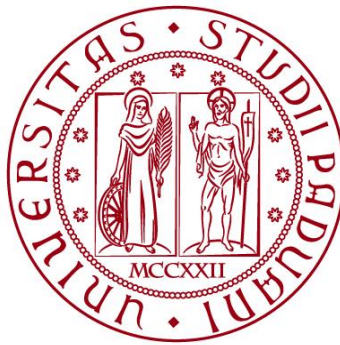


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**Studio di agenti farmacologici e fattori
ambientali che regolano la frammentazione
mitocondriale in cellule pancreatiche: impatto
sulla carcinogenesi**

**Relatore: Prof. Gianluca Occhi
Dipartimento di Biologia**

Correlatore: Dott. Alessandro Carrer

Laureanda: Arianna Picco

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT.....	1
INTRODUZIONE	
1. Il pancreas.....	3
2. Adenocarcinoma pancreatico duttale	
2.1 Epidemiologia.....	4
2.2 Fattori di rischio: il fumo di sigaretta.....	5
2.3 Origine e caratteristiche.....	5
2.4 Basi genetiche e molecolari di PDAC.....	8
2.5 Alterazioni metaboliche in PDAC.....	10
2.6 Alterazioni epigenetiche in PDAC	13
3. I mitocondri	
3.1 Caratteristiche e funzioni	14
3.2 Mitocondri e cancro.....	18
4. Dinamiche mitocondriali.....	19
4.1 Fusione mitocondriale.....	21
4.2 Fissione mitocondriale.....	22
4.3 Fissione mitocondriale e cancro al pancreas.....	23
OBIETTIVO DELL'ELABORATO.....	26
MATERIALI E METODI	
1. Animali e linee cellulari.....	29
2. Estrazione di acini pancreatici.....	29
3. Valutazione dell'ADM.....	30
4. Respirimetria ad alta risoluzione: Oroboros O2k.....	30
5. Misurazione del colesterolo intracellulare.....	31
6. Dosaggio delle specie reattive dell'ossigeno	32
7. Quantificazione del lattato.....	32
8. Estrazione delle proteine	33
9. Estrazione degli istoni.....	33

10. Western Blot.....	34
11. Immunofluorescenza.....	35
12. Analisi statistiche.....	36

RISULTATI

1. Mdivi-1

1.1 Inibizione della frammentazione mitocondriale.....	37
1.2 Mdivi-1 inibisce l'ADM e la proliferazione cellulare.....	38
1.3 Valutazione dell'acetilazione istonica e della sintesi degli steroli.....	40
1.4 Effetti su fosforilazione ossidativa e glicolisi.....	43
1.5 L'acetato come fonte alternativa di acetil-CoA.....	45

2. Cotinina

2.1 La cotinina stimola la proliferazione cellulare.....	47
2.2 <i>Signaling</i> recettoriale: ERK e AKT non sono attivati.....	48
2.3 La cotinina non promuove la frammentazione mitocondriale.....	49
2.4 La fosforilazione ossidativa rimane invariata.....	51
2.5 La cotinina aumenta la produzione di ROS.....	52

DISCUSSIONE.....	54
-------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA.....	62
--------------------------	-----------

ABSTRACT

L'adenocarcinoma pancreatico duttale, o PDAC, è la neoplasia pancreatica maligna più diffusa. La tumorigenesi è determinata nella quasi totalità di casi da mutazioni attivanti di *KRAS*, il cui prodotto oncogenico stimola indirettamente la frammentazione mitocondriale tramite reclutamento della proteina DRP1: ciò risulta necessario per determinare la carcinogenesi. L'induzione di DRP1 è essenziale per la trasformazione in senso neoplastico mediata da *KRAS* mutato.

In questo elaborato è stato quindi valutato l'effetto dell'inibitore della fissione mitocondriale Mdivi-1 sulle fasi di inizio e crescita di PDAC, ponendo particolare attenzione a cambiamenti metabolici, epigenetici e di *signaling* cellulare causati dall'alterazione farmacologica delle dinamiche mitocondriali: si è notato che un *network* mitocondriale frammentato promuove l'ossidazione del piruvato e aumenta la produzione di acetile-CoA disponibile per modificazioni post-traslazionali, incluso a carico di proteine istoniche, funzionali allo sviluppo dell'adenocarcinoma.

Inoltre, considerato che il fumo di sigaretta è il maggior fattore di rischio per lo sviluppo di PDAC, è stata studiata *in vitro* l'azione pro-tumorale del metabolita nicotinico cotinina, investigando i suoi eventuali effetti sulla rete mitocondriale delle cellule pancreatiche e vagliando potenziali meccanismi alternativi con cui essa potrebbe contribuire alla crescita tumorale. Sebbene sia emerso che la cotinina non influisce direttamente su dinamiche mitocondriali e respirazione cellulare, è risultato evidente che contribuisce significativamente all'espansione di PDAC attraverso altre vie di segnalazione.

INTRODUZIONE

1. IL PANCREAS

Il pancreas è una delle ghiandole di maggiori dimensioni tra quelle annesse all'apparato digerente: esso si estende dall'ansa duodenale (con una porzione più spessa detta testa), passando dietro allo stomaco, per terminare a livello dell'ilo della milza (dove si trova la coda della ghiandola).^[1] (Fig.1)

Il pancreas è funzionalmente suddiviso in una porzione esocrina e una endocrina: quest'ultima è costituita dalle isole di Langerhans, gruppi di cellule sparse in tutto il parenchima ghiandolare che producono ormoni quali insulina, glucagone e somatostatina, i quali partecipano all'omeostasi sistemica del glucosio e al controllo della motilità e della funzionalità del tratto gastrointestinale superiore.

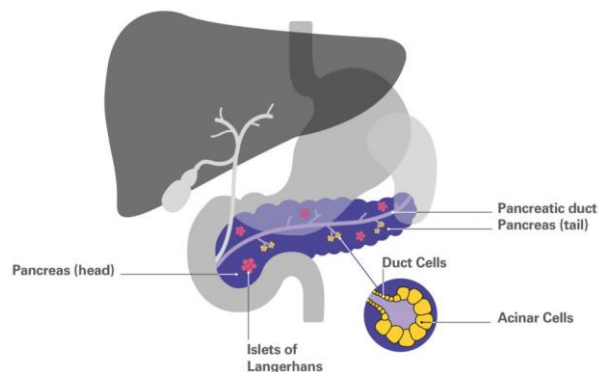


Fig.1 Localizzazione e anatomia del pancreas

La maggior parte del tessuto pancreatico, tuttavia, è di natura esocrina, e si organizza in una struttura tubuloacinosa, organizzata e suddivisa parzialmente in lobuli tramite un sottile strato di connettivo lasso: le unità secretorie del pancreas sono dette acini, costituiti da raggruppamenti approssimativamente sferici di cellule a morfologia piramidale, dette acinose (ACs). Esse sono cellule epiteliali post-mitotiche polarizzate, con un compartimento basale caratterizzato da abbondante reticolo endoplasmatico rugoso e una regione apicale in cui spicca la presenza di numerosi granuli eosinofili di zimogeno: le cellule acinose vengono stimulate a secernere enzimi digestivi, i quali vengono riversati in un sistema di

dotti di calibro sempre maggiore, che confluiscono nel dotto pancreatico principale (o in quello accessorio).

Le cellule epiteliali che compongono il pancreas, siano esse acinose, duttali o endocrine, mantengono anche dopo lo sviluppo un elevato grado di plasticità e possono andare incontro a transdifferenziazione: tale caratteristica ha importanti conseguenze fisiopatologiche.^[2]

2. ADENOCARCINOMA PANCREATICO DUTTALE

2.1 Epidemiologia

Il pancreas può essere interessato da diversi tipi di tumori, che si distinguono in esocrini (93%) ed endocrini (7%) a seconda delle cellule da cui originano.

Tra i primi spicca l'adenocarcinoma pancreatico duttale (PDAC), la neoplasia pancreatica maligna più diffusa: sebbene affligga una percentuale relativamente ridotta della popolazione generale, è previsto che per il 2030 esso diventi la seconda causa più comune di morte per tumore. Ciò è dovuto al continuo aumento del tasso di incidenza di PDAC, che si accompagna d'altra parte a un tasso di sopravvivenza a 5 anni che rimane estremamente basso - al 9%.^[3]

Secondo una ricerca del Global Cancer Observatory, nel 2019 si sono registrati 458.918 nuovi casi di PDAC a livello mondiale, con tassi di mortalità che si avvicinano a quelli di incidenza per il basso tasso di sopravvivenza associato a questo tumore.

L'aumentata incidenza è riconducibile a una maggiore diffusione dei fattori di rischio per l'insorgenza di cancro al pancreas: tra questi, i più importanti sono il fumo di tabacco, l'obesità e un'alimentazione scorretta. Per PDAC, inoltre, è molto difficile una diagnosi precoce, in quanto mancano biomarcatori specifici per l'identificazione delle fasi iniziali della neoplasia, che in aggiunta rimane asintomatica fino alle ultime fasi della sua progressione: astenia, perdita di peso, dolore addominale e coluria (presenza di pigmenti biliari nelle urine) si manifestano infatti quando PDAC è in stadio avanzato e/o metastatico, ovvero a distanza di anni dalla sua insorgenza.^[4] La diagnosi tardiva rende poco efficaci le

tradizionali terapie, quali radiazioni, farmaci chemioterapici e rimozione chirurgica della massa tumorale, tanto che meno del 20% dei pazienti è ancora in vita a un anno di distanza dall'intervento.^[5] PDAC è inoltre notoriamente refrattario anche a terapie più innovative, come l'immunoterapia mediante cellule T ingegnerizzate (CAR-T) o inibitori dei checkpoint immunologici.

2.2 Fattori di rischio: il fumo di sigaretta

Come accennato, tra i fattori di rischio per l'insorgenza di PDAC si distingue il fumo di sigaretta, il fattore ambientale che più predispone all'adenocarcinoma pancreatico duttale, tanto che il 25% dei casi di PDAC è attribuibile ad esso.^[6]

Tuttavia, i meccanismi molecolari che correlano il fumo alla progressione del cancro al pancreas non sono ancora del tutto noti ed è necessario studiarli più a fondo per migliorare la prevenzione e la diagnosi di PDAC.^[7]

Il fumo di sigaretta contiene più di 7000 componenti, 70 dei quali hanno attività tumorigenica nota: la maggior parte di queste sostanze sono specie chimiche mutagene che legano il DNA, formando addotti che aumentano la probabilità di introdurre errori nel materiale genetico durante la sua replicazione. Occorre tenere in considerazione, però, il fatto che molti di questi composti giungono in quantità minime al pancreas, in quanto svolgono la loro attività cancerogena soprattutto a livello delle vie aeree e delle aree immediatamente circostanti. In aggiunta, PDAC ha un carico mutazionale relativamente basso, perciò è plausibile che l'azione tumorigenica del fumo di sigaretta sia slegata dalla sua attività mutagena/cancerogena. A tal proposito, uno studio che confronta le mutazioni accumulate nel pancreas da fumatori e non fumatori conferma infatti che non ci sono particolari differenze tra le due coorti, e che le mutazioni osservate nel primo gruppo non si trovano in geni associati con lo sviluppo di PDAC.^[8]

2.3 Origine e caratteristiche

L'adenocarcinoma pancreatico duttale origina solitamente dalla testa della ghiandola e porta ad una massiccia riorganizzazione strutturale del parenchima, con deposizione di abbondante tessuto connettivo e sovraespressione di componenti simil-duttali. I tumori PDAC sono altamente eterogenei, sia a livello

istologico che molecolare: in base ai differenti profili genetici, epigenetici, trascrizionali e metabolici di diversi PDAC, sono stati individuati vari sottotipi di questo tumore. Essi sono stati raggruppati in due categorie, che distinguono i tipi “canonici” e “non canonici”: i primi presentano l’espressione di marcatori di cellule duttali pancreatiche e sono regolati da GATA6, mentre i secondi hanno fenotipo simil-basale, sono guidati da $\Delta Np63$ e sono associati a una prognosi peggiore. ^[9]

L’ipotesi più accreditata al momento è che questi due sottotipi originino da tipi cellulari diversi facenti parte del pancreas esocrino: si ritiene che i tumori “canonici” derivino dalle cellule acinose, mentre quelli “non canonici” dalle cellule duttali, entrambe soggette a dedifferenziazione e/o transdifferenziazione in risposta a diversi stimoli, quali il signaling di RAS, fenomeni infiammatori e l’attivazione di TGF β (fattore di crescita trasformante β).

Difatti, i tumori canonici derivano dalle cellule acinose che vanno incontro a fenomeni metaplastici, dove per metaplasia si intende la sostituzione di un tipo cellulare differenziato con un altro, nello stesso tessuto. Si parla in questo caso di metaplasia acino-duttale (ADM), in quanto le cellule iniziano ad esprimere fattori di trascrizione duttali (HNF1B e SOX9), citocheratine specifiche (tra cui KRT19) e marcatori di funzionalità duttale come CAII e CFTR, coinvolti nella secrezione di bicarbonato, mentre perdono l’espressione di fattori che caratterizzano il fenotipo secretorio, come PTF1A, MIST1 e NR5A2.

Tali cellule possono quindi andare incontro a trasformazione neoplastica, favorita dal *signaling* oncongenico (KRAS) o infiammatorio: esse possono generare lesioni istologiche ben definite chiamate PanIN (neoplasie intraepiteliali pancreatiche), classificate in lesioni di basso grado (PanIN1 e PanIN2) e di alto grado (PanIN3) in base al loro differente livello di atipia strutturale e citologica e al diverso potenziale tumorigenico.

Il PDAC “canonico” si evolve da queste ultime con un processo a più stadi, a partire dalla formazione di un carcinoma *in situ* che eventualmente può sfociare in un tumore metastatico. ^[10] (Fig.2)

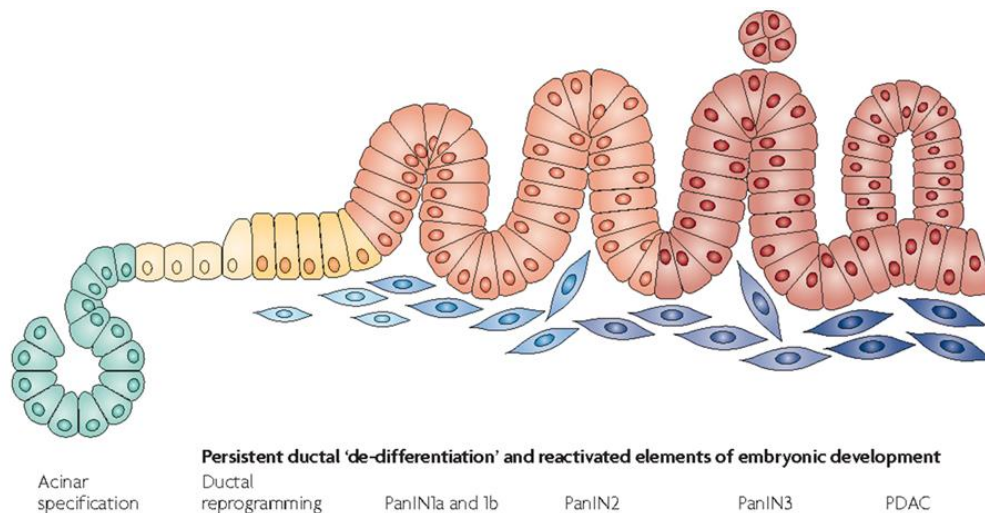


Fig.2. Modello esemplificativo della tumorigenesi pancreatica “canonica”

Per quel che riguarda invece il PDAC “non canonico”, l’origine è da ricercarsi nelle cellule duttali, che tuttavia appaiono maggiormente refrattarie alla trasformazione neoplastica, in quanto questa sembrerebbe richiedere multiple mutazioni. In seguito a diversi stimoli oncogenici, tali cellule possono quindi andare incontro a trasformazione neoplastica, a cui segue lo sviluppo di lesioni istologiche dette IPMN (neoplasie mucinose papillari intraduttali): sebbene inizialmente benigne, esse spesso progrediscono attraverso vari stadi displastici, a seguito di mutazioni e danni a carico del DNA, per dare infine tumori invasivi con esito per lo più fatale.

Contrariamente a quanto possano suggerire il fenotipo duttale del tumore e il suo stesso nome, il più delle volte PDAC non deriva quindi dall’abnorme proliferazione di cellule duttali mutate, bensì da cellule esocrine acinose, come dimostrato da esperimenti di *lineage tracing*: come anticipato, l’evento iniziale per la generazione di foci pre-maligni è infatti la transdifferenziazione delle cellule acinose, che in risposta a stimoli ambientali o oncogenici vanno incontro ad un processo di metaplasia acino-duttale (ADM).^[11]

2.4 Basi genetiche e molecolari di PDAC

KRAS (Kirsten rat sarcoma virus) è un proto-oncogene di 30kb circa, situato sul braccio corto del cromosoma 12: esso codifica per due isoforme proteiche, *KRAS4A* e *KRAS4B*, di 189 e 188 aminoacidi rispettivamente, risultanti dal taglio alternativo dell'ultimo esone; solitamente, *KRAS* viene utilizzato come sinonimo della seconda isoforma.

Essa è una piccola GTPasi che agisce da "interruttore molecolare", preposta al controllo di varie vie di segnalazione intracellulari tramite effettori quali *RAF/MEK/MAPK* e *PI3K/PTEN/AKT*: queste culminano con l'attivazione di fattori di trascrizione che inducono la proliferazione, la migrazione, la trasformazione e la sopravvivenza cellulare.

Studi di sequenziamento genomico hanno mostrato che, nella quasi totalità dei casi di PDAC (più del 90%), *KRAS* è mutato: nello specifico, esso è soggetto a mutazioni missenso che codificano sostituzioni di singoli aminoacidi e che si concentrano su tre *hotspot* mutazionali (98% dei casi): la glicina 12 (G12), la glicina 13 (G13) e la glutammina 61 (Q61). In particolare G12 è sostituita dall'aspartato (41%), dalla valina (34%) o dall'arginina (16%), e ciò attiva costitutivamente il prodotto proteico dell'oncogene, con la perdita di controllo dei pathway a valle di esso.^[12]

Il *signaling* a valle di *KRAS* è mediato da una cascata fosforilativa che amplifica il segnale, avvalendosi di diversi effettori: il primo tra questi è *RAF*, una serina/treonina chinasi che ha come substrato principale *MEK* (Mitogen Extracellular signal-regulated Kinase). Quest'ultima fosforila a sua volta *ERK*, ulteriore chinasi che può traslocare al nucleo per indurre la trascrizione di specifici geni associati alla proliferazione e alla motilità cellulare.

Per lo sviluppo della neoplasia sono però necessari altri stimoli, quali il *signaling* mediato da *EGFR* (recettore del fattore di crescita dell'epidermide) e ulteriori mutazioni inattivanti a carico di oncosoppressori come *TP53* (64%), *SMAD4* (21%) e *CDKN2A* (17%): questi ultimi sono guardiani dell'integrità genomica, inibitori della progressione del ciclo cellulare e regolatori negativi della proliferazione; la

loro inattivazione permette dunque alle cellule trasformate di evitare la senescenza e/o l'apoptosi, stimolata in caso contrario dall'anormale signaling di KRAS.^[13] (Fig.3)

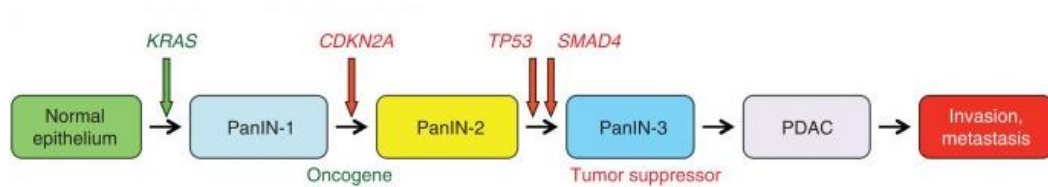


Fig.3 Mutazioni che concorrono alle diverse tappe dello sviluppo di PDAC ^[12]

Oltre a queste alterazioni chiave, se ne possono riscontare altre meno comuni, potenziali responsabili di instabilità genomica: tra queste si distinguono le mutazioni germinali di geni deputati alla riparazione del DNA (come BRCA1/2 e ATM) o mutazioni somatiche in geni che intervengo in caso di appaiamenti errati di basi.

Ad ogni modo, PDAC è caratterizzato da un basso carico mutazionale (*tumour mutational burden, TMB*), come evidenziato da studi di sequenziamento condotti su adenocarcinomi pancreatici in stadio avanzato, che hanno individuato di media solo sessanta mutazioni totali presenti nelle cellule tumorali.^{[14] [15]} Tale numero è esiguo rispetto a quello che si riscontra in molti altri tipi di neoplasie e si traduce in una relativa scarsità di neoantigeni tumorali, cosa che facilita l'evasione della risposta immunitaria da parte di PDAC e lo rende poco vulnerabile alla maggior parte delle immunoterapie.^[16]

Occorre però notare che il profilo trascrizionale di PDAC non è interamente controllato a livello genetico: in questi tumori sono infatti alterati i meccanismi regolatori epigenetici che cambiano la struttura cromatinica, come metilazione del DNA e modifiche istoniche post-traduzionali; inoltre vi sono anomalie a livello della regolazione trascrizionale operata da RNA non codificanti. Ciò porta ad alterazioni epigenetiche che reprimono i geni oncosoppressori e incrementano l'espressione di oncogeni.^[17]

Tali eventi, sommati ad ulteriori cambiamenti microambientali e all'intervento della componente stromale pro-tumorale del tessuto pancreatico, portano allo sviluppo di PDAC.

2.5 Alterazioni metaboliche in PDAC

Uno dei segni distintivi che caratterizza le cellule tumorali è la riprogrammazione metabolica: al fine di sostenere la loro elevata richiesta energetica e la biosintesi di macromolecole necessarie per l'aumento di biomassa, le cellule trasformate mostrano marcate alterazioni nel metabolismo cellulare, contraddistinte tra le altre cose da un'aumentata acquisizione di nutrienti, accompagnata da un incremento dei flussi anabolici per la sintesi di proteine, lipidi e acidi nucleici.

Tali alterazioni metaboliche sono di particolare importanza in PDAC, dal momento che le cellule neoplastiche devono sopravvivere e crescere in un microambiente particolarmente povero di ossigeno e di nutrienti, a causa del denso stroma e dell'ipovascolarizzazione tumorale.

a. PDAC e glicolisi

In particolare, mutazioni oncogeniche di KRAS sono responsabili dell'elevata glicolisi che si riscontra nelle cellule tumorali pancreatiche (il cosiddetto "effetto Warburg"), in quanto aumentano l'*uptake* di glucosio dall'ambiente extracellulare e ne favoriscono l'utilizzo in *pathway* anabolici, andando a regolare positivamente diversi enzimi coinvolti, a livello trascrizionale ^[18]: tra questi si distinguono trasportatori del glucosio ed enzimi glicolitici limitanti come l'esochinasi II (HK2) e la fosfofruttochinasi-1 (PFK1). L'incremento del metabolismo del glucosio promuove così la tumorigenesi di PDAC, fornendo energia (tramite glicolisi e ciclo di Krebs) e utilizzando gli intermedi metabolici della glicolisi in modo da alimentare la via dei pentoso fosfati (PPP) per la sintesi nucleotidica e la via delle esosamine per il supporto della glicosilazione.

Parallelamente a questo, KRAS aumenta l'espressione della lattico deidrogenasi A (LDHA), incrementando la produzione di lattato, che viene poi espulso dalla cellula al fine di mitigare gli effetti tossici che il suo accumulo citosolico causerebbe. ^[19]

In aggiunta, tale oncogene promuove l'utilizzo di altre fonti di carbonio, provenienti sia dall'ambiente extracellulare (tramite import di proteine, macropinocitosi) che da quello intracellulare (per aumentata autofagocitosi), in modo da ottenere aminoacidi, quali la glutammina, che alimentano il ciclo di Krebs o che vengono sfruttati per mantenere l'omeostasi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS): queste assumono particolare importanza in PDAC, in quanto favoriscono l'inizio e la progressione della carcinogenesi attraverso le sue varie fasi.

b. PDAC e metabolismo dei lipidi

In PDAC il metabolismo lipidico è particolarmente attivo: per rispondere all'elevato fabbisogno di nutrienti delle cellule tumorali, non solo aumenta l'uptake di lipidi esogeni da parte di queste, ma anche la sintesi *de novo* di lipidi. Per sostenere la loro incontrollata proliferazione, infatti, le cellule neoplastiche devono continuare a generare varie componenti cellulari, di cui i lipidi sono costituenti essenziali; ne consegue che una maggiore lipogenesi sia fondamentale per la crescita tumorale. ^[20]

La sintesi *de novo* dei lipidi richiede l'acetil-coenzima A, uno dei metaboliti chiave nell'adenocarcinoma pancreatico duttale: esso rappresenta un metabolita cardine per vari processi anabolici (sintesi di lipidi, glicosilazione) e catabolici (ossidazione degli acidi grassi, glicolisi, catabolismo degli aminoacidi a catena ramificata): in particolare, l'acetil-coA viene utilizzato in processi biosintetici importanti per la proliferazione cellulare, come appunto la sintesi degli acidi grassi e del colesterolo.

L'acetil-CoA citosolico viene prodotto principalmente da due enzimi, l'ATP-citrato liasi (ACLY), che lo genera a partire dal citrato derivante dai mitocondri, e l'acetil-coA sintetasi 2 (ACSS2), che produce acetil-coA dall'acetato.

Lo step iniziale della sintesi lipidica prevede l'intervento di questi due enzimi: l'acetil-CoA generata diviene poi substrato dall'acetil-CoA carbossilasi (ACC) per la sintesi di malonil-CoA. Ha così inizio il processo di biosintesi lipidica vero e proprio, che consta dell'aggiunta progressiva di molecole di malonil-CoA all'estremità

carbossilica della catena nascente, ad opera di un complesso multienzimatico chiamato acido grasso sintasi (FAS).

In PDAC gli enzimi lipogenici sono frequentemente sovraespressi: tra questi ACLY, che se inibito arresta la carcinogenesi pancreatica; in aggiunta, alti livelli di espressione di acido grasso sintasi in pazienti con PDAC sono correlati generalmente con un minore tempo di sopravvivenza di questi ultimi rispetto a soggetti con bassi livelli di espressione di FAS.

c. PDAC e sintesi degli steroli

Tra i lipidi si annoverano gli steroli, molecole anfipatiche essenziali nella costituzione delle membrane cellulari. Essi sono sintetizzati a partire dall'acetil-CoA tramite la cosiddetta via del mevalonato (o via metabolica dell'HMG-CoA reductasi): questo pathway ha inizio con la sintesi dell'idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) a partire da tre molecole di acetil-CoA nel citosol, ed è fondamentale per la sintesi di isoprenoidi, coinvolti nella modificazione post-traduzionale delle proteine, e del colesterolo.

Il colesterolo è il principale sterolo nei tessuti animali: esso regola la fluidità di membrana, che a sua volta influenza l'attività di diversi recettori (come EGFR) ed enzimi di membrana che generano messaggeri intracellulari, andando a costituire microdomini definiti "zattere lipidiche".

Le cellule possono sintetizzare il colesterolo a partire dall'acetil-CoA o prelevare quello esogeno tramite endocitosi mediata da recettore (low density lipoprotein receptor, LDLR): in PDAC, il gene codificante per quest'ultimo risulta sovraespresso e ciò suggerisce la necessità di un maggiore uptake di colesterolo esogeno da parte delle cellule tumorali. In aggiunta, è stato osservato che il silenziamento di LDLR riduce il potenziale proliferativo e clonogenico delle cellule di PDAC e riduce l'attivazione del pathway di sopravvivenza ERK1/2.^[21]

Anche la sintesi de novo di colesterolo è elevata in PDAC: l'espressione di geni che partecipano al pathway del mevalonato è positivamente regolata già nelle cellule acinose in metaplasia acino-duttale e continua ad esserlo anche nelle cellule di adenocarcinoma in stadi più avanzati. In particolare, la soppressione del pathway

del mevalonato, ottenuta per inibizione dell'enzima HMG-CoA reduttasi, blocca l'ADM e la conseguente formazione di dotti, e tende ad avere effetti antiproliferativi nei confronti delle cellule di PDAC.^[22]

Ciò dimostra il ruolo fondamentale del colesterolo e dei derivati del mevalonato in varie fasi della tumorigenesi.

2.6 Alterazioni epigenetiche dipendenti da fattori metabolici in PDAC

L'acetil-CoA, oltre ad essere indispensabile per il metabolismo di PDAC, è anche un anello di congiunzione tra metabolismo cellulare ed epigenetica: esso ha infatti importanti funzioni di *signaling*, in quanto costituisce il donatore del gruppo acetile per l'acetilazione di residui amminoacidici, tra cui le lisine istoniche. In diverse condizioni, la produzione e disponibilità intracellulare dell'acetil-CoA influenza i livelli di acetilazione degli istoni, con importanti conseguenze per l'architettura cromatinica e l'espressione genica. Quando un istone viene acetilato da parte di enzimi chiamati HAT (istone acetiltransferasi), esso non è più in grado di legare con alta affinità il DNA (che ha carica negativa), che diviene quindi accessibile ad altri enzimi, ad esempio quelli deputati alla sua trascrizione. Tale processo, che è reversibile, viene controllato da più fattori: tra questi c'è l'abbondanza dell'acetil-CoA nel nucleo, che equivale alla disponibilità di gruppi funzionali per l'acetilazione degli istoni (Fig.4)

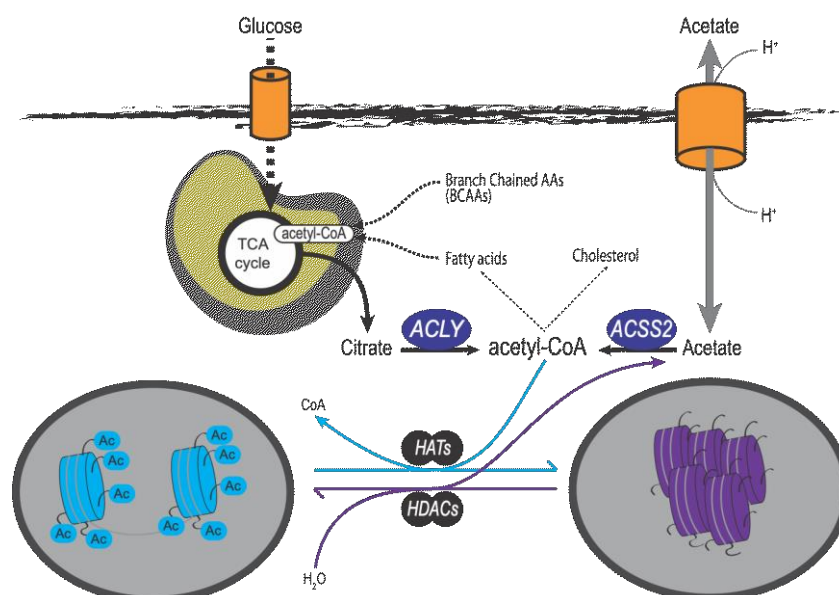


Fig.4. L'acetil-CoA prodotto nel citosol costituisce un essenziale anello di collegamento tra metabolismo cellulare ed epigenetica

Come mostrato da recenti studi condotti dal nostro gruppo di ricerca, durante la carcinogenesi pancreatica si osservano notevoli cambiamenti nel pattern di acetilazione istonica: in cellule acinose di modelli murini esprimenti *Kras* mutato sono stati riscontrati elevati livelli di acetilazione istonica ancor prima della comparsa di lesioni pre-maligne pancreatiche. Ciò porta a modifiche epigenetiche che inducono l'ADM e quindi supportano il primo step di tumorigenesi di PDAC.

Tale fenomeno è dimostrato dal fatto che si può inibire la metaplasia acino-duttale bloccando i processi sia a valle che a monte di ACLY (responsabile della produzione dell'acetil-CoA citoplasmatico).

Un'ulteriore peculiarità di PDAC è riscontrabile a livello mitocondriale, in quanto la rete intracellulare costituita da questi organelli ha caratteristiche distintive che non si riscontrano nelle cellule acinose non trasformate: dal momento che i mitocondri sono implicati in numerosissime funzioni cellulari, è opportuno analizzare più in dettaglio le modifiche che li riguardano in questo tipo di tumore.

3. I MITOCONDRI

3.1 Caratteristiche e funzioni

I mitocondri sono complessi organelli bioenergetici: la loro funzione non si limita però alla produzione di ATP tramite fosforilazione ossidativa (OXPHOS); essi infatti forniscono intermedi biosintetici per il metabolismo cellulare e sono anche coinvolti in numerosi altri processi fisiologici, come l'apoptosi, il *redox signaling*, l'autofagia, l'omeostasi del calcio e la riprogrammazione delle cellule staminali.

Visto il ruolo fondamentale dei mitocondri nel *central carbon metabolism* e nella regolazione di reti di *signaling* alla base di diverse funzioni cellulari, non è sorprendente che difetti a carico di questi organelli o una loro disregolazione siano implicati in meccanismi citopatologici alla base di tumori, malattie neurodegenerative e invecchiamento.

Si ritiene che i mitocondri siano risultati da un'antica endosimbiosi, avvenuta presumibilmente quando una cellula nucleata ha incorporato un procariote aerobio: ciò renderebbe conto delle caratteristiche che tali organelli hanno in comune con i loro progenitori ancestrali, ovvero la divisione per fissione, la doppia membrana e il genoma circolare. Quest'ultimo (mtDNA) consta di una molecola di DNA a doppio filamento, di circa 16,5kb, codificante per 2 rRNA, 22 tRNA e 13 polipeptidi coinvolti nel trasporto di elettroni e nella sintesi di ATP. La maggior parte delle proteine mitocondriali, tuttavia, sono sintetizzate da geni nucleari e successivamente trasportate negli organelli.

I mitocondri sono delimitati da una doppia membrana, una esterna (OMM) a contatto con il citosol e una interna (IMM) che si estende centralmente, ripiegandosi a formare le cosiddette *cristae*. La matrice mitocondriale è separata tramite la IMM dallo spazio intermembrana che si viene a creare tra quest'ultima e la OMM.

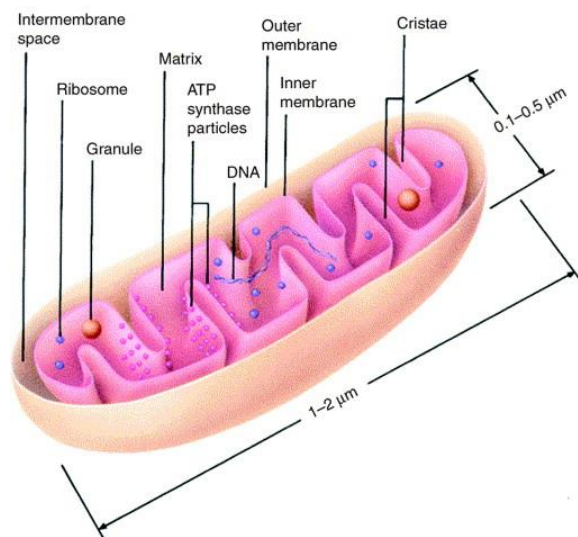


Fig.5. Ultrastruttura mitocondriale (da "The internal structure of mitochondria", *Trends in Biochemical sciences*, 2000)

Le due membrane mitocondriali sono costituite da un doppio strato fosfolipidico in cui si inseriscono diverse proteine, che conferiscono loro differenti proprietà: nella OMM si trovano enzimi, porine e altri canali che permettono lo scambio di molecole tra mitocondri e citosol, che tuttavia non è indiscriminato. La OMM costituisce infatti una barriera tra questi compartimenti cellulari, e la sua rottura provoca il rilascio nella cellula di sostanze tossiche quali le specie reattive dell'ossigeno (ROS mitocondriali), il mtDNA e fattori

pro-apoptotici che determinano la morte cellulare. La OMM, in aggiunta, può associarsi con la membrana del reticolo endoplasmatico (ER), formando strutture dette MAM (mitochondria-associated ER membranes) che presiedono al *buffering* del calcio e al suo rilascio, nonché allo scambio di lipidi tra ER e mitocondri (Fig.5).

La IMM contiene invece l'ATP sintasi, le proteine coinvolte nella catena di trasporto degli elettroni e altri trasportatori specifici per il passaggio di metaboliti da e verso la matrice mitocondriale. La IMM presenta in più punti delle invaginazioni dette *cristae*, che espandono la superficie della membrana dove ha sede la fosforilazione ossidativa, incrementando così la sua capacità di generazione di ATP: maggiore è la densità di tali *cristae*, più è elevata la capacità respiratoria mitocondriale.

La IMM racchiude la matrice mitocondriale: essa contiene diverse copie di mtDNA, ma anche numerosi metaboliti e la maggior parte delle proteine dell'organello, tra cui si trovano gli enzimi deputati alla decarbossilazione ossidativa del piruvato e al ciclo di Krebs (o ciclo degli acidi tricarbossilici, TCA). Quest'ultimo processo consiste nell'ossidazione in più step dell'acetil-CoA derivato da carboidrati, grassi e proteine, e genera NADH e FADH₂ per la fosforilazione ossidativa, ma produce anche intermedi metabolici che alimentano diversi pathway biosintetici cellulari.

Il ciclo di Krebs prevede l'entrata di acetil-CoA e l'uscita di due molecole di CO₂ ad ogni giro: esso inizia con il trasferimento del gruppo acetile dall'acetil-CoA all'ossalacetato e la conseguente formazione del citrato. Questo metabolita, prodotto dalla citrato sintasi, può essere esportato nel citosol principalmente tramite uno specifico *carrier* mitocondriale (CIC) e, una volta raggiunta questa sede, può essere utilizzato per la produzione di acetil-CoA, alla base della sintesi di steroli e acidi grassi, ma anche di altri importanti pathway cellulari. In alternativa, il citrato mitocondriale viene convertito in isocitrato, che viene deidrogenato con perdita di CO₂ producendo l' α -chetoglutarato; quest'ultimo perde un'altra molecola di CO₂ per formare il succinato, poi convertito enzimaticamente in tre tappe in ossalacetato. L'ossalacetato, così ricostituito, è

nuovamente pronto a reagire con un'altra molecola di acetil-CoA per iniziare un secondo giro del ciclo.

Quattro delle otto tappe che compongono il ciclo di Krebs sono ossidazioni, in cui l'energia ottenuta viene conservata con un alto grado di efficienza mediante la formazione dei coenzimi ridotti NADH e FADH₂.

Essi vanno ad alimentare la fosforilazione ossidativa, processo costituito da due fasi, ovvero la catena di trasporto degli elettroni (ETC) e la sintesi di ATP (Fig.6).

L'ETC si avvale di vari trasportatori di elettroni organizzati in complessi multienzimatici intramembrana, localizzati a livello della IMM: essi sono numerati da I a IV e contengono molecole trasportatrici per il trasferimento degli elettroni.

I Complessi I e II catalizzano il trasferimento degli elettroni da due diversi donatori, il NADH (Complesso I) e il succinato (Complesso II), all'acceptore ubiquinone. Esso è un carrier che diffonde in membrana e giunge al Complesso III, che trasferisce gli elettroni dall'ubichinone ridotto al citocromo c, un altro trasportatore diffusibile. Infine il Complesso IV trasferisce gli elettroni da quest'ultimo all'O₂. L'ossigeno ridotto poi reagisce con i protoni per dare H₂O.

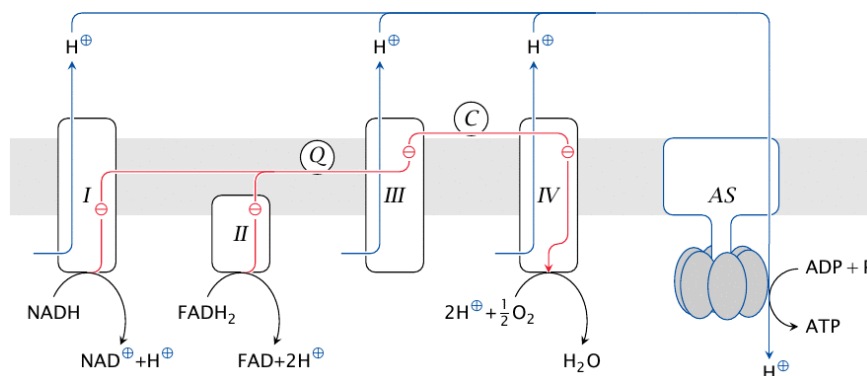


Fig.6. Schema base della fosforilazione ossidativa: lo spazio superiore corrisponde allo spazio intermembrana, quello inferiore alla matrice mitocondriale (I-IV: complessi della catena respiratoria; Q: ubiquinone; c: citocromo c; AS: ATP sintasi)

L'energia libera resa disponibile da questo flusso esoergonico di elettroni è sfruttata dai Complessi I, III e IV, che pompano protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana attraverso la IMM; per ogni elettrone che migra

attraverso la catena di trasporto, più protoni vengono espulsi in questo compartimento. Il gradiente elettrochimico così generato spinge i protoni a riattraversare la IMM in senso inverso, attraverso l'ATP sintasi: esso è un complesso enzimatico di membrana che, mediante "catalisi rotazionale", utilizza l'energia del flusso protonico per formare ATP, catalizzando la fosforilazione dell'ADP. Tramite fosforilazione ossidativa viene prodotta così gran parte dell'energia chimica necessaria alla cellula.

3.2 Mitocondri e cancro

Dal momento che i mitocondri intervengono in numerosi processi cellulari e sono essenziali sensori di stress che permettono l'adattamento cellulare a cambiamenti ambientali, è naturale che questi organelli siano importanti mediatori di tumorigenesi, poiché tale processo richiede flessibilità per l'adeguamento della cellula a diverse condizioni e richieste metaboliche e biosintetiche.

La scoperta da parte di Warburg che le cellule tumorali utilizzano la glicolisi anaerobia anche in presenza di ossigeno, piuttosto che ossidare completamente il glucosio per alimentare la respirazione mitocondriale, ha portato l'attenzione sul possibile ruolo dei mitocondri nella tumorigenesi. Sebbene Warburg fosse inizialmente convinto che il fenomeno da lui osservato si dovesse ricondurre al danneggiamento e alla perdita di funzionalità dei mitocondri nelle cellule tumorali, successive evidenze hanno smentito questa ipotesi: molte cellule neoplastiche che presentano l'effetto Warburg mostrano una respirazione mitocondriale intatta e alcuni tipi di tumori sono strettamente dipendenti da questo processo per ricavare energia, potenziale riducente e intermedi per la sintesi di macromolecole.

Decenni di ricerca hanno identificato un ruolo pleiotropico dei mitocondri nella carcinogenesi, che spazia dalla produzione di ATP alla generazione di specie reattive dell'ossigeno e di metaboliti ossidoriducibili, dalla regolazione del *signaling* cellulare e del metabolismo biosintetico al controllo della morte cellulare. I mitocondri favoriscono in tal modo la sopravvivenza, la crescita e l'adattamento delle cellule tumorali alle eventuali condizioni avverse, come la

scarsità di nutrienti e l'ipossia. Il ruolo dei mitocondri nel cancro, inoltre, varia a seconda delle differenze genetiche, ambientali e del tessuto di origine del tumore.

I mitocondri hanno un importante ruolo bioenergetico e sono la sede di molte reazioni metaboliche: essi sono dunque in grado di riprogrammare il metabolismo delle cellule tumorali, alterando l'utilizzo del glucosio e il metabolismo di aminoacidi e lipidi. Durante la fosforilazione ossidativa, inoltre, questi organelli producono ROS: i livelli di queste sostanze sono solitamente elevati in sede tumorale, dove, entro certi limiti, promuovono il *signaling* proliferativo e di sopravvivenza cellulare.

Un'altra importante funzione mitocondriale è il controllo dell'apoptosi: una delle caratteristiche salienti del cancro è la capacità di evadere la morte cellulare. Le cellule neoplastiche eludono l'apoptosi sopprimendo l'espressione di geni pro-apoptotici come *BAX* e *BAK* e/o aumentando l'espressione di geni anti-apoptotici come *BCL2*, attraverso vari meccanismi. Infine, anche le cosiddette dinamiche mitocondriali possono influenzare la tumorigenesi.^[23]

4. DINAMICHE MITOCONDRIALI

Sebbene inizialmente i mitocondri fossero considerati organelli statici e isolati, negli ultimi trent'anni lo sviluppo di tecniche di microscopia più avanzate quali il *live cell imaging* ha totalmente rivoluzionato questo concetto: i mitocondri infatti possono modulare la loro morfologia per creare una rete complessa e variabile, che cambia grazie a eventi coordinati di fusione e fissione. L'equilibrio tra questi due processi opposti regola il numero dei mitocondri, la loro dimensione e la loro localizzazione nel citoplasma, ed è definito con il nome collettivo di "dinamiche mitocondriali". Esse hanno un impatto significativo sulla funzionalità mitocondriale. Tali adattamenti morfologici sono rapidi e transitori, e sono necessari non solo per garantire la funzionalità di questi organelli, ma anche per adeguare la rete mitocondriale alle esigenze metaboliche della cellula. Per di più, queste dinamiche risultano cruciali per molti processi cellulari, quali il ciclo cellulare, l'apoptosi, l'immunità e il controllo di qualità dei mitocondri.

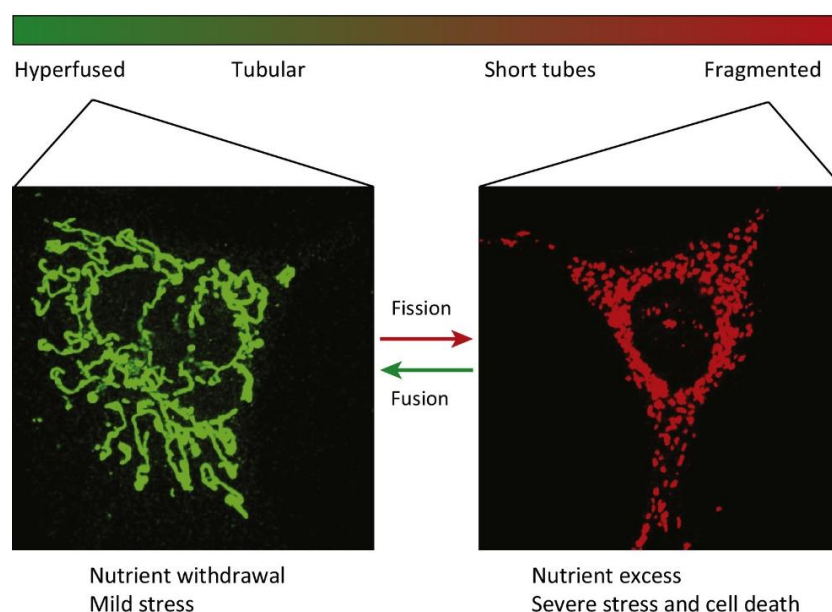


Fig.7. Spettro delle morfologie mitocondriali (da “Mitochondrial dynamics and metabolic regulation”, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2016)

Mutazioni che colpiscono i macchinari molecolari alla base di questi processi e, più in generale, disfunzioni delle dinamiche mitocondriali, determinano un network frammentato, caratterizzato da un elevato numero di mitocondri piccoli e sferici, o alternatively un *network* iper-fuso, con organelli allungati e in gran parte connessi tra loro (Fig.7). Entrambe le condizioni sono associate a diversi stati fisiopatologici e sono alla base di numerose malattie umane.^[24]

Le principali proteine implicate nelle dinamiche mitocondriali sono grandi GTPasi appartenenti alla famiglia delle dinamine: tali meccanoenzimi sono in grado di oligomerizzare e cambiare conformazione, in modo da guidare il rimodellamento, la costrizione e la scissione o la fusione delle membrane.

La fissione mitocondriale è svolta da DRP1 (dynamin-related protein 1), da FIS1 (Mitochondrial Fission Molecule) e da DNM2 (dynamin 2), mentre la fusione mitocondriale è portata a termine dalle mitofusine 1 e 2 (MFN1 e MFN2) e da OPA1 (optic atrophy 1); il *knockout* (KO) di una qualsiasi di queste GTPasi risulta letale in embrioni murini e i fibroblasti embrionali che derivano da questi topi presentano gravi difetti morfologici mitocondriali.

4.1 Fusione mitocondriale

La fusione mitocondriale consiste nell'unione di due o più mitocondri, risultante in un singolo organello di maggiori dimensioni. Tale processo, evolutivamente conservato nelle cellule eucariotiche, è rapido e guidato da stimoli cellulari.

Si ritiene che la fusione sia necessaria al mantenimento di una popolazione mitocondriale sana, in quanto permette lo scambio di materiale tra i due mitocondri coinvolti: da una parte avviene la diluizione di sostanze tossiche o dannose come ROS e mtDNA mutato, mentre dall'altra si combinano componenti essenziali all'interno di una popolazione mitocondriale, che in tal modo non vengono perse definitivamente. ^[25]

Un *network* di organelli con fenotipo più fuso previene anche l'inglobamento da parte dei fagosomi durante l'autofagia stimolata dalla carenza di nutrienti ed è usualmente associata a meccanismi di sopravvivenza cellulare: l'elongazione dei mitocondri, infatti, promuove la formazione di più *cristae*, aumenta la dimerizzazione e l'attività dell'ATP sintasi e mantiene la produzione di ATP, contribuendo alla vitalità cellulare. ^[26]

In generale, la fusione mitocondriale si compone di tre passaggi: l'accostamento dei due mitocondri interessati, l'ancoraggio delle due membrane per massimizzare l'area della superficie di contatto e avvicinare ulteriormente i due organelli, e infine la fusione delle due OMM grazie a cambiamenti conformazionali indotti dall'idrolisi di GTP. Successivamente, anche le due IMM vanno incontro a fusione.

Le proteine che veicolano l'unione tra le due membrane mitocondriali esterne sono le due mitofusine MFN1 e MFN2 residenti nella OMM, GTPasi che si aggregano nei siti di contatto tra i due mitocondri e si uniscono in *trans* formando complessi omo- ed eterotipici. Un cambiamento conformazionale indotto dall'idrolisi di GTP promuove la fusione tra le due OMM, seguita da quella tra le IMM che è invece mediata dalla GTPasi OPA1 (sia dalla sua forma integrale di membrana nella IMM che dalla sua forma solubile).

4.2 Fissione mitocondriale

La fissione mitocondriale è caratterizzata dalla divisione di un mitocondrio in due organelli indipendenti: anche questo processo prevede una serie di eventi sequenziali, in cui intervengono diverse proteine. Dopo l'indicazione del sito di fissione, avviene l'assemblaggio di dimeri e oligomeri della GTPasi citosolica DRP1, che viene reclutata per formare una sovrastruttura a spirale in corrispondenza del sito di fissione; l'evento si conclude con l'idrolisi di GTP e il conseguente restringimento dell'anello che separa i due mitocondri. [27]

L'assoluto protagonista della fissione mitocondriale è la *Dynamin-Related Protein 1* (DRP1; gene: *DNML1*), evolutivamente conservato e oggetto di numerosi studi funzionali in numerosi organismi modello, da *Saccharomyces cerevisiae* a uomo.

DRP1 possiede un dominio GTPasico N-terminale, un dominio intermedio dinamina-simile, un dominio variabile non caratterizzato e un dominio effettore GTPasico (GED) al C-terminale.

DRP1 è solitamente presente sotto forma di dimeri o tetrameri nel citoplasma e funge da recettore citosolico, in quanto lega la fissione e la funzione mitocondriale allo stato citoplasmatico della cellula: per operare, esso dev'essere infatti reclutato a livello mitocondriale e ciò avviene solo quando DRP1 va incontro a specifiche modifiche post-traduzionali.

Tra queste, la fosforilazione è la più studiata, e in particolare quella che interessa i residui di serina 616 e 637. Da una parte, elevati livelli di cAMP durante carenza di nutrienti causano la fosforilazione di S637 ad opera di PKA, con effetto inibitorio su DRP1, che rimane così nel citoplasma, promuovendo l'allungamento mitocondriale. Se al contrario S637 è defosforilata, ad esempio ad opera della fosfatasi calcineurina in risposta a un aumento dei livelli citosolici di calcio, DRP1 viene attivato e trasferito ai mitocondri.

Lo stesso avviene per la S616, che nella forma fosforilata è però considerata pro-fissione: le chinasi che intervengono in questa modifica post-traduzionale sono CDK1/ciclina B durante la mitosi, che inducono l'oligomerizzazione di DRP1 e la conseguente fissione mitocondriale, in modo da assicurare la distribuzione degli

organelli nelle due cellule figlie ^[28]. In condizioni non fisiologiche, invece, la fosforilazione di S616 può essere mediata da ERK-1/2, che intervengono per stimolare la fissione mitocondriale: questo, ad esempio, è un requisito fondamentale per la trasformazione tumorale indotta da RAS ed è necessario per promuovere la crescita neoplastica. Una marcata frammentazione mitocondriale è stata infatti osservata in vari tipi di neoplasie che presentano *RAS* mutato; inoltre evidenze sperimentali hanno mostrato che l'inibizione della fissione mitocondriale in modelli murini di adenocarcinoma al polmone e al colon-retto, tramite *knockdown* di *Drp1*, diminuisce in maniera sostanziale la proliferazione delle cellule tumorali e ne incrementa l'apoptosi. ^[29]

Una rete mitocondriale frammentata è spesso (ma non universalmente) associata a disfunzione di tali organelli, in quanto si riscontra in caso di livelli elevati di stress ossidativo, di morte cellulare e in caso di diabete e di fenomeni infettivi; ciononostante, un'aumentata fissione mitocondriale si osserva anche in altre situazioni: essa, infatti, è necessaria durante la fase G2/M della mitosi, è fondamentale per la motilità e il controllo di qualità mitocondriale e per la trasmissione ereditaria del mtDNA.

Studi recenti testimoniano una accelerata fissione mitocondriale durante varie fasi della carcinogenesi pancreatica. Questo è giustificato in primis dal fatto che la via delle MAP chinasi a valle di KRAS mutato è cruciale nella iniziazione e progressione del PDAC e, al tempo stesso, porta alla fosforilazione di DRP1 e attivazione della fissione mitocondriale. Il contributo di quest'ultima alla tumorigenesi del pancreas verrà discusso nei paragrafi successivi.

4.3 Fissione mitocondriale e cancro al pancreas

Come anticipato, molti aspetti della biologia mitocondriale supportano la trasformazione tumorale, tra cui dinamiche mitocondriali di fusione e fissione, regolazione dello stress ossidativo, metabolismo e *signaling*.

Molti studi hanno evidenziato un disequilibrio nelle dinamiche mitocondriali in cancro, generalmente caratterizzato da un'elevata attività di fissione e/o una diminuita fusione risultanti in un network mitocondriale frammentato, anche se si

notano significative differenze tra tumori o stadi tumorali diversi. In modelli cellulari di PDAC, il ripristino di una rete più fusa tramite intervento genetico o farmacologico sembra prevenire la crescita tumorale *in vitro*, e ciò suggerisce che il rimodellamento del network mitocondriale sia importante nella tumorigenesi. In aggiunta, un'aumentata espressione di DRP1 è associata a un fenotipo migratorio in diversi tipi di cancro, dove facilita la metastasi. [30]

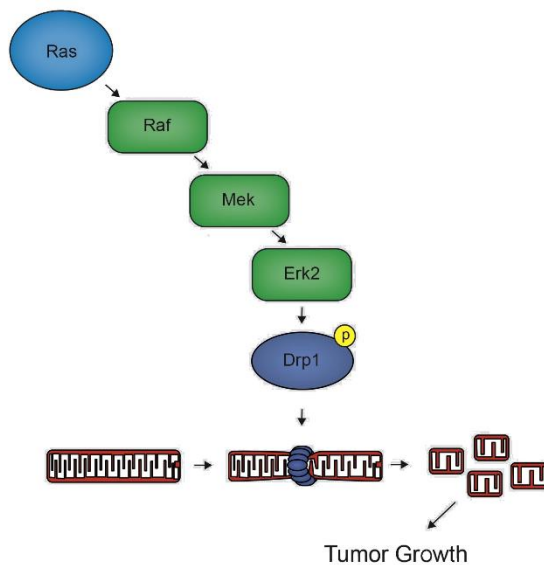


Fig.8. Fissione mitocondriale mediata dal signaling di ERK, promosso da KRAS

In particolare, l'alterazione delle dinamiche mitocondriali è una caratteristica chiave della trasformazione cellulare mediata da KRAS, in cui l'oncogene stimola la frammentazione del network attraverso la fosforilazione di S616 di DRP1 mediata da ERK-1/2. Ciò influenza la funzione mitocondriale, con conseguenti cambiamenti nella proliferazione, nel metabolismo e nella suscettibilità all'apoptosi delle cellule tumorali con KRAS mutato (Fig.8)

Uno studio condotto da Serasinghe et al. ha evidenziato come forme oncogeniche di KRAS promuovano la fissione mitocondriale tramite attivazione di DRP1, con quest'ultima che media la tra trasformazione in senso neoplastico indotta da KRAS stesso. L'inibizione farmacologica o genetica di questa proteina impedisce la fissione e la disfunzione mitocondriale promossa dall'oncogene e rende le cellule resistenti alla trasformazione tumorale e alla formazione di colonie. Allo stesso modo il blocco della via di segnalazione di ERK1/2 porta a un rimodellamento della rete mitocondriale causato dalla ridotta fosforilazione di DRP1. In una successiva ricerca di Nagdas et al., è stato dimostrato che DRP1 gioca un ruolo critico nella

carcinogenesi pancreatica: ciò è stato verificato in diverse linee cellulari e modelli murini di cancro al pancreas, portatori della mutazione KRAS^{G12D}. Tra gli esperimenti chiave, è stato condotto un saggio di formazione di colonie in soft agar, tecnica ampiamente utilizzata per valutare la trasformazione cellulare in vitro: essa è basata sul presupposto che per le cellule normali non è possibile una crescita “ancoraggio indipendente”, mentre le cellule tumorali hanno la capacità di crescere e dividersi senza legarsi ad un substrato. Coerentemente con i risultati precedentemente ottenuti, la delezione di Drp1 porta alla perdita della formazione di colonie Kras-dipendente in soft agar, che tuttavia è ripristinata quando in queste cellule viene ri-espresso Drp1 murino. Questi esperimenti dimostrano pertanto che la riprogrammazione del network mitocondriale è indispensabile per la trasformazione e l’espansione cellulare indotta da KRAS.

Gli stessi risultati sono stati replicati in linee cellulari umane di adenocarcinoma pancreatico duttale (PDAC), derivate da pazienti: in caso di knockdown inducibile di DRP1 (tramite shRNA dipendente da doxiciclina), sia la proliferazione che la formazione di colonie da parte di cellule esprimenti KRAS mutato sono notevolmente ridotte.

In aggiunta, il ruolo critico di DRP1 è stato anche dimostrato grazie a delezione genica in modelli autoctoni di carcinogenesi pancreatica dove si nota una progressione più lenta verso lo sviluppo di cancro al pancreas rispetto ai topi con *Drp1*^{WT}. [31]

DRP1 è quindi responsabile della trasformazione e crescita tumorale KRAS-mediata. Il meccanismo con cui un’aumentata fissione mitocondriale, veicolata appunto da DRP1, possa portare ad una accelerata carcinogenesi non è stato del tutto chiarito: lo studio di Nagdas e colleghi evidenzia comunque che DRP1, seppur con processi non pienamente elucidati, supporta la trasformazione tumorale a valle dell’oncogene con diverse conseguenze su metabolismo, proliferazione e *signaling* cellulare.

OBIETTIVO DELL'ELABORATO

È stato deciso di investigare il ruolo delle dinamiche mitocondriali nella tumorigenesi di PDAC, testando nello specifico l'effetto di due differenti sostanze, ovvero un agente farmacologico chiamato Mdivi-1 (che inibisce DRP1) e il metabolita attivo della nicotina, la cotinina. In particolare, sono stati considerati gli effetti di queste due sostanze sulla frammentazione della rete mitocondriale in modelli *in vitro* di adenocarcinoma, per valutare come le modulazioni del *network* mitocondriale impattino la trasformazione e la crescita tumorale.

Come sopra riportato, nei vari studi condotti sulla funzione di DRP1 viene testato l'effetto della sua inibizione con metodi genetici; a questi si aggiungono metodi farmacologici, che si basano sull'uso di una piccola molecola detta Mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor 1): nonostante non sia indicato per l'utilizzo *in vivo*, in quanto ha bassa biodisponibilità e lipofilia, in aggiunta a numerosi effetti collaterali, Mdivi-1 si presta tuttavia ad esperimenti condotti *in vitro*, in cui si dimostra un efficace inibitore di DRP1 e dunque un agente farmacologico valido per analizzare gli effetti dell'inibizione della fissione mitocondriale.^[32]

Lo scopo degli esperimenti sarà investigare le conseguenze molecolari che derivano dall'inibizione della fissione mitocondriale indotta da KRAS.

La cotinina, ovvero la seconda sostanza considerata, si ricollega d'altra parte con il maggior fattore di rischio per il cancro al pancreas, ovvero il fumo di sigaretta: tra i suoi costituenti compare la nicotina, associata da numerose ricerche allo sviluppo di PDAC.

Una di queste, condotta da Hermann et al., rivela che la somministrazione di tale alcaloide ai modelli murini K-Ras^{+/LSL-G12D};Trp53^{LSL-R172H};Pdx-1-Cre (KPC) accelera la trasformazione delle cellule pancreatiche e la tumorigenesi: questo effetto è dovuto all'attivazione, mediata da nicotina, dei recettori nicotinici per il neurotrasmettitore acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) espressi sulla membrana plasmatica delle cellule pancreatiche.^{[33] [34]}

La nicotina ha inoltre mostrato un interessante effetto a livello della rete mitocondriale cellulare: in uno studio condotto su cellule umane multipotenti di

carcinoma embrionale (linea NT2/D1) e poi riprodotto in cellule di muscolatura liscia delle vie aeree (ASM), è stato osservato che la nicotina, dopo legame con nAChR, induce l'espressione di DRP1 e la diminuzione delle mitofusine Mfn1/2. La nicotina, dunque, sembra sbilanciare le dinamiche mitocondriali a favore della fissione e il network formato da questi organelli risulta altamente frammentato. [35] [36]

Dal momento che questa caratteristica si riscontra anche in PDAC ed è un fattore necessario per lo sviluppo di questo tumore, è opportuno analizzare eventuali ripercussioni della presenza di nicotina, derivata dal fumo di sigaretta, anche in modelli di adenocarcinoma pancreatico duttale. Questo alcaloide, però, ha un'emivita molto breve, in quanto è rapidamente metabolizzato a livello polmonare ed epatico dopo l'inalazione del fumo. Nel fegato, in particolare, l'enzima epatico CYP2A6 catalizza la conversione della nicotina nel suo metabolita primario, chiamato cotinina. Essa ha una concentrazione plasmatica 10 volte maggiore rispetto alla nicotina e la sua emivita raggiunge le 15-20 ore: per questo motivo, la cotinina è utilizzata come biomarcatore per l'esposizione al fumo di sigaretta ed è stato dimostrato che l'aumento dei suoi livelli nel sangue correla positivamente con l'incidenza di tumori al pancreas ^[37]. Questo metabolita si adatta dunque a test *in vitro* per lo studio degli effetti del fumo di sigaretta sulla rete mitocondriale in modelli di adenocarcinoma pancreatico duttale.

MATERIALI E METODI

1 Animali e linee cellulari

Tutte le procedure sono state approvate dal comitato etico e dal Ministero della Salute Italiano, rispettando le linee guida per l'utilizzo e la cura degli animali da laboratorio. I topi sono tenuti nello stabulario dell'Istituto Veneto di Medicina Molecolare (VIMM) dove si alternano cicli di luce-buio di 12 ore.

I modelli murini utilizzati per gli esperimenti sono *wildtype* o in alternativa possiedono il background genetico KC (Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}).

Le linee cellulari usate per gli esperimenti *in vitro* sono di provenienza umana o murina. Nella prima categoria rientrano le HPDE (*Human Pancreatic Ductal Epithelial cells*) e la linea tumorale PANC-1; delle linee cellulari provenienti da topo, invece, fanno parte le KC (Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}), KPC (Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H/+}) e KPC 3D. Tutte le linee crescono bidimensionalmente in adesione, in apposito medium di coltura, ad eccezione delle KPC 3D, che formano sferoidi di carcinoma pancreatico in sospensione.

A differenza delle HPDE, che esigono un particolare medium (RPMI *Sigma Aldrich*, Keartincyte SFM *Gibco*, Fetal Bovine Serum *Biowest* 1:10, Bovine Pituitary Extract *Gibco* 4000X, EGF *Stem Cell* 1: 20000), PANC-1, KC e KPC crescono in DMEM-High Glucose (*Biowest*) con aggiunta di L-glutammina 1:100 (*Biowest*), Penicillina/Streptomicina 1:100 (*Biowest*) e Newborn Calf Serum 1:10 (*Biowest*).

Le KPC 3D sono invece mantenute in coltura in DMEM-F12 (*Biowest*), L-glutammina 1:100, Penicillina/Streptomicina 1:100, MEM non essential AA 1:100 (*Gibco*), B-27 1:50 (*Gibco*) e Fibroblast Growth Factor 1:1000 (*Isokine*).

2 Estrazione di acini pancreatici

Il pancreas murino si trova in 10mL di HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution buffer, *Biowest*) e va tenuto il più possibile in ghiaccio per non stressare le cellule, che altrimenti secernono enzimi digestivi e distruggono il tessuto. Dopo aver effettuato un paio di lavaggi con HBSS freddo, si trasferisce il pancreas in una piastra petri sterile *low adhesion* e si sminuzza in fibre più piccole possibili; il tessuto così ottenuto si mette nuovamente in falcon con HBSS, che dev'essere

centrifugata a 4°C per 2 minuti a 720g. Il pellet depositatosi è poi risospeso in 5ml di HBSS + 1mg di collagenasi P : questo è un processo delicato, in quanto si va ad attaccare enzimaticamente il pancreas. Per tale motivo, trascorso il tempo necessario per l'omogenizzazione del tessuto, la collagenasi va bloccata con 25mL di HBSS + CS (*Calf Serum*)/ FBS (*Fetal Bovine Serum*) 5%. Si filtra poi la sospensione con una maglia di 500µm e successivamente con una di 105 µm, aggiungendola a una falcon con 20ml di HBSS + CS/FBS 30%: il gradiente di densità che si forma permette alle singole cellule di rimanere in superficie, mentre le cellule acinose in grappoli si depositano sul fondo. Dopo una centrifuga a freddo, si preleva il pellet e lo si risospende in 10ml di *Waymouth's medium* (+10 % FBS, Penicillina/Streptomicina 1:100, Inibitore di tripsina *Sigma-Aldrich*).

3 Valutazione dell'ADM

Gli acini pancreatici estratti vanno contati e messi in coltura in piastre da 24 pozzetti *low adhesion* in *Waymouth's medium*, a cui viene aggiunta una matrice sintetica che mima l'ambiente extracellulare pancreatico (1:3 *Corning Matrigel*, *Merck*). Il giorno successivo alla semina dei cluster di cellule acinose, esse vengono trattate con EGF (1:2500) e con eventuali altre sostanze da testare. Trascorsi 5 giorni, in cui gli acini vengono tenuti in incubatore a temperatura, umidità e tensione di CO₂ controllate, si acquisiscono al microscopio le immagini in campo chiaro dei diversi campioni, procedendo poi con la conta del numero di acini e strutture duttali che si riconoscono nelle foto delle colture.

4 Respirimetria ad alta risoluzione: Oroboros O2k

L'Oroboros O2k è uno strumento che permette di misurare il livello di fosforilazione ossidativa che avviene nelle cellule quando esse sono risospese in uno specifico buffer, detto MiR05 (EGTA 0,5mM, MgCl₂ 3mM, Lactobionic acid 60mM, Taurine 20mM, KH₂PO₄ 10mM, HEPES 20mM, D-sucrose 110mM, BSA 1g/l). Ciò è reso possibile da un ossigrafo, che rileva i livelli di O₂ e le sue fluttuazioni nel mezzo, corrispondenti all'utilizzo di ossigeno da parte dei mitocondri. Dopo apposita taratura dello strumento, i campioni cellulari di controllo e quelli trattati vengono inseriti in due camerette in MiR05, a cui sono

poi aggiunti in sequenza dei composti che consentono la misurazione delle singole fasi della fosforilazione ossidativa:

- Il consumo di O_2 da parte delle cellule in MirO5 corrisponde al metabolismo basale.
- L'aggiunta di piruvato aumenta i livelli di respirazione mitocondriale, in quanto substrato del ciclo di Krebs
- L'oligomicina, un inibitore dell'ATP sintasi, permette di valutare la respirazione legata all'ATP
- Quando viene aggiunto un agente disaccoppiante, il CCCP, viene dissipato il gradiente elettrochimico a cavallo della IMM e si può calcolare la massima capacità respiratoria mitocondriale
- Il rotenone inibisce invece il Complesso I della catena di trasporto degli elettroni, abbattendo così i livelli di respirazione: essa giunge a zero quando viene aggiunta antimicina, che blocca il Complesso III.

Il flusso di ossigeno misurato dallo strumento viene poi normalizzato sulla concentrazione proteica dei campioni cellulari utilizzati, che è direttamente proporzionale al numero di cellule sottoposte all'esperimento.

5 Misurazione del colesterolo intracellulare

Per rilevare e quantificare il contenuto intracellulare di colesterolo si utilizza Filipin Complex: Sigma (F-9765), un antibiotico della categoria dei macrolidi che lega in maniera specifica il colesterolo e ne consente la visualizzazione tramite microscopio a fluorescenza. Una volta che le cellule sono state lavate con PBS (*Phosphate Buffer Solution*), esse devono essere fissate in paraformaldeide 4% per 15 minuti a temperatura ambiente; seguono ulteriori lavaggi, dopo cui i campioni vengono incubati per 10 minuti con 1.5mg/ml di glicina in PBS, in modo da bloccare eventuali aldeidi rimaste dopo la fase di fissaggio, che potrebbero generare un aumento della fluorescenza di fondo nel campione. Le cellule vengono poi sottoposte a *staining* con Filipin, che si trova in soluzione a 0.5 mg/ml in PBS/10% FBS: il processo avviene per un paio d'ore al buio, in quanto la sonda fluorescente è fotosensibile. I campioni sono quindi lavati e montati su vetrino per

la visualizzazione al microscopio, dove i depositi di colesterolo cellulare diventano visibili se eccitati con filtro UV settato a 340-380 nm.

6 Dosaggio delle specie reattive dell'ossigeno

La produzione dei ROS è stata valutata impiegando la 5-(e 6-) 2',7' carbossidiclorodidrofluoresceina diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes; Eugene, OR). Questo composto presenta due gruppi acetile che lo rendono lipofilo e gli consentono di attraversare la membrana plasmatica; all'interno della cellula, le esterasi rimuovono i gruppi acetile e la molecola ottenuta (DCFH) viene così ossidata dai ROS eventualmente presenti, e convertita in un prodotto verde fluorescente (DCF, diclorofluoresceina).

Per dosare i ROS le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a una concentrazione di 2500 cellule in 100µL tot/pozzetto ed incubate con diverse concentrazioni di trattamento a partire dal giorno successivo. Il controllo positivo si ottiene tramite aggiunta di N-acetilcisteina (NAC) 5mM. Dopo 24 ore il terreno di coltura è stato allontanato e sostituito con 100 µl di una soluzione 100 µM di H₂DCFDA (che non va aggiunta nei pozzetti di controllo negativo, in cui si misura l'autofluorescenza del campione). Dopo 30 minuti di incubazione al buio, la soluzione è stata rimossa e sostituita con PBS + 2% di CS ed è stata quantificata la fluorescenza basale a un multiwell reader, mediante un filtro con lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 530 nm. Dopo aggiunta di 20µL di H₂O₂ per pozzetto, è stata poi rilevata nuovamente la fluorescenza.

7 Quantificazione del lattato

La produzione di lattato da parte delle cellule indica in maniera indiretta il tasso glicolitico di queste ultime: è stato quindi utilizzato uno specifico kit per la quantificazione di questo metabolita. Il Lactate-Glo™ Assay (Promega) è un saggio che rileva il lattato in campioni biologici, servendosi di uno specifico Lactate Detection Reagent, che contiene lattato deidrogenasi, NAD⁺, reduttasi, substrato della reduttasi e luciferasi. La lattato deidrogenasi ossida il lattato in piruvato e riduce il NAD⁺: il NADH così ottenuto è necessario per l'azione della reduttasi, che in sua presenza converte il proprio substrato, la pro-luciferina, in luciferina. Essa è

poi utilizzata dalla luciferasi per produrre luce. Il Lactate Detection Reagent è stato quindi aggiunto ai campioni contenenti lattato in rapporto 1:1 ed è stato lasciato incubare a temperatura ambiente per un'ora, in modo che il segnale bioluminescente prodotto dalle reazioni sopra descritte si stabilizzasse con l'esaurimento di tutto il lattato contenuto nei campioni. La luminescenza, proporzionale alla concentrazione di questo metabolita, è stata poi rilevata al *plate reader* e confrontata con quella di soluzioni a concentrazioni note per calcolare la quantità di lattato nei *samples* di interesse.

8 Estrazione delle proteine

Per estrarre le proteine totali dalle cellule in coltura, è stato tolto il terreno e sono stati effettuati due lavaggi in PBS. Le cellule in adesione sono state prelevate dalla dish tramite *scraper* e trasferite in eppendorf, per poi essere centrifugate a freddo a 600g per 5 minuti. Il pellet, previa rimozione del surnatante, è stato quindi risospeso in buffer di lisi RIPA (Tris HCl 50mM a pH 8,5; EDTA 1mM; NaCl 150mM; NP40 1%; DOC 0,5%; H₂O) con inibitori di deacetilasi, di Ser/Thr fosfatasi e di proteasi (rispettivamente sodio butirrato NaB 1:100; acido okadaico Phic 1:100; Pic 1:500), con aggiunta di ditiotreitolo DTT (1:1000) per denaturare le proteine. I campioni sono stati passati al *vortex* e lasciati in ghiaccio per poi essere nuovamente centrifugati a freddo a 13000g: da questi si recupera il surnatante, costituito dal contenuto citosolico delle cellule. Il lisato proteico viene quantificato con il metodo colorimetrico dell'acido bicinconinico (BCA), basato sulla formazione di un complesso rame-proteine di cui si misura l'assorbanza a 562nm al *plate reader*. Tramite confronto con retta di taratura costruita sulle assorbanze di campioni a concentrazione nota, si quantifica il contenuto proteico dei campioni d'interesse.

9 Estrazione degli istoni

Le cellule, lavate in PBS e prelevate con uno *scraper* dalla dish di coltura, sono state messe in eppendorf con buffer di lisi (Nuclei Isolation Buffer NIB 250; NP40 1:100; PIC 500X; NaB 100X) per 15 minuti in ghiaccio, e poi centrifugate a freddo per 5 minuti a 600g in modo da far precipitare i nuclei ed eliminare la porzione

citoplasmatica, che costituisce il surnatante. Una volta rimosso quest'ultimo, il pellet è stato risospeso in NIB 250 e ri-centrifugato per eliminare più detergente possibile; ai nuclei sono stati quindi aggiunti 450 µl H₂SO₄ 0,4N e i campioni sono stati incubati a freddo per 1.30h: l'acido solforico porta così gli istoni in soluzione. A questo è seguita una centrifuga a freddo a 13000g per 10 minuti, dopo la quale sono stati prelevati 450 µl di surnatante, a cui sono stati aggiunti 225 µl di TCA 100%. Dopo un'ulteriore incubazione dei campioni in ghiaccio, le eppendorf sono state centrifugate a freddo a 13000g per 10 minuti, per permettere agli istoni di depositarsi sulle pareti, dove essi formano un film sottile. Dopo l'eliminazione del surnatante, sono stati effettuati lavaggi e successive centrifughe con 900 µl di acetone (+ 0.1% HCl in prima istanza) in modo da togliere l'acido tricloroacetico; i campioni sono poi stati fatti asciugare e sono stati risospesi in 100 µl di H₂O pura. Gli istoni vengono quantificati tramite diversi passaggi, che richiedono caricamento con Sample Buffer 5X e corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide (4-20% o 8-16%) e incubazione di 2 ore in Coomassie per la colorazione delle proteine, a cui segue *destaining* overnight tramite apposita soluzione (50% metanolo, 40% H₂O, 10% acido acetico). Il gel, lavato in acqua, viene poi fotografato e l'intensità relativa delle bande rilevate è quantificata con ImageJ.

10 Western Blot

I lisati proteici o istonici, dopo aggiunta di SB 5X, sono stati bolliti a 100° per 5 minuti e fatti correre in un gel di poliacrilammide (4-12%, 4-20% o 8-16% a seconda del peso della specie da individuare) a 120V, in adeguato *running buffer* (MOPS o MES). Le proteine sono state poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa a 100V per 1.20h a 4°C, utilizzando un tampone costituito da Tris (25mM), glicina (192mM), metanolo (20%) e acqua. La membrana è stata in seguito incubata con TBST (1M Tris-HCl a pH 7,4, 5M NaCl, 0,1% Tween 20) e proteine del latte (5%) o BSA (5%) per un'ora a temperatura ambiente, in modo da bloccare i siti di legame aspecifici. La membrana è stata poi lavata e incubata *overnight* con gli anticorpi primari specifici per le proteine o gli istoni da individuare (tabella seguente). Dopo qualche lavaggio con TBST, si è proceduto con l'incubazione per un'ora con

anticorpi secondari coniugati all'enzima HRP (horseradish peroxidase). La membrana è stata infine sviluppata con il substrato di HRP (luminolo, in presenza di H₂O₂) ed è stata rilevata la chemiluminescenza delle bande (ECL, Pierce).

Anticorpo primario		Anticorpo secondario	
Ac anti- vinculina (Merck, V4505)	1:1000	Anti-mouse IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti-actina (CST, 8226)	1:5000	Anti-mouse IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti- H3K27Ac (Abcam, Ab347B)	1:1000	Anti-human IgG HRP-conjugated	1:2000
Ac anti-panAc-H4(Abcam, Ab199554)	1:5000	Anti-rabbit IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti-H4(Abcam; Ab4815)	1:1000	Anti-rabbit IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti-ERK (CST; 4754)	1:2000	Anti-rabbit IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti-AKT (Abcam; Ab191481)	1:2000	Anti-rabbit IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti-DRP1(Abcam; Ab2265)	1:1000	Anti-mouse IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti-pAKT (S473) (CST, 4060)	1:1000	Anti-rabbit IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti-pDRP1(S616) (CST, 3455S)	1:1000	Anti-mouse IgG HRP-conjugated	1:5000
Ac anti-pERK (T202/Y204-T185/Y187; CST, 9101S)	1:2000	Anti-rabbit IgG HRP-conjugated	1:5000

11. Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica immunoistochimica impiegata per individuare, in un contesto tissutale o cellulare, la presenza di particolari antigeni, mediante impiego dei rispettivi anticorpi primari legati a fluorocromo (molecola

che sotto l'azione di raggi ultravioletti emette luce colorata) o associati ad anticorpi secondari fluorescenti.

Per prima cosa, si semina il numero desiderato di cellule (circa 20.000/vetrino) direttamente su *coverslip* sterili, messe poi in piastra di coltura; dopo eventuali trattamenti e una volta che le cellule sono adese al vetrino, si può aspirare il terreno dai pozzetti, lavare con PBS e fissare i campioni con circa 1ml di PFA 4% per 10 minuti. Dopo un altro lavaggio si procede con la permeabilizzazione delle cellule tramite PBS + Triton 0,1%, incubando per non più di 10 minuti. Vi è poi la saturazione dei siti aspecifici mediante incubazione con una *blocking solution*, solitamente CS al 3% in PBS, per 30 minuti. Le *coverslip* sono quindi trasferite in cameretta umida, dove viene aggiunta la miscela di anticorpi primari, disciolti in concentrazione adeguata in *blocking solution*. Dopo incubazione overnight a 4°C, i campioni vengono lavati ed esposti per 1 ora alla miscela di anticorpi secondari per l'immunofluorescenza, diluiti 1:1000 in *blocking solution*; successivamente si colorano i nuclei tramite incubazione con Hoechst diluito 1:10.000 in PBS e tenuto al buio. Una volta effettuati dei lavaggi con acqua MilliQ, si possono montare le *coverslip* sui vetrini portaoggetto per la visualizzazione delle cellule al microscopio.

12 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono svolte con il software GraphPad Prism7. Le variabili in oggetto sono state confrontate tra due o più gruppi tramite test ANOVA a due vie. Il confronto tra 2 gruppi è stato effettuato mediante test non parametrico di Mann-Whitney, assumendo che i valori provenienti dalle due popolazioni abbiano distribuzione continua. I risultati sono ritenuti significativi per p value <0.05 (*), <0.01 (**) e <0.001 (***).

RISULTATI

1. MDIVI-1

1.1 Inibizione della frammentazione mitocondriale

È stato suggerito che KRAS mutato possa promuovere la carcinogenesi pancreatica stimolando la frammentazione mitocondriale, tramite attivazione di ERK1/2 per la fosforilazione e il reclutamento in sede di fissione di DRP1. Conformemente a questa ipotesi, con un'estesa analisi immunofluorimetrica abbiamo osservato un *network* mitocondriale significativamente più frammentato nel pancreas epiteliale pre-neoplastico di modelli murini di PDAC (KC: Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}) rispetto ai topi *wildtype* (WT) (Fig. 9).

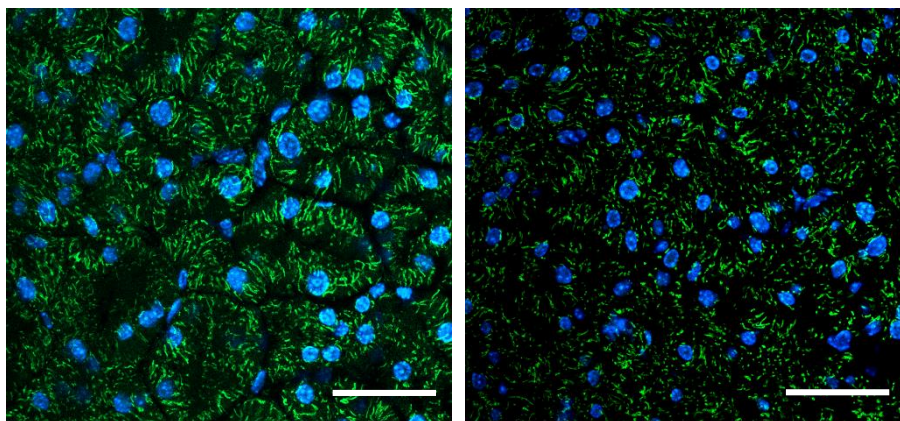


Fig.9. A confronto, le reti mitocondriali di cellule murine WT (a sinistra) e KC (a destra), evidenziate in immunofluorescenza. Verde: TOM20, mitocondri; blu: Hoechst, nuclei. La barra dimensionale corrisponde a 50μm

In questo caso, topi WT o KC sono stati sacrificati in giovane età (7 settimane), prima della comparsa di lesione neoplastiche nei KC; i pancreas sono quindi stati prelevati, fissati in formalina, e inclusi in paraffina per successiva analisi. Il profilo mitocondriale è stato ottenuto evidenziando nelle fettine di tessuto una proteina abbondantemente espressa nella membrana mitocondriale esterna, TOM20. L'analisi del *fusion index* ha confermato una maggiore frammentazione mitocondriale nei pancreas esprimenti KRAS^{G12D}.

Ne abbiamo dedotto che KRAS mutato induce una iper-fissione dei mitocondri, e abbiamo ipotizzato che questo possa giocare un ruolo importante nella sua attività oncogenica.

Al fine di verificare questa ipotesi e studiare le conseguenze molecolari della frammentazione mitocondriale in cellule epiteliali pancreatiche, ci siamo spostati su modelli cellulari, dove abbiamo applicato un inibitore ben caratterizzato di DRP1, noto come Mdivi-1.

Abbiamo inizialmente utilizzato un modello cellulare molto vicino al pancreas dei topi KC. Per questo abbiamo messo in coltura cellule primarie da topi KC anziani (4 mesi), che derivano con tutta probabilità da lesioni preneoplastiche di tipo PanIN: tali cellule si mantengono in coltura per diversi passaggi, e le chiameremo “cellule KC”.

Queste sono dunque state trattate con Mdivi-1 50 μ M per valutare la funzionalità del composto nell’inibire la fissione mitocondriale: un’immunofluorescenza per TOM20 rivela che l’agente farmacologico svolge efficacemente la sua funzione *in vitro*. Si nota infatti una minor frammentazione dei mitocondri nelle cellule trattate rispetto a quelle di controllo (a cui è stata somministrata una pari quantità di dimetilsolfossido, o DMSO) (Fig.10)

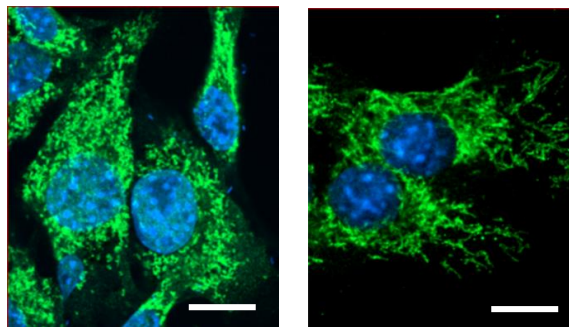


Fig.10. Ingrandimento dell’IF condotta su KC trattate con DMSO (sinistra) e Mdivi-1 (destra). Verde: TOM20, mitocondri; blu: Hoechst, nuclei. La barra dimensionale corrisponde a 10 μ m.

1.2 Mdivi-1 inibisce l’ADM e la proliferazione cellulare

Una volta confermata l’efficacia di Mdivi-1, è stato valutato l’effetto dell’inibizione della fissione mitocondriale nella tumorigenesi e nella crescita di PDAC: è stata

quindi esaminata da una parte la metaplasia acino-duttale (ADM) e dall'altra il tasso proliferativo di cellule tumorali trattate con Mdivi-1.

Nel primo caso, acini estratti da pancreas murini KC sono stati messi in coltura con apposito terreno e incorporati in una specifica matrice in gel: dalle immagini rilevate dopo 5 giorni si è notata una chiara tendenza degli acini trattati con Mdivi-1 a mantenere la caratteristica morfologia acinosa, rispetto a quelli di controllo che erano propensi ad entrare in metaplasia e ad assumere così un fenotipo duttale (Fig. 11). L'inibizione farmacologica della frammentazione mitocondriale sembrerebbe quindi ridurre la plasticità cellulare e contenere l'ADM. Questo risultato suggerisce altresì che la frammentazione mitocondriale indotta da KRAS mutato possa promuovere l'iniziazione della carcinogenesi, come ipotizzato.

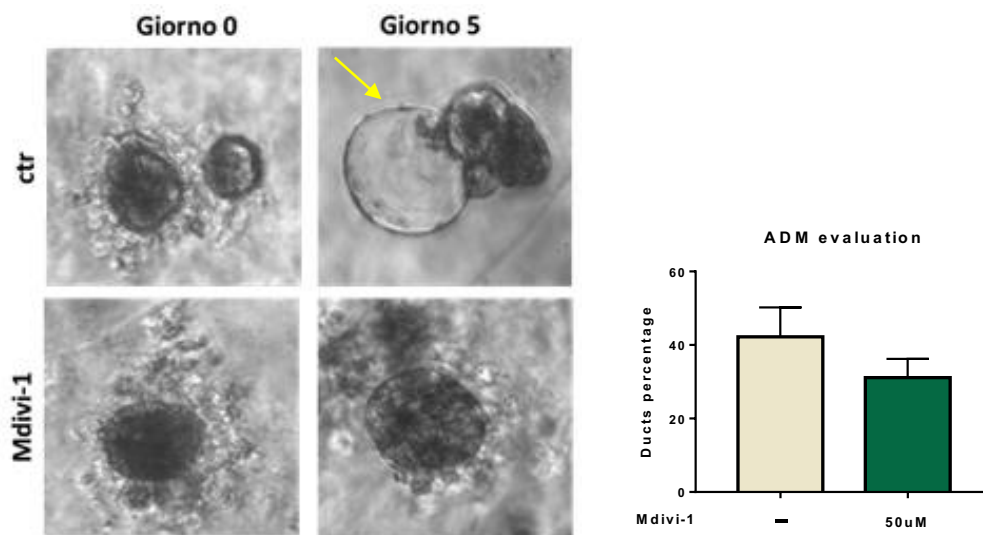


Fig. 11. Valutazione dell'ADM di acini pancreatici murini in coltura: la freccia gialla indica una struttura duttale. A destra il grafico indica la percentuale di dotti osservata in entrambe le condizioni testate.

Per testare invece l'impatto di Mdivi-1 su altri stadi della progressione tumorale, è stato preso in considerazione il tasso proliferativo di diverse linee cellulari tumorali, sia murine che umane, trattate appunto con Mdivi-1 (Fig.12): dai seguenti grafici si deduce che la proliferazione cellulare diminuisce parallelamente all'aumento di concentrazione dell'agente farmacologico. Anche linee cellulari non tumorali (KRAS WT), come le *human pancreatic ductal epithelial cells*, o HPDE, mostrano questa tendenza: ciò potrebbe essere dovuto a un'incompleta

specificità del composto o potrebbe indicare una particolare sensibilità delle cellule pancreatiche duttali ad alterazioni del loro network mitocondriale.

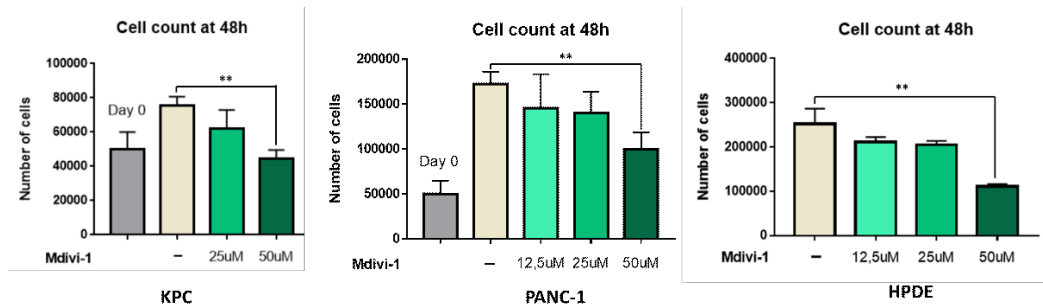


Fig. 12. Conta a 48 ore di cellule KPC, PANC-1 e HPDE, trattate con DMSO (controllo) e Mdivi-1 a concentrazioni 12,5µM, 25µM e 50µM.

Dall'insieme di questi esperimenti, concludiamo che la soppressione farmacologica di DRP1 impatta diverse fasi della carcinogenesi pancreaticca. Dato che i meccanismi rimangono poco chiari, ci prefissiamo di valutare l'impatto sul metabolismo dell'acetyl-CoA che gioca un ruolo chiave sia nella metaplasia acino-duttale (contribuendo a una riorganizzazione dell'epigenoma) sia nella proliferazione tumorale (contribuendo alla sintesi dei lipidi).

1.3 Valutazione dell'acetilazione istonica e della sintesi degli steroli

È stato precedentemente descritto come l'aumentata sintesi degli steroli e la riprogrammazione epigenetica delle cellule acinose abbiano un fondamentale ruolo nella carcinogenesi pancreaticca, tanto che la loro inibizione risulta nell'arresto di questo fenomeno [22]. Dal momento che entrambi questi processi contribuiscono in maniera sostanziale alla metaplasia acino-duttale, e considerato che questa è ridotta *in vitro* a seguito di trattamento con Mdivi-1, ci si è posti il quesito se tale agente farmacologico interferisse con l'ADM alterando appunto la sintesi del colesterolo o l'acetilazione istonica alla base dei cambiamenti epigenetici cellulari.

Innanzitutto, è stato condotto un Western Blot su istoni estratti da PANC-1 (linea cellulare di PDAC umano) trattate con concentrazioni crescenti di Mdivi-1 (Fig.13). Come si nota in figura, i livelli di acetilazione totali dell'istone 4 (panAc-H4) e della lisina 27 nell'istone 3 (H3K27) diminuiscono in concomitanza con l'aumento delle concentrazioni dell'inibitore di DRP1. L'istone H4 è stato utilizzato come normalizzatore di caricamento.

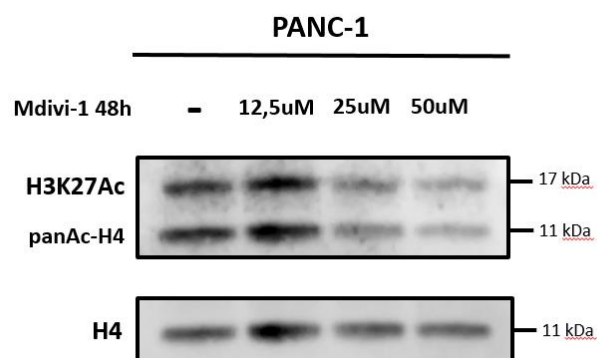


Fig.13. Western Blot su lisati istonici estratti da PANC-1 dopo 48 ore di trattamento con Mdivi-1

Ne concludiamo che la frammentazione mitocondriale favorisce l'iper-acetilazione delle proteine istoniche in PDAC, probabilmente aumentando la quantità di acetil-CoA disponibile per reazioni di acetilazione nel nucleo.

Purtroppo, l'acetil-CoA è un metabolita notoriamente labile e difficile da quantificare. Una misurazione accurata è possibile solo con metodologie di spettrometria di massa accoppiate con marcatura isotopica (Trefely, Mol Cell, 2022), che non erano disponibili in laboratorio durante il mio internato.

Per comprendere se il trattamento con Mdivi-1 alteri i valori cellulari di acetil-CoA, è stato quindi valutato il contenuto intracellulare di colesterolo, tramite *staining* con una sonda fluorescente detta Filipin, un antibiotico che lega questo sterolo in maniera specifica permettendone la visualizzazione al microscopio (fig.14): come precedentemente discusso, infatti, il colesterolo in cellule PDAC è particolarmente sensibile a concentrazione citoplasmatiche di acetil-CoA. Sorprendentemente, in entrambe le linee cellulari utilizzate nell'esperimento è evidente l'aumento di

fluorescenza nei campioni trattati con Mdivi-1, che riflette un significativo incremento del *pool* cellulare di colesterolo rispetto ai campioni di controllo.

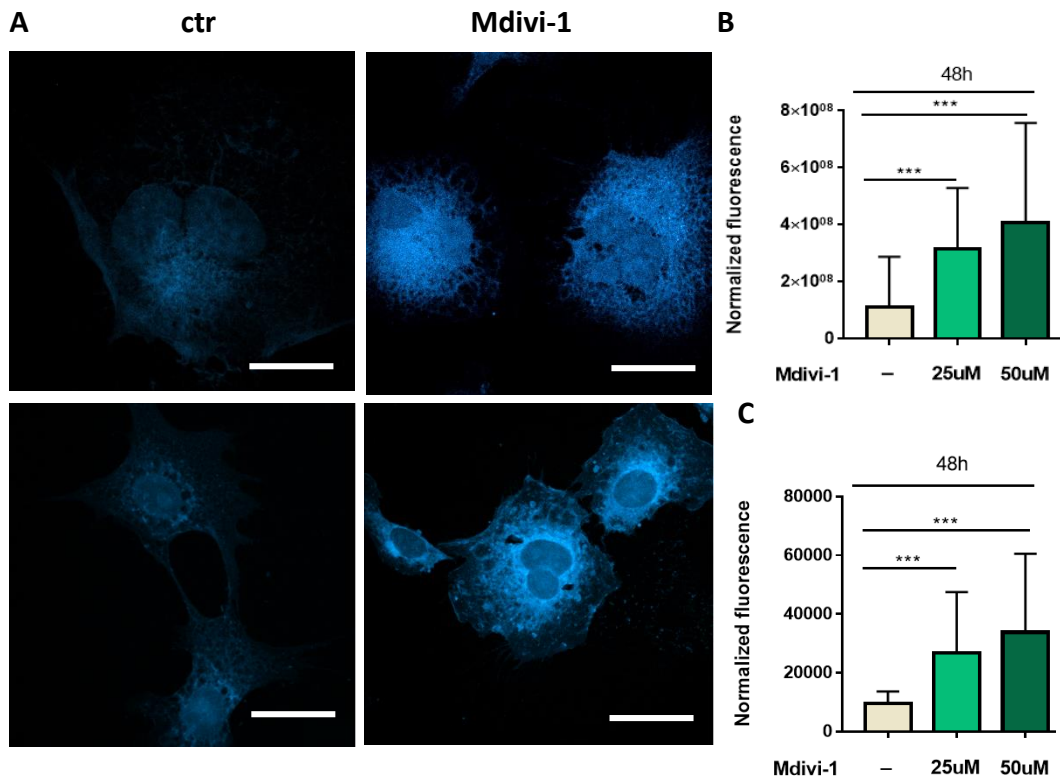


Fig.14. (A) Staining di colesterolo con Filipin su KPC (sopra) e PANC-1 (sotto): a confronto, i controlli e i campioni trattati per 48 ore con Mdivi-1 50μM. A destra, i grafici di quantificazione delle relative fluorescenze (B e C). La barra dimensionale corrisponde a 20μm

Nel complesso, questi esperimenti suggeriscono che l'inibizione di DRP1 interferisce drasticamente sulla produzione e utilizzo dell'acetil-CoA: in particolare, riteniamo che la frammentazione mitocondriale possa influenzare notevolmente come la cellula decida di impiegare le molecole di acetil-CoA a disposizione, rendendole preferenzialmente disponibili per reazioni di acetilazione.

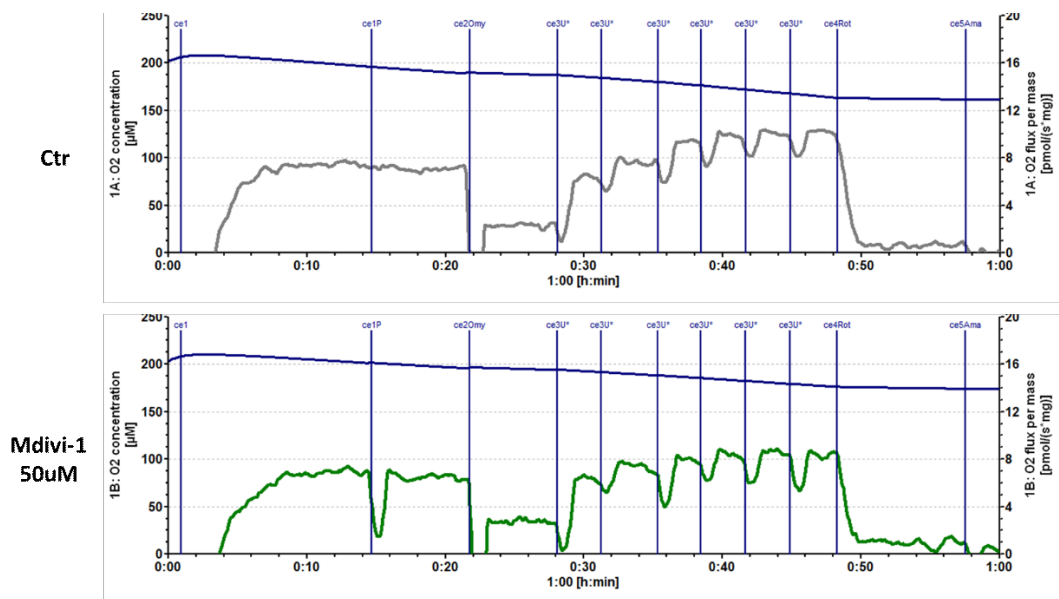
Al fine di comprendere meglio le alterazioni metaboliche guidate dalla frammentazione mitocondriale, abbiamo analizzato alcuni processi essenziali nel metabolismo del glucosio.

1.4 Effetti su fosforilazione ossidativa e glicolisi

I risultati sopra riportati mostrano che l'inibizione della frammentazione mitocondriale causa una diminuzione dell'acetilazione istonica e un accrescimento della quantità di colesterolo cellulare *in vitro*. Questi processi epigenetici e metabolici hanno alla base un comune precursore, ovvero l'acetil-CoA: esso è per lo più sintetizzato dall'enzima ACLY a partire dal citrato, un intermedio del ciclo di Krebs che viene esportato dai mitocondri al citosol.

Considerato anche lo stretto legame tra dinamiche mitocondriali e l'attività metabolica di questi organelli, è stato studiato l'effetto di Mdivi-1 su uno dei processi più rilevanti che avvengono nei mitocondri, ovvero la fosforilazione ossidativa. È stata quindi condotta una respirometria ad alta risoluzione su PANC-1 trattate con DMSO (controllo) e Mdivi-1 50μM, grazie all'impiego dello strumento Oroboros O2k, che permette di misurare la quantità di ossigeno consumato dalla respirazione cellulare.

Dal confronto dei tracciati ottenuti si evince che nelle PANC-1 in cui è stata farmacologicamente inibita la fissione mitocondriale la fosforilazione ossidativa è ridotta: le differenze rispetto al controllo si osservano soprattutto per quel che riguarda la respirazione mitocondriale legata all'ATP e la respirazione massimale (Fig. 15).



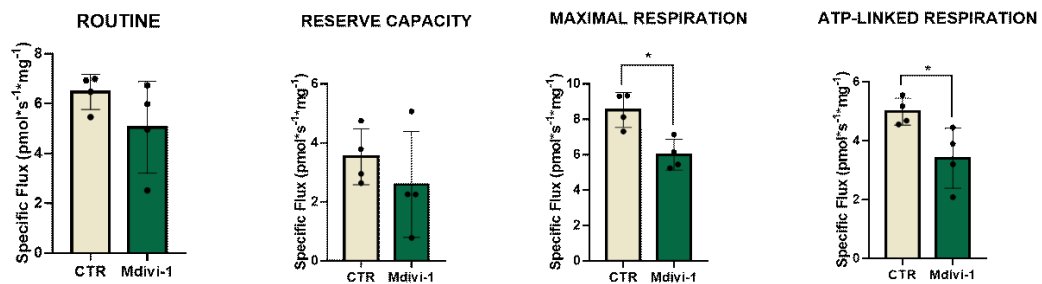


Fig.15. Sopra, i grafici ottenuti dalla respirometria ad alta risoluzione effettuata su PANC-1 trattate e di controllo (le linee blu indicano la concentrazione di ossigeno in diminuzione nelle camerette, le linee grigia e verde rappresentano il flusso di O₂ normalizzato sulla massa cellulare). Sotto, la quantificazione delle diverse attività di respirazione mitocondriale.

Sempre nell'ambito metabolico, è stato analizzato l'effetto di Mdivi-1 sul tasso glicolitico cellulare: è stato perciò quantificato il prodotto finale della glicolisi anaerobia, ovvero il lattato, secreto nel terreno di coltura dalle PANC-1 trattate o meno. Grazie ad un saggio per il rilevamento bioluminescente del lattato, è stato osservato che il flusso glicolitico aumenta sensibilmente in caso di inibizione della frammentazione mitocondriale (Fig.16).

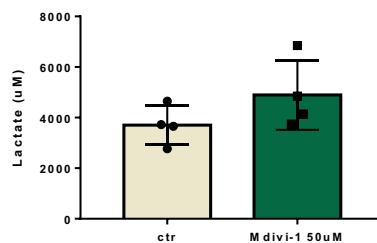


Fig.16. Concentrazione di acido lattico presente in colture cellulari di PANC-1 trattate con DMSO (controllo) e Mdivi-1 50μM.

Nell'insieme, i saggi metabolici da noi compiuti indicano che inibendo DRP1 in cellule epiteliali del pancreas risulta diminuita la funzione mitocondriale, con conseguente conversione del piruvato in lattato. Ciò suggerisce quindi un modello in cui la frammentazione mitocondriale viene indotta da KRAS mutato al fine di aumentare l'attività mitocondriale e l'ossidazione del piruvato, un fenomeno che, seppur contrario al noto *Warburg Effect*, è stato già riportato in diversi contesti legati alla carcinogenesi pancreatica, in particolare alla metaplasia degli acini.

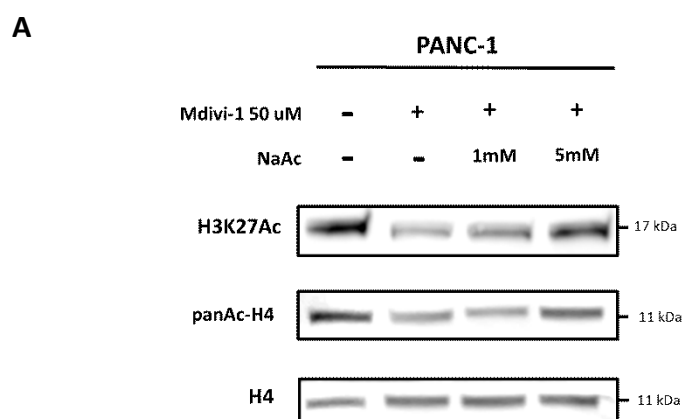
Essendo l'acetil-CoA destinato all'acetilazione degli istoni principalmente di derivazione mitocondriale, questi dati sembrano in linea con la nostra ipotesi iniziale.

1.5 L'acetato come fonte alternativa di acetil-CoA

Ci siamo chiesti se l'effetto di Mdivi-1 potesse essere legato ad un'azione diretta sul *pool* di acetil-CoA derivato dal citrato mitocondriale. Come prima accennato, l'acetil-CoA citosolico viene prodotto principalmente dagli enzimi ACLY ed acetil-CoA sintetasi 2 (ACSS2): quest'ultimo lo sintetizza a partire dall'acetato, che viene importato nel citosol dall'ambiente extracellulare. Appurato che Mdivi-1 effettivamente diminuisce il metabolismo mitocondriale (e quindi la via dell'ACLY), abbiamo sfruttato la via dell'ACSS2 per ripristinare i normali livelli di acetil-CoA. È stato allora fornito sodio acetato (NaAc) in quantità molto elevate (sovra-fisiologiche) a PANC-1 trattate con Mdivi-1, in modo da verificare se questo supplemento compensasse gli effetti dell'inibizione farmacologica di DRP1 su acetilazione istonica e proliferazione cellulare.

Un Western Blot condotto su istoni estratti da PANC-1 dopo trattamento di 48 ore con Mdivi-1 50 μ M e NaAc (1mM e 5mM) mostra che i normali livelli di acetilazione di H3K27 e H4 sono parzialmente ripristinati con l'aggiunta di acetato ad elevate concentrazioni (Fig. 17 A).

D'altra parte, saggi di proliferazione effettuati su PANC-1 e KPC non riportano particolari effetti di NaAc sull'espansione di queste linee cellulari tumorali, la cui crescita viene sempre inibita dal trattamento con Mdivi-1 (Fig. 17 B e C).



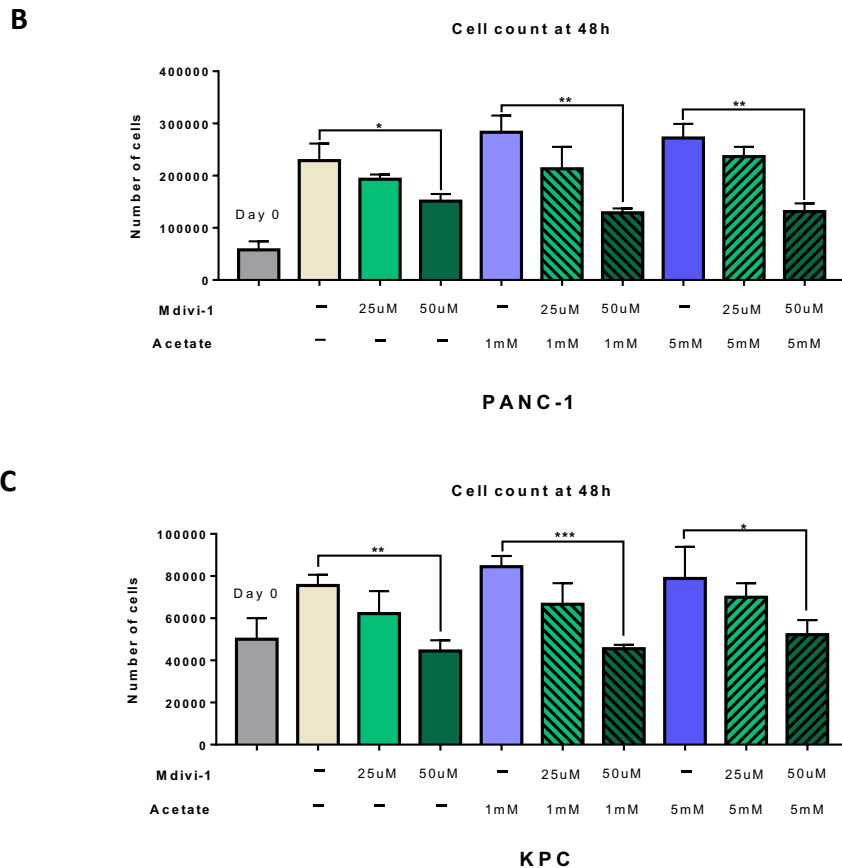


Fig. 17. (A): Western Blot su lisati istonici estratti da PANC-1 dopo 48 ore di trattamento con Mdivi-1 e/o NaAc. L'istone H4 è stato utilizzato come *housekeeping*. (B), (C): conta a 48 ore di cellule PANC-1 e KPC trattate con Mdivi-1 e /o NaAc. In entrambi gli esperimenti, ai campioni di controllo è stato somministrato DMSO.

Questo ci fornisce diverse indicazioni.

Innanzitutto, l'effetto di Mdivi-1 sull'acetilazione istonica è realmente legato alla produzione *de novo* di acetil-CoA, che è regolata in maniera cruciale dall'organizzazione del network mitocondriale.

In secondo luogo, la capacità delle cellule pancreatiche di metabolizzare l'acetato è piuttosto ridotta, e limitata a dosi ben più elevate delle concentrazioni fisiologiche di questo elemento nel plasma.

Infine, l'effetto anti-proliferativo di Mdivi-1 sembra essere indipendente dal metabolismo dell'acetil-CoA, legato probabilmente alla sintesi di qualche altro metabolita essenziale alla proliferazione cellulare.

Questi tre aspetti verranno testati indipendentemente in studi di follow-up.

2. COTININA

2.1 La cotinina stimola la proliferazione cellulare

Vari studi riportano che il fumo di sigaretta promuove la carcinogenesi pancreatica, in particolare attraverso l'azione della nicotina: è stato quindi valutato l'effetto del metabolita principale di tale alcaloide, la cotinina, sulle fasi di inizio e crescita di PDAC. Particolare attenzione è stata prestata all'effetto di quest'ultima sulle dinamiche mitocondriali.

I grafici sottostanti (Fig. 18) mostrano i risultati dell'esame di metaplasia acinoduttale condotta su acini pancreatici estratti da topi *wildtype*: le colture *in vitro* sono state trattate con diverse concentrazioni di cotinina (2 μ M e 4 μ M), corrispondenti ai livelli che si riscontrano nel plasma di fumatori quotidiani, e con Mdivi-1 50 μ M. La cotinina pare non favorire l'ADM, né in assenza né in presenza di Mdivi-1, che invece attenua in maniera indipendente la tendenza degli acini a transdifferenziare.

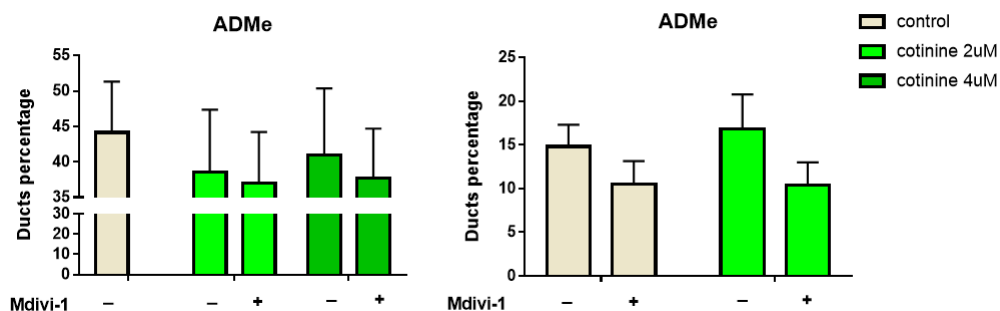


Fig. 18. Valutazione dell'ADM di acini pancreatici murini in coltura: i grafici indicano la percentuale di dotti osservata in entrambe le repliche biologiche.

In merito allo sviluppo di PDAC, invece, l'effetto della cotinina diventa apprezzabile: i saggi di proliferazione condotti su linee cellulari murine e umane, sia in colture bidimensionali che tridimensionali, rivelano infatti che la cotinina stimola l'espansione delle cellule tumorali (Fig. 19 A).

È stato inoltre mostrato che tale metabolita esercita la sua azione grazie a legame con recettori nicotinici per l'acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR), espressi dalle cellule pancreatiche a livello della membrana plasmatica: per verificare che questo sia effettivamente il meccanismo con cui la cotinina stimola la proliferazione cellulare,

è stata effettuata una conta a 48 ore di PANC-1 trattate con DMSO (controllo), cotinina e/o mecamilamina, un inibitore non competitivo dei recettori nicotinici. Si può notare che la somministrazione di mecamilamina riporta il tasso proliferativo cellulare ai livelli del controllo, contrastando l'azione della cotinina: l'esperimento ha confermato dunque l'ipotesi di partenza (Fig. 19 B).

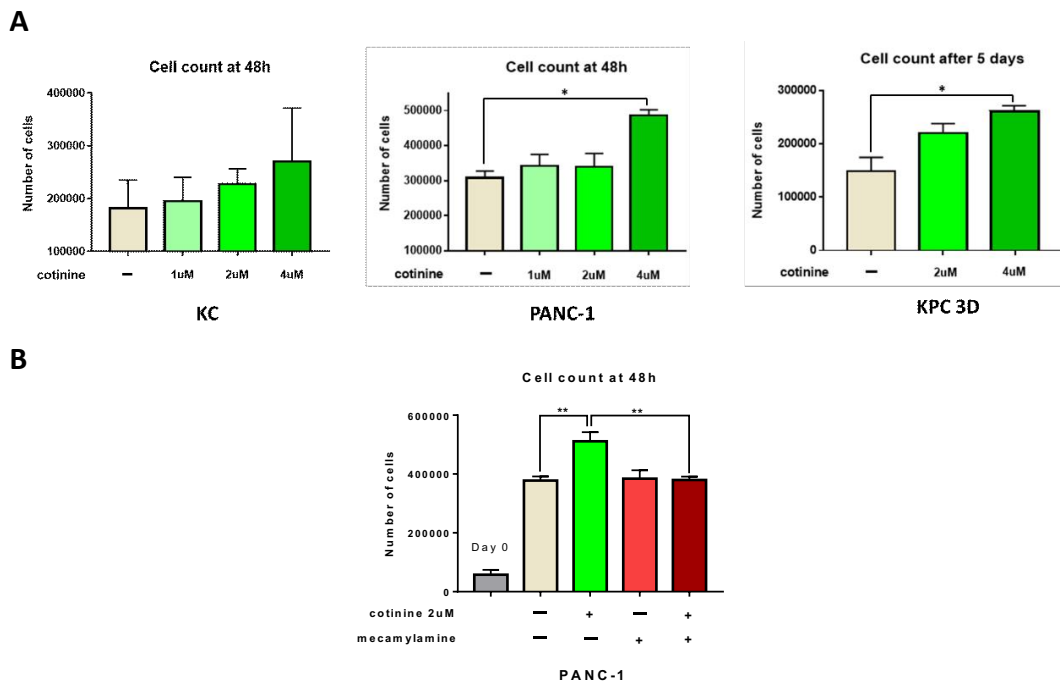


Fig. 19. (A): Conta a 48 ore (KPC, PANC-1) e a 5 giorni (KPC 3D) di cellule trattate con DMSO (controllo) e cotinina a concentrazioni 1μM, 2μM e 4μM. (B): Conta a 48 ore di PANC-1 trattate con DMSO (controllo), cotinina 2μM e/o mecamilamina 10μM.

2.2 Signaling recettoriale: ERK e AKT non sono attivati

Dal momento che la cotinina lega i recettori nicotinici per l'acetilcolina, ci si attende che vengano attivate cascate di segnalazione intracellulare quando tali recettori sono ingaggiati da questo ligando. Tra gli attori principali dei *pathway* a valle di nAChR ci sono ERK1/2 e AKT, che, una volta fosforilate, possono agire sui loro target.

Sono stati effettuati Western Blot per valutare eventuali cambiamenti nella fosforilazione (e quindi nell'attivazione) di queste due proteine, dopo stimolazione delle cellule in coltura con cotinina 2μM. Dopo il trattamento, sono stati estratti i

lisati proteici totali da KC a diverse tempistiche e sono state rapportate le quantità delle forme fosforilate di ERK e AKT (pERK, pAKT) con le loro quantità totali. Non sono però emerse particolari differenze che mostrino l'attivazione di queste vie di segnalazione da parte della cotinina (Fig.20). Verrà in futuro testato il coinvolgimento di altre vie di trasmissione del segnale, in particolare la via dell'AMP ciclico, spesso associato a trasduzione dell'attivazione di recettori nicotinici. Per il momento, ci siamo concentrati sul descrivere l'impatto ultimo della somministrazione di cotinina sul metabolismo cellulare.

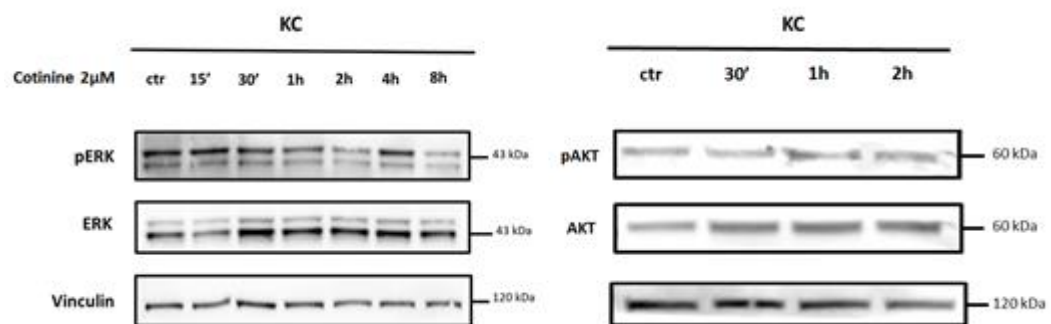


Fig. 20. Western Blot su lisati proteici totali estratti da KC: i livelli di pERK e pAKT appaiono stabili. La vinculina è stata utilizzata come *housekeeping*.

2.3 La cotinina non promuove la frammentazione mitocondriale

Sebbene la cotinina non sembri stimolare le vie di segnalazione di ERK e AKT, che tra gli altri bersagli presentano DRP1, è stato verificato se questo metabolita avesse comunque effetto sulle dinamiche mitocondriali. Questa ipotesi è supportata da studi che associano la nicotina a un'aumentata frammentazione della rete mitocondriale, per stimolazione indiretta dell'espressione di DRP1 e un'accentuata degradazione proteasomica delle mitofusine, come discusso nella sezione introduttiva.

Immunofluorescenze condotte su cellule KC trattate con diverse concentrazioni di cotinina, tuttavia, non mostrano significative alterazioni nel *network* mitocondriale; allo stesso modo, Western Blot effettuati su lisati totali di KC, trattate con cotinina 1μM, 2μM e 4μM, non evidenziano cambiamenti nella quantità di DRP1 attivato (pDRP1, serina 616) (Fig. 21).

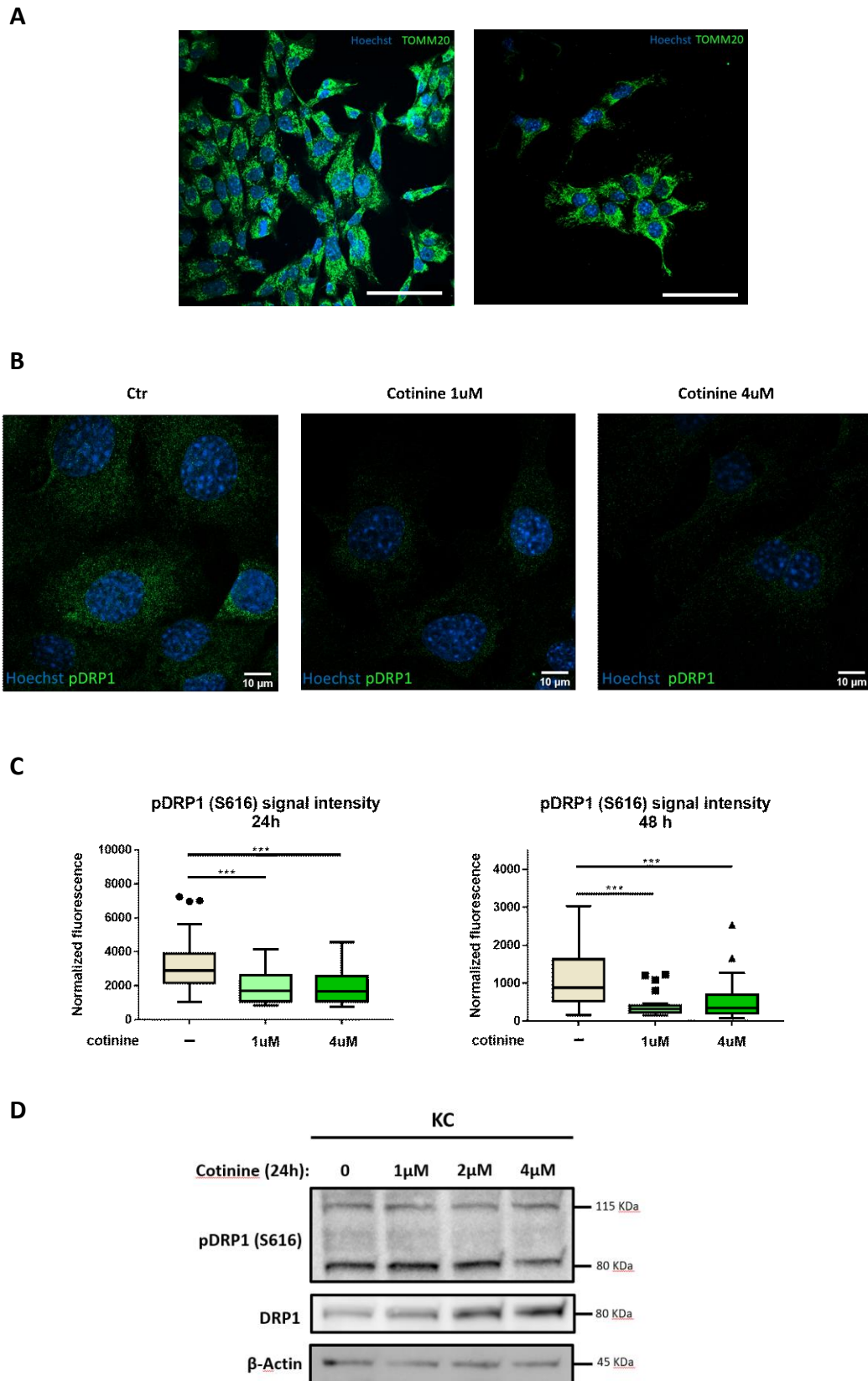


Fig. 21. (A) e (B): IF condotta su KC trattate con DMSO (sinistra) e cotinina (destra). (A): Verde: TOM20, mitocondri; blu: Hoechst, nuclei. La barra dimensionale corrisponde a 50µm. (B). Verde:

pDRP1 (S616) mitocondriale; blu: Hoechst, nuclei. La barra dimensionale corrisponde a 10µm. (C): Quantificazione della fluorescenza di pDRP1 (S616) nell'IF sopra riportata. (D) Western Blot su lisati proteici totali estratti da KC trattate a 24 ore con concentrazioni crescenti di cotinina. La β -actina è stata utilizzata come *housekeeping*.

2.4 La fosforilazione ossidativa rimane invariata

Ci si è perciò chiesti se la cotinina avesse qualche effetto a livello sull'attività mitocondriale: la respirometria ad alta risoluzione condotta su PANC-1 trattate con cotinina non sembra però evidenziare variazioni nell'efficienza con cui le cellule effettuano la fosforilazione ossidativa (Fig. 22).

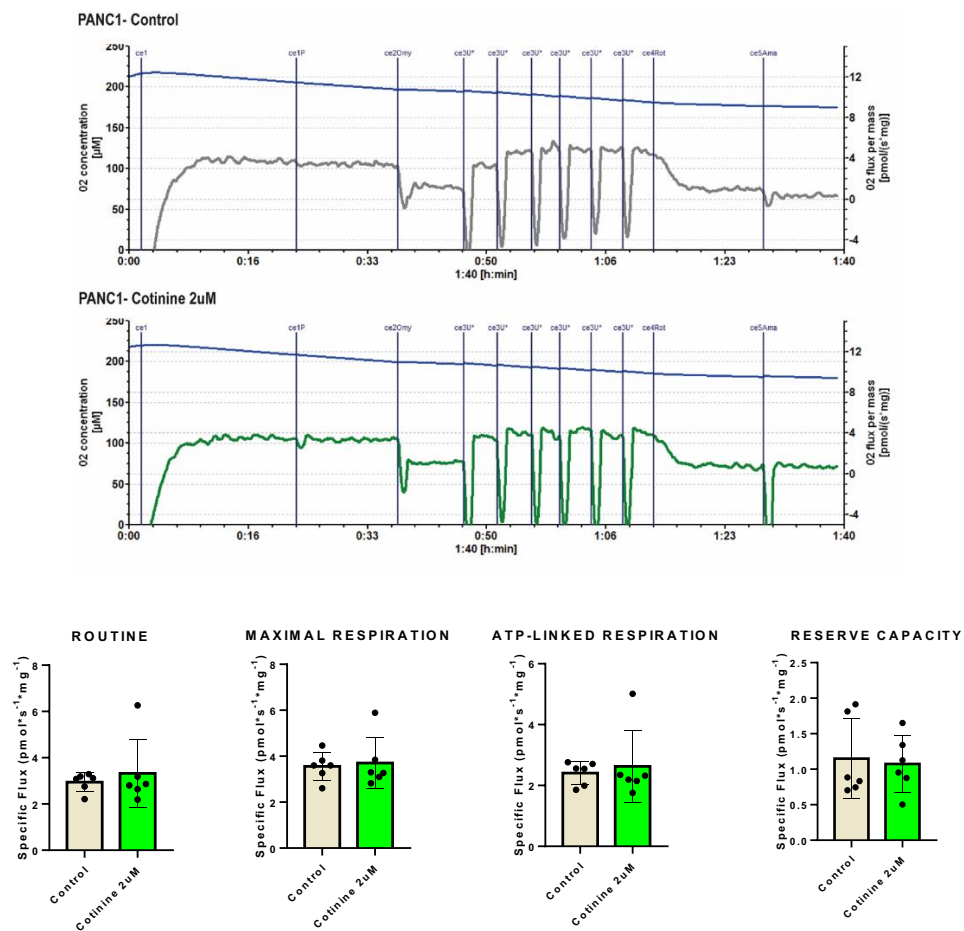


Fig. 22. Sopra, i grafici ottenuti dalla respirometria ad alta risoluzione effettuata su PANC-1 trattate e di controllo (le linee blu indicano la concentrazione di ossigeno in diminuzione nelle camerette, le linee grigia e verde rappresentano il flusso di O₂ normalizzato sulla massa cellulare). Sotto, la quantificazione delle diverse attività di respirazione mitocondriale.

2.5 La cotinina aumenta la produzione di ROS

In seguito allo scarto delle ipotesi che la cotinina attivasse le vie di segnalazione di ERK e AKT e che influisse direttamente sulla respirazione cellulare e sulle dinamiche mitocondriali, ci si è chiesti come questa sostanza potesse stimolare la proliferazione delle cellule tumorali. Come descritto in precedenza, in PDAC e altri tumori si riscontrano elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno, che hanno effetti positivi sulla sopravvivenza e sull'espansione delle cellule neoplastiche: è stata perciò valutata con una sonda fluorescente la quantità intracellulare di ROS in PANC-1 e KPC trattate con concentrazioni crescenti di cotinina, ed è stato rilevato un notevole aumento di queste specie chimiche nei campioni trattati rispetto ai controlli (Fig. 23). Questo sembrerebbe indicare una potenziale via attraverso cui la cotinina può promuovere la crescita tumorale, dato che livelli intermedi di specie reattive dell'ossigeno sono spesso associati ad aumentata proliferazione neoplastica.

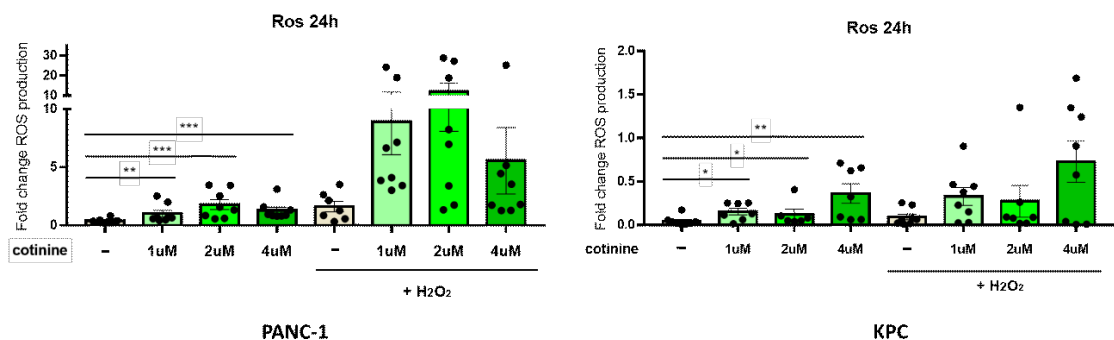


Fig. 23. Quantificazione di ROS cellulari tramite specifica sonda fluorescente (diclorofluoresceina).

Considerata quindi la possibilità che il metabolita nicotinico stimoli l'espansione cellulare tramite aumento della produzione di ROS, è stato effettuato un saggio di proliferazione per determinare se l'aggiunta di un agente ad attività antiossidante diminuisse l'espansione indotta dalla cotinina in KC e PANC-1. Queste linee tumorali sono dunque state trattate con il metabolita nicotinico e con N-acetilcisteina (NAC), un agente riducente che tende a limitare i livelli di specie

reattive dell'ossigeno. I dati ottenuti, tuttavia, rivelano che NAC non è efficace nel contrastare l'azione della cotinina *in vitro* (Fig. 24).

Questo suggerisce che l'aumentata produzione di ROS sia per lo più un epifenomeno del trattamento con cotinina, non direttamente legato all'effetto pro-proliferativo di quest'ultima.

Rimane quindi da elucidare come la cotinina eserciti la sua azione sulle cellule tumorali pancreatiche: stiamo al momento testando altri mediatori a valle del recettore nAChR. Il meccanismo sembra non essere legato ad evidenti alterazioni metaboliche, anche se non si può escludere un coinvolgimento della omeostasi del calcio (o altri ioni, come il ferro o il selenio). La supplementazione con cotinina potrebbe comunque avere delle conseguenze su vie metaboliche che determinano la produzione di ROS, quali il catabolismo lipidico, il catabolismo delle poliamine, la regolazione di metaboliti che fungono da accettori di elettroni. Alcune di queste ipotesi verranno testate con analisi metabolomiche ed esperimenti mirati in studi di *follow up*.

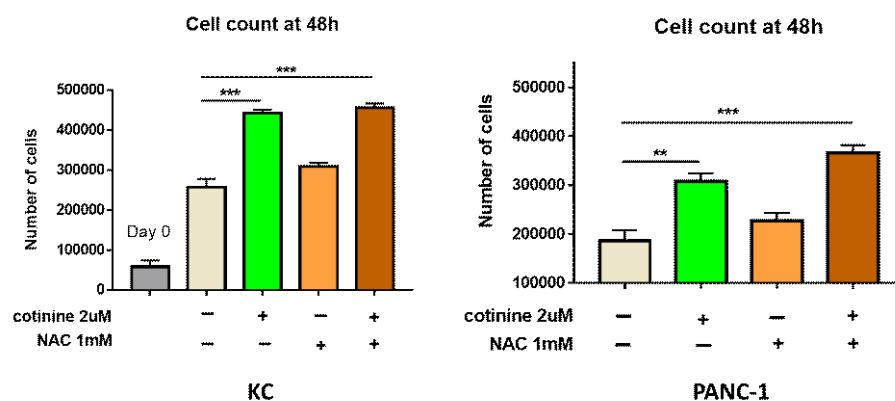


Fig. 24. Conta a 48 ore di KC e PANC-1 trattate con DMSO (controllo), cotinina 2μM e/o NAC 1mM.

DISCUSSIONE

L'adenocarcinoma pancreatico duttale è una neoplasia pancreatica maligna che i dati epidemiologici prevedono diventare la seconda causa più comune di morte per tumore entro la fine di questo decennio; è quindi fondamentale indagare sulle sue cause e sui meccanismi cellulari alla base della carcinogenesi di PDAC.

In questo studio ci siamo focalizzati soprattutto sugli effetti della frammentazione della rete mitocondriale delle cellule pancreatiche sull'insorgenza e la progressione del tumore. Ciò deriva dall'ipotesi sempre più accreditata che la mutazione attivante dell'oncogene *KRAS*, riscontrabile in più del 90% dei casi di PDAC, provoca una cascata fosforilativa incontrollata che porta anche al reclutamento sulla membrana mitocondriale della GTPasi citosolica DRP1, responsabile della segregazione (fissione) dei mitocondri stessi in unità organellari più piccole e mobili. In effetti, si può osservare una certa frammentazione del *network* mitocondriale sia in modelli cellulari di PDAC sia in cellule epiteliali pancreatiche di modelli murini esprimenti *KRAS* mutato, come mostrato da diversi studi e da noi confermato tramite analisi immunofluorimetriche: tale fenomeno non è da considerarsi un mero effetto collaterale della trasformazione tumorale, bensì un *driver* fondamentale della carcinogenesi pancreatica, che vede DRP1 come responsabile della tumorigenesi mediata da *KRAS*.^[30, 31]

È effettivamente comprensibile che alterazioni a carico della rete mitocondriale abbiano conseguenze così radicali e siano fortemente implicate nei processi di tumorigenesi: come accennato in precedenza, infatti, gli eventi di fusione e fissione che costituiscono le dinamiche mitocondriali regolano la morfologia di questo *network* adattandolo alle esigenze della cellula, e un loro disequilibrio varia inevitabilmente la funzionalità degli organelli che lo costituiscono. È altresì noto che i mitocondri svolgono innumerevoli ruoli all'interno della cellula, in quanto organelli bioenergetici e mediatori di vari processi metabolici, di *signaling*, di regolazione della sopravvivenza e della morte cellulare; dunque il loro supporto è necessario in un processo complesso come la trasformazione tumorale, che

prevede l'adeguamento della cellula a diverse condizioni e richieste metaboliche e biosintetiche.

Appurato che in PDAC c'è un notevole sbilanciamento delle dinamiche mitocondriali a favore della fissione e una conseguente frammentazione della rete di questi organelli, abbiamo indagato sulle conseguenze molecolari della fissione mitocondriale indotta da KRAS e di come queste siano funzionali all'insorgenza e allo sviluppo del tumore. Ci siamo concentrati su alterazioni metaboliche, che condizionano lo sviluppo e la crescita tumorale mediante diversi meccanismi tra cui riteniamo particolarmente interessante l'impatto sull'organizzazione cromatinica.

In primo luogo, abbiamo considerato un metabolita chiave, l'acetil-CoA, coinvolto sia nelle fasi iniziali della carcinogenesi (in quanto contribuisce a fondamentali riorganizzazioni epigenetiche, essendo in equilibrio con livelli globali di acetilazione delle proteine istoniche) sia nella proliferazione tumorale (dal momento che partecipa alla sintesi dei lipidi). L'acetil-CoA citosolico viene prodotto principalmente da due enzimi, uno dei quali, l'ATP-citrato liasi (ACLY), lo genera a partire dal citrato derivante dai mitocondri: è ragionevole che una maggior frammentazione mitocondriale impatti anche su questo metabolita, in quanto le concentrazioni assolute dei metaboliti di derivazione mitocondriale sono profondamente influenzate dallo stato del network. La localizzazione dei mitocondri, inoltre, determina fluttuazioni localizzate di acetil-CoA e ne influenza la disponibilità per i diversi processi biologici in cui è implicato.

I nostri esperimenti *in vitro*, basati sull'inibizione farmacologica del fattore di fissione DRP1, hanno infatti mostrato che la frammentazione del *network* mitocondriale influenza notevolmente la produzione e l'utilizzo dell'acetil-CoA, che viene così sfruttato preferenzialmente per reazioni di acetilazione a discapito di altri processi, come la sintesi di colesterolo. L'acetil-CoA è difatti il donatore del gruppo funzionale per l'acetilazione di residui amminoacidici, tra cui le lisine istoniche: quando ciò avviene, l'architettura cromatinica cambia e gli enzimi preposti alla trascrizione del DNA guadagnano l'accesso al loro substrato, modificando così l'espressione genica. Come evidenziato in precedenti studi, il

riarrangiamento dell'epigenoma determinato dall'elevato livello di acetilazione istonica supporta il primo step di tumorigenesi di PDAC, inducendo la metaplasia acino-duttale. L'ADM è in effetti un processo di transdifferenziazione delle cellule acinose pancreatiche, che iniziano ad assumere caratteristiche duttali, e costituisce l'evento iniziale per la generazione di lesioni pre-neoplastiche, in risposta a stimoli ambientali o oncogenici. I saggi di valutazione dell'ADM che abbiamo effettuato confermano l'ipotesi che la frammentazione mitocondriale, indotta dal signaling oncogenico di KRAS mutato, favorisce la plasticità cellulare e quindi l'ADM.

I riarrangiamenti epigenetici che avvengono durante la trasformazione tumorale non sono però l'unica caratteristica che contraddistingue la carcinogenesi: come già specificato, le cellule tumorali in iper-proliferazione hanno elevate esigenze energetiche e biosintetiche, e si trovano d'altra parte a sopravvivere e ad espandersi in condizioni di scarsità di ossigeno e nutrienti. È in gran parte compito dei mitocondri, quindi, favorire l'adattamento delle cellule tumorali riprogrammandone il metabolismo, alterando l'utilizzo del glucosio, di aminoacidi e lipidi. Dal momento che le dinamiche mitocondriali influenzano in maniera importante l'attività metabolica di questi organelli, abbiamo quindi studiato l'effetto della frammentazione mitocondriale su uno dei processi più importanti che avvengono nei mitocondri, la fosforilazione ossidativa.

La respirometria ad alta risoluzione, condotta su modelli cellulari di adenocarcinoma pancreatico umano, rivela che la spiccata fissione mitocondriale osservabile in queste cellule favorisce significativamente l'attività mitocondriale e in particolare la OXPHOS: ciò è in linea con altri studi, che confermano la forte dipendenza di PDAC da questa via metabolica e che evidenziano gli effetti negativi dell'inibizione di DRP1 sul metabolismo e la crescita tumorale. [31, 38]

Infatti, è stato ipotizzato che successive duplicazioni della popolazione mitocondriale a cui non segue la fissione del *network* portino all'accumulo di danni a livello del mtDNA e di altre macromolecole presenti nella matrice, eventi che causano infine una diminuita funzionalità della catena di trasporto degli elettroni. Ciò porterebbe a ulteriori danni mitocondriali dovuti alla generazione di specie

reattive dell'ossigeno. L'inibizione farmacologica della fissione mitocondriale, in aggiunta, sembra promuovere un aumento della mitofagia, cosa che riduce la massa mitocondriale funzionale presente all'interno della cellula, e quindi decrementa ancor di più la fosforilazione ossidativa.

I nostri esperimenti paiono indicare quindi che la frammentazione mitocondriale indotta da KRAS mutato aumenta l'attività bioenergetica di questi organelli, che forniscono inoltre il citrato come principale precursore di acetil-CoA destinato all'acetilazione degli istoni. È stato osservato invece che l'acetato, seppur fornito in concentrazioni sovra-fisiologiche alle cellule pancreatiche, non viene utilizzato da queste ultime altrettanto facilmente come fonte alternativa di acetil-CoA.

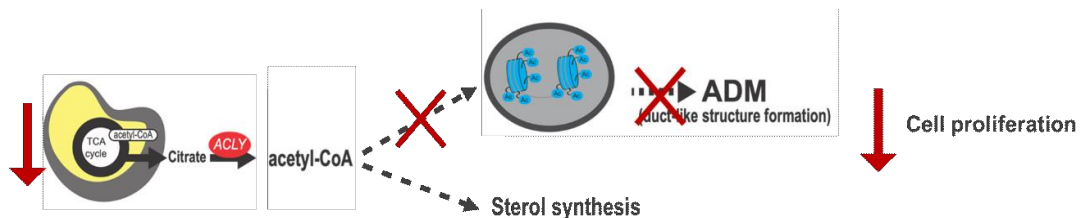


Fig. 25. Rappresentazione schematica dei principali effetti cellulari dell'inibizione farmacologica della fissione mitocondriale

Le alterazioni delle dinamiche mitocondriali non si limitano a influenzare solo le fasi iniziali dell'insorgenza di PDAC: la frammentazione della rete mitocondriale sembra causare un aumento del tasso proliferativo cellulare, sebbene non sia chiaro il meccanismo con cui questo avviene. Tale osservazione è comunque supportata da altri studi, che osservano come l'inibizione della fissione mitocondriale limiti efficacemente l'espansione del clone tumorale.

Considerando quindi gli effetti pleiotropici della frammentazione mitocondriale, e tenendo conto di come essa stimoli la carcinogenesi di PDAC nelle sue diverse fasi, si può forse individuare in questo aspetto una vulnerabilità dell'adenocarcinoma pancreatico e un possibile target terapeutico. Mdivi-1, l'agente farmacologico da noi utilizzato per inibire la fissione mitocondriale *in vitro*, presenta caratteristiche che lo rendono incompatibile ad un uso *in vivo*; tuttavia, sono già stati individuati altri farmaci che ne riproducono l'effetto senza scatenare particolari reazioni

avverse nei pazienti: uno di questi è la leflunomide orale, utilizzata per il trattamento dell'artrite reumatoide, che si mostra particolarmente specifico ed efficace nell'attaccare tumori con KRAS mutato ed elevata frammentazione mitocondriale, quale PDAC. È quindi auspicabile che ulteriori studi sulle alterazioni delle dinamiche mitocondriali in questo tipo di neoplasie portino all'individuazione di altri possibili target per il trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico duttale.

Nel nostro studio abbiamo inoltre preso in considerazione uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di PDAC, ovvero il fumo di sigaretta: questo tipo di consumo di tabacco è particolarmente diffuso in Paesi a basso e medio reddito, ma non risparmia nemmeno i Paesi industrializzati. Le numerose sostanze contenute nel fumo di sigaretta sono responsabili dell'aumentata incidenza di patologie cardiovascolari e respiratorie, ma anche di diabete, altre malattie croniche e tumori, tra cui PDAC.

I meccanismi molecolari che correlano il fumo alla progressione del cancro al pancreas non sono ancora del tutto noti, né sono stati individuati in maniera definitiva tutti gli agenti cancerogeni che potrebbero contribuire alla tumorigenesi. La nostra attenzione è stata però catturata dalla nicotina, alcaloide che non sembra avere effetti mutageni sul genoma delle cellule pancreatiche, ma che potrebbe agire in modi alternativi per favorire l'inizio e la progressione del tumore. Sempre più ricerche, infatti, mostrano che la nicotina agisce legando recettori nicotinici per il neurotrasmettitore acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) espressi sulla membrana plasmatica delle cellule pancreatiche, favorendone la trasformazione tumorale. Dal momento che è stato riportato che in altri modelli cellulari questo alcaloide stimola la frammentazione mitocondriale inducendo l'espressione di DRP1, ci siamo proposti di studiare l'azione di tale sostanza a livello della rete mitocondriale in modelli *in vitro* di PDAC, utilizzando il principale metabolita della nicotina, la cotinina, per riprodurre gli effetti.

I nostri esperimenti, pur confermando che la cotinina attiva gli stessi recettori della nicotina, non rilevano particolari conseguenze dell'utilizzo di questa sostanza sulla rete mitocondriale: sia immunofluorescenze che Western Blot evidenziano un'immutata morfologia di quest'ultima e un inalterato reclutamento di DRP1 ai siti di fissione mitocondriale. Questi risultati sono sostenuti dall'ulteriore osservazione che né la via di segnalazione di AKT né quella di ERK, a valle dei recettori $\alpha 7$ nAChR, sembrano attivate: in particolare quest'ultima è uno dei *pathway* diretti con cui DRP1 è attivato attraverso la fosforilazione di S616. D'altro canto, potrebbero essere coinvolte altre vie di trasmissione del segnale, come la via dell'AMP ciclico.

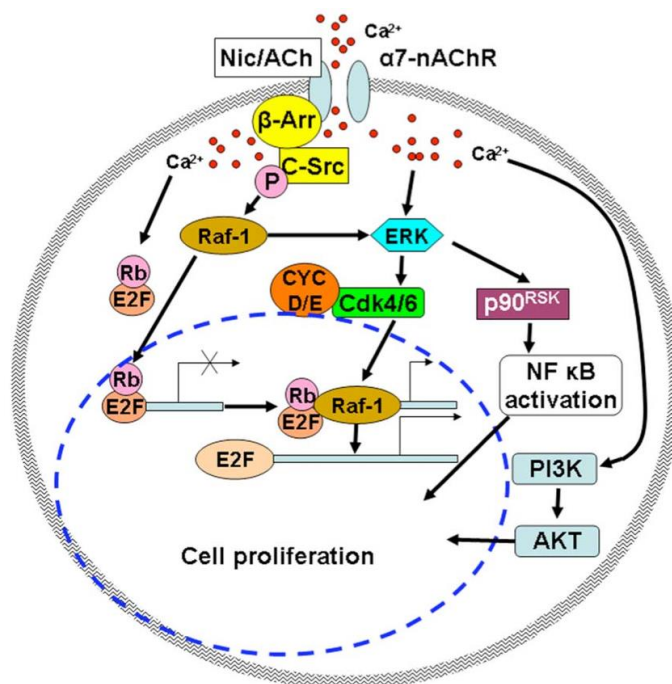


Fig. 26. Alcune delle vie di segnalazione a valle dei recettori nicotinici dell'acetilcolina

In effetti, però, anche l'attività mitocondriale nei campioni trattati sembra invariata, e conseguentemente l'acetil-CoA sintetizzato *de novo* dalle cellule non è reso disponibile per quelle reazioni di acetilazione istonica che sono necessarie all'ADM. Gli esperimenti di valutazione della metaplasia acino-duttale mostrano altresì che gli acini pancreatici murini trattati con cotinina non sono significativamente più predisposti alla transdifferenziazione rispetto a quelli non trattati.

Tuttavia, sebbene la cotinina non sembri agire sugli eventi di inizio della carcinogenesi pancreatica, essa si è mostrata una forte promotrice della espansione delle cellule tumorali, come verificato nei saggi di proliferazione *in vitro*. Uno dei meccanismi con cui essa potrebbe favorire tale fenomeno è la produzione di ROS: come prima specificato, infatti, molti tipi tumorali fanno affidamento a un'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno per la promozione del *signaling* proliferativo e di sopravvivenza cellulare ^[39]. La valutazione della quantità intracellulare di ROS tramite sonda fluorescente ha registrato un notevole aumento della concentrazione intracellulare di tali specie nei campioni trattati con cotinina, supportando la precedente ipotesi. È noto che i maggiori produttori di ROS sono i mitocondri, che li rilasciano nel citoplasma come sottoprodotti della fosforilazione ossidativa; però, come visto negli esperimenti di cui sopra, questi organelli non mostrano variazioni nella loro attività a seguito dell'esposizione a cotinina: è possibile che vengano sfruttate altre vie di produzione di queste sostanze, come la NADPH ossidasi o la 5-lipossigenasi, tra i cui stimoli attivatori si annovera KRAS mutato. L'utilizzo di un antiossidante per limitare i livelli di ROS *in vitro*, tuttavia, non si è dimostrato efficace nel contrastare l'effetto pro-proliferativo della cotinina, pur andando a tamponare le specie reattive dell'ossigeno nei modelli cellulari, e ciò suggerisce che i ROS non siano i principali fautori dell'aumentato tasso proliferativo delle cellule trattate con questo metabolita.

Un recente studio condotto su colture uroteliali *in vitro* suggerisce un altro possibile meccanismo con cui la cotinina potrebbe agire per favorire la progressione tumorale, tramite l'attivazione di diverse vie di segnalazione a valle dei recettori nAChR: l'attivazione della protein chinasi C (PKC) a seguito di un afflusso intracellulare di calcio o il reclutamento di Src possono stimolare la fosforilazione del fattore trascrizionale STAT3, che così attivato trasloca al nucleo e promuove l'espressione della ciclina D1, che regola positivamente la progressione del ciclo cellulare e la proliferazione.^[40]

In conclusione, si può affermare che la nicotina favorisca la progressione di PDAC andando ad agire su vari meccanismi molecolari, anche se ulteriori studi sono

necessari per comprendere a fondo in quali processi cellulari essa agisca per stimolare l'espansione dell'adenocarcinoma pancreatico duttale.

BIBLIOGRAFIA

1. Susan Standring, Anatomia del Gray. Le basi anatomiche per la pratica clinica, Milano Ed. Edra, 41^aed, vol 2, 1236-1244 (2017)
2. Cleveland MH, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J, Leach SD. "Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells." *Semin Cell Dev Biol.* (2012)
3. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. "Pancreatic cancer." *Lancet.* 2008-2020 (2020)
4. Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. "Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges". *Gastroenterology.* 2024-2040 (2019)
5. Sarantis P, Koustas E, Papadimitropoulou A, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. "Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy". *World J Gastrointest Oncol.* 173-181 (2020)
6. Khalaf, Natalia et al. "Burden of Pancreatic Cancer: From Epidemiology to Practice", *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol 19, issue 5, 876 – 884 (2021)
7. Weissman, Simcha et al. "The Diverse Involvement of Cigarette Smoking in Pancreatic Cancer Development and Prognosis." *Pancreas* vol. 49,5 (2020)
8. Blackford A. et al., "Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer". *Cancer Res.* (2009)
9. Backx E et al.. "On the Origin of Pancreatic Cancer: Molecular Tumor Subtypes in Perspective of Exocrine Cell Plasticity". *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* (2021)
10. Maitra, Anirban, and Ralph H Hruban. "Pancreatic cancer." *Annual review of pathology* vol. 3 (2008)
11. Paoli C, Carrer A. "Organotypic Culture of Acinar Cells for the Study of Pancreatic Cancer Initiation." *Cancers (Basel).* (2020)
12. Waters, Andrew M, and Channing J Der. "KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* vol. 8,. (2018)

13. Aatur D. Singhi et al., "Real-Time Targeted Genome Profile Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Identifies Genetic Alterations That Might Be Targeted With Existing Drugs or Used as Biomarkers" *Gastroenterology*, vol 156,8 (2019)
14. Jones S. et al., "Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses". *Science*. (2008)
15. Yachida S, Jones S, et al., "Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer". *Nature*. (2010)
16. Evans, Rebecca A et al. "Lack of immunoediting in murine pancreatic cancer reversed with neoantigen." *JCI insight* vol. 1,14 (2016)
17. Orth, M., Metzger, P., Gerum, S. et al. "Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches." *Radiat Oncol* 14, 141 (2019)
18. Yan, Liang et al. "Glucose Metabolism in Pancreatic Cancer." *Cancers* vol. 11,10. (2019)
19. Ying, Haoqiang et al. "Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism." *Cell* vol. 149,3 (2012)
20. Jin-Tao Li, Yi-Ping Wang, Miao Yin and Qun-Ying Lei "Metabolism remodeling in pancreatic ductal adenocarcinoma". *Cell Stress* 3,12 (2019).
21. Guillaumond F. et al., "Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma", *Cell Biology* (2015)
22. Carrer A, et al., "Acetyl-CoA Metabolism Supports Multistep Pancreatic Tumorigenesis". *Cancer Discov*. (2019)
23. Vyas, Sejal et al. "Mitochondria and Cancer." *Cell* vol. 166,3 (2016)
24. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. "Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms". *Essays Biochem*. (2018)
25. Pernas L, Scorrano L. "Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function." *Annu Rev Physiol*. (2016)

26. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. "During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability". *Nat Cell Biol.* (2011)
27. Lee, Jason E et al. "Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division." *Nature* vol. 540,7631 (2016)
28. Zemirli, Naima et al. "Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions." *International journal of molecular sciences* vol. 19,2 (2018)
29. Kashatus, Jennifer A et al. "Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth." *Molecular cell* vol. 57,3 (2015)
30. Serasinghe, Madhavika N et al. "Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors." *Molecular cell* vol. 57,3 (2015)
31. Nagdas S, Kashatus et al., "Drp1 Promotes KRas-Driven Metabolic Changes to Drive Pancreatic Tumor Growth". *Cell Rep.* (2019)
32. Peiris-Pagès M, et al., "Mitochondrial fission as a driver of stemness in tumor cells: mDIV11 inhibits mitochondrial function, cell migration and cancer stem cell (CSC) signalling". *Oncotarget.* (2018)
33. Hermann PC, Sancho P et al., "Nicotine promotes initiation and progression of KRAS-induced pancreatic cancer via Gata6-dependent dedifferentiation of acinar cells in mice". *Gastroenterology.* (2014)
34. Schaal C. et al., "The Role of nAChR and Calcium Signaling in Pancreatic Cancer Initiation and Progression", *Cancers* (2015)
35. Hirata N et al, "Nicotine induces mitochondrial fission through mitofusin degradation in human multipotent embryonic carcinoma cells". *Biochem Biophys Res Commun.* (2016)
36. Aravamudan B et al, "Cigarette smoke-induced mitochondrial fragmentation and dysfunction in human airway smooth muscle". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2014)
37. Leenders et al, "Plasma cotinine levels and pancreatic cancer in the EPIC cohort study". *Int. J. Cancer* (2012)

38. Yu M, Nguyen ND et al, "Mitochondrial fusion exploits a therapeutic vulnerability of pancreatic cancer". *JCI Insight*. (2019)
39. Waris G, Ahsan H. "Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions". *J Carcinog*. (2006)
40. ShugoSuzuki et al, "Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium *in vitro* and *in vivo*", *Toxicology*, vol. 429 (2020)