, 860-875.

Meinig et al. (2015). *Angew Chem Int Ed* 54. 33, 9696-9699.

Seong e Matzinger (2004), *Nat Rev Immunol.* 4, 469-478