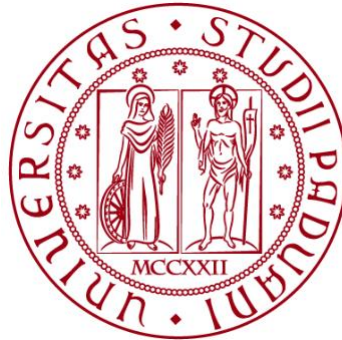


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Un RNA non codificante promuove la glicolisi
nelle cellule tumorali formando complessi con
enzimi glicolitici nel citoplasma**

**Relatore: Prof. Gerolamo Lanfranchi
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Elena Xodo

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Il genoma non codificante	4
1.2 lncRNA.....	5
1.2.1 Struttura e sintesi	5
1.2.2 Funzioni.....	8
1.3 lncRNA citoplasmatici.....	10
2. RIPROGRAMMAZIONE DEL METABOLISMO TUMORALE	11
2.1 Caratteristiche metaboliche dei tumori.....	12
2.2 Le vie di segnalazione oncogeniche.....	14
3. METODOLOGIE DELLO STUDIO	16
3.1 Modello sperimentale	16
3.1 Metodo sperimentale.....	16
4. RUOLO E FUNZIONAMENTO DI gLINC NELLE CELLULE TUMORALI	18
4.1 I metaboloni	19
4.2 Scoperta dei ruoli di gLINC nel metabolismo tumorale	20
4.3 Interazione tra c-Myc, gLINC e USP2a.....	22
4.4 Modalità di assemblaggio del complesso enzimatico glicolitico ad opera di gLINC	24
4.5 Influenza della di carenza di serina	27
4.5.1 Influenza su gLINC.....	27
4.5.2 Influenza sul complesso enzimatico glicolitico.....	29
4.6 Limiti dello studio	30
5. CONCLUSIONE	31
Glossario	32
Bibliografia	33

Abstract. A partire dalla scoperta dell'importanza delle sequenze contenute in quello che veniva definito "DNA spazzatura", la ricerca ha fatto passi da giganti nello studio della porzione di genoma non codificante. I lunghi RNA non codificanti (lncRNA), raggruppano un vasto numero di trascritti con lunghezza superiore ai 200 nt, non tradotti in proteine e coinvolti in molti processi di regolazione cellulare interagendo con DNA, RNA e proteine. Dallo studio del metabolismo tumorale, è stato evidenziato un loro nuovo ruolo. Infatti, interagendo con l'oncogene c-Myc, sono in grado di coordinare la formazione di un complesso enzimatico composto da cinque enzimi della fase di payoff della glicolisi. Questo favorisce l'aumento del flusso glicolitico consentendo una maggiore produzione di ATP favorendo la sopravvivenza cellulare, in particolare in condizioni di privazione di serina/glicina, suggerendo un loro ruolo attivo durante la riprogrammazione metabolica delle cellule tumorali. Rappresenta, inoltre, il primo esempio di lncRNA in grado di facilitare la formazione di un complesso enzimatico.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il genoma non codificante

Il termine genoma viene usato in biologia molecolare per indicare la totalità dei geni contenuti nel corredo cromosomico aploide di una cellula (Fantoni, 2005) ed è generalmente costituito da DNA. Negli esseri umani è molto esteso, ed è complessivamente composto da 3200 Mpb.

Inizialmente si pensava che tutte le regioni contenute nel genoma codificassero proteine, tuttavia, verso la fine del secolo scorso, attraverso studi condotti su organismi modello e su cellule staminali umane (hPSCs), è stato scoperto che in realtà una porzione molto estesa, pari circa al 98,5%, non è codificante. Definito inizialmente "DNA spazzatura", per l'assenza di geni codificanti proteine, studi successivi hanno dimostrato che contiene regioni molto importanti per la regolazione e il funzionamento dei geni stessi (Paloviita e Vuoristo, 2022).

È in questa regione che si localizzano infatti: RNA funzionali non codificanti, telomeri, introni, pseudogeni, elementi regolatori in cis e in trans, trasposoni e sequenze virali incorporate in seguito ad infezioni da parte di virus lisogeni (Amaldi et al., 2018).

Studi di genomica comparata, hanno poi dimostrato che parte di questo DNA spazzatura è altamente conservato, a volte per centinaia di milioni di anni, il che suggerisce che queste regioni hanno subito una selezione positiva nel corso dell'evoluzione.

Il paradigma iniziale che il non-codificante corrispondesse a non-funzionale è stato quindi presto ribaltato e ad oggi sono in corso ricerche per scoprire, ad esempio, le funzioni del DNA non codificante nell'embriogenesi umana. Il genoma non codificante, infatti, risulta ampiamente accessibile e trascrizionalmente attivo, producendo un gran numero di classi di RNA durante lo sviluppo iniziale dell'embrione umano (Paloviita e Vuoristo, 2022).

L'RNA, in particolare, si è dimostrato essere di grande interesse all'interno del "DNA spazzatura". Fino alla metà del '900, ne erano state identificate solo tre classi: mRNA, tRNA, rRNA; implicati tutti nel processo di sintesi proteica (Amaldi et al., 2018). Oltre ad essi erano noti anche altri due importanti RNA: gli small nuclear (snRNA) coinvolti nello splicing e gli small nucleolar RNA (snoRNA) coinvolti nella maturazione degli rRNA (Mattick e Makuni, 2006).

Tuttavia, tra tutti questi RNA, solo una piccola percentuale, dallo 0,1 al 4%, codifica proteine (mRNA), il restante entra a far parte del non-coding RNA (ncRNA). Gli RNA che rientrano in questa classe svolgono attività prevalentemente regolative e catalitiche, anche se molte delle loro funzioni ancora non sono state chiarite. Negli eucarioti, invece, grazie al sequenziamento del genoma, è stato possibile scoprire una molteplicità di ncRNA che vengono distinti sulla base delle dimensioni. Si possono identificare due classi principali: i microRNA (miRNA) con lunghezza variabile intorno ai 20 nucleotidi e i long non coding RNA (lncRNA) con lunghezza superiore ai 200 nucleotidi (Amaldi et al., 2018).

1.2 lncRNA

1.2.1 Struttura e sintesi

Il genoma eucariotico viene ampiamente trascritto dando origine a migliaia di lncRNA. Si tratta di un gruppo eterogeneo di trascritti con lunghezza superiore ai 200 nt che non vengono tradotti in proteine e si differenziano per la loro biogenesi e origine genomica (Amaldi et al., 2018). Secondo le statistiche di *Human GENCODE*, il genoma umano contiene più di 16.000 geni lncRNA, mentre secondo altre stime superano il numero di 100.000 (Statello et al., 2022). La maggior parte viene trascritta dall'RNA polimerasi II (RNAPol II), pertanto, analogamente agli mRNA, presentano un cap al 5' costituito da una 7-metilguanossina (m7G) e code di poli(A) all'estremità 3' e si presume che vengano maturati in maniera simile agli mRNA. Anche se, recenti studi hanno rilevato che trascrizione, maturazione, esportazione e turnover dei lncRNA sono correlati ai destini e alle funzioni che svolgeranno poi nella cellula e possono quindi esservi differenze tra le varie classi (Statello et al., 2022; Yao et al., 2019).

Rispetto agli mRNA, presentano comunque alcune differenze. Anzitutto a livello strutturale contengono meno esoni ma di lunghezza superiore e sono localizzati maggiormente nel nucleo. Inoltre, i geni che li codificano sono meno conservati

evolutive e vengono espressi a livelli molto inferiori rispetto a quelli codificanti proteine. Questo è probabilmente dovuto alla presenza di modificazioni istoniche repressive nei loro promotori oppure a controlli non troppo rigorosi operati dalle RNA polimerasi e dai meccanismi di selezione (Statello et al., 2022).

Inoltre, la loro modalità di trascrizione spiega alcune delle loro caratteristiche distintive: vengono trascritti molto spesso da RNAPol II quando il suo dominio carbossi-terminale è deregolato per via della fosforilazione. Infatti, lo stato di fosforilazione di questo dominio di Pol II è importante perché determina diversi stadi di trascrizione.

Solitamente, le polimerasi trascrivono in maniera preferenziale uno dei due filamenti a partire da specifici TSS (transcription start sites). Tuttavia, nel caso dei lncRNA, la trascrizione può iniziare anche ad una certa distanza dal promotore. A determinare il modo in cui verranno trascritti, saranno la loro specifica organizzazione genomica e localizzazione (Amaldi et al., 2018). Sulla base di ciò, è stato possibile operare una prima classificazione dei lncRNA in: antisenso, intronici, bidirezionali e intergenici (lincRNA). (Tabella 1)

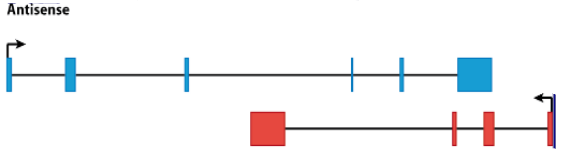
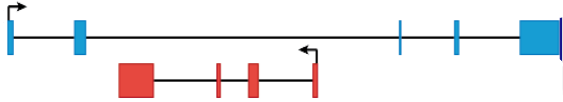
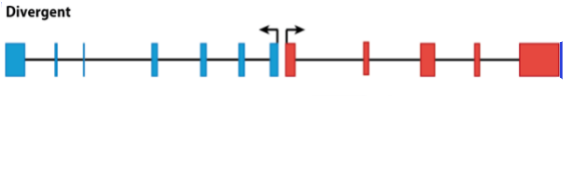
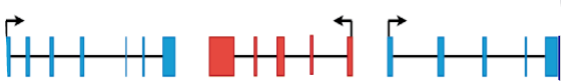
A causa della fosforilazione dell'RNAPol II, i lncRNA vengono trascritti debolmente e la terminazione della loro trascrizione è spesso indipendente dai segnali di poliadenilazione. Questo fa sì che i lncRNA vengano temporaneamente accumulati sulla cromatina e poi degradati rapidamente da parte del complesso ribonucleasico RNA exosome. Per sfuggire a questo sistema di controllo, i lncRNA mettono in atto una serie di strategie, ad esempio, tramite il reclutamento della ribonucleoproteina U1, impiegata da Pol II durante la trascrizione, per permettere il legame di un certo numero di lncRNA alla cromatina. Oppure, il loro accumulo può avvenire in seguito all'abolizione della funzione del fattore di allungamento SPT6 che normalmente è associato alla Pol II. Questo porta alla redistribuzione dell'istone H3, dai geni che codificano proteine a quelli codificanti i lncRNA, aumentando così la loro trascrizione.

A livello strutturale, i lncRNA sono maturati in maniera meno efficiente rispetto agli mRNA: presentano infatti segnali di splicing più deboli e maggiori distanze tra il sito di splicing al 3' e quello di poliadenilazione (Statello et al., 2022). Oltre a questo, anche altri fattori contribuiscono alla localizzazione nucleare o subcellulare, quali: l'espressione differenziale di alcuni regolatori dello splicing o segnali di poliadenilazione, il reclutamento di specifici fattori e la presenza di ripetizioni di alcune sequenze di basi specifiche (la più nota è una breve sequenza ricca di C derivata da elementi Alu) (Statello et al., 2022; Yao et al., 2019).

La loro localizzazione nucleare è quindi regolata in modo coordinato su vari livelli: a partire dalla loro organizzazione genomica e trascrizione, alla loro elaborazione

ed eventuale successiva esportazione nucleare attraverso specifici motivi di sequenza e fattori.

Tabella 1. **Classificazione dei lncRNA in base alla loro organizzazione genomica.** In blu è indicando in gene codificante, mentre in rosso il gene non codificante (lncRNA)

lncRNA antisenso	Vengono trascritti in antisenso, cioè in direzione opposta, rispetto ai geni codificanti proteine. Questo comporterà interferenza e competizione nel corso della trascrizione	
lncRNA intronici	Vengono trascritti, in antisenso, all'interno degli introni dei geni che codificano proteine	
lncRNA bidirezionali (divergenti)	Vengono trascritti in direzioni opposte a partire dallo stesso promotore di un gene codificante per una proteina. Questo causa competizione nel corso della trascrizione	
lncRNA intergenici (lincRNA)	Presentano unità trascrizionali completamente indipendenti rispetto ai geni codificanti proteine	

Una certa porzione di lncRNA è invece esportata nel citosol condividendo gli stessi percorsi usati dagli mRNA. Studi recenti hanno dimostrato che il percorso è guidato dal fattore di esportazione dell'RNA nucleare 1 (NXF1). Una volta giunti nel citosol, subiscono una serie di processi di selezione che li assegnano a specifici organelli oppure si associano a RNA binding proteins (RBP) e restano nel citosol stesso (Statello et al., 2022; Amaldi et al., 2018)

Nonostante la funzione dei lncRNA sia ancora in gran parte sconosciuta, ci sono molti esempi che dimostrano il loro coinvolgimento in diversi aspetti della regolazione genica e in molti processi biologici (Yao et al., 2019).

1.2.2 Funzioni

I lncRNA a localizzazione nucleare, interagendo con altri RNA, DNA e proteine sono coinvolti in varie attività. A livello di cromatina, ne controllano l'organizzazione, la replicazione e la risposta e riparazione da danno. Regolano poi geni vicini o lontani dalla loro collocazione genomica influenzandone trascrizione, splicing e stabilità dei trascritti. Operano tali meccanismi di regolazione sia in cis, ovvero controllando geni adiacenti o a valle, che in trans, ovvero regolando geni distanti o addirittura localizzati su altri cromosomi. Inoltre, i lncRNA sono coinvolti nella formazione e organizzazione di compartimenti o di aggregati nucleari, con funzioni specializzate nei processi trascrizionali. I lncRNA a localizzazione citoplasmatica sono invece coinvolti nella regolazione della stabilità, turnover, traduzione e modifiche post-traduzionali degli RNA messaggeri. Essendo quindi coinvolti in diverse funzioni cellulari molto importanti da un punto di vista fisiologico in tutti i tessuti e cellule diverse degli organismi pluricellulari eventuali alterazioni della loro struttura genica o dell'espressione sono associate all'insorgere di numerose patologie (Statello et al., 2022).

Tra le svariate attività che controllano, ve ne sono alcune più rilevanti e maggiormente oggetto di studio.

I lncRNA possono agire da "trappole" (*decoy*) per proteine a livello nucleare. Interferiscono con il meccanismo di trascrizione genica tramite il legame e sequestro di proteine regolative e fattori di trascrizione, impedendo il legame di istoni o modificatori della cromatina a livello di siti mirati del DNA (Fig 1.A) (Yao et al., 2019). In questo modo, riducono l'accessibilità alla cromatina (Statello et al., 2022). Sempre nel nucleo, possono svolgere anche il ruolo di *scaffold* (Fig 1.C), ovvero di adattatori per legare più proteine a formare un complesso ribonucleoproteico (RNP) stabile e funzionale. Il legame avviene attraverso il riconoscimento di domini proteici da parte di specifiche strutture a forcina del lncRNA. I complessi RNP che si formano possono agire poi come modificatori della cromatina alterando lo splicing, il turnover dell'mRNA e, in alcuni contesti biologici, la modulazione delle vie di segnale. Quello che ne consegue, a seconda della funzione complessiva dell'RNP alla cui costruzione contribuiscono, è un'inibizione o attivazione della trascrizione di regioni cromatiniche (Amaldi et al., 2018; Statello et al., 2022; Yao et al., 2019).

Sempre nel nucleo svolgono la funzione di guida (Fig 1.D), indirizzando il legame di proteine regolatrici ed enzimi modificatori della cromatina a specifiche sequenze regolative presenti sul DNA genomico (promotori, *enhancer*). I lncRNA interagiscono con le sequenze bersaglio sulla cromatina secondo due diverse modalità: attraverso una porzione a singola elica che interagisce direttamente con sequenze complementari di DNA svolto (formando triple eliche RNA-DNA-RNA), oppure appaiando una porzione ripiegata della loro sequenza con una proteina già

legata a sequenze specifiche di DNA (R-loop). Questa funzione è di grande importanza nelle cellule femminili dei mammiferi poiché è responsabile dell'inattivazione di uno dei due cromosomi X durante lo sviluppo embrionale. L'inattivazione è guidata dal lncRNA Xist (il primo RNA non codificante ad azione nucleare caratterizzato), che innesca una cascata di eventi che comportano il rimodellamento cromosomico per ottenere poi il silenziamento della maggior parte dei geni localizzati su quella copia del cromosoma X (Yao et al., 2019). Tramite la modalità di guida, inoltre, specifici lncRNA, chiamati enhancer lncRNA (eRNA), sono in grado di favorire il ripiegamento della cromatina attraverso il legame dei complessi proteici che formano l'enhancesoma sulle specifiche sequenze enhancer. Tali sequenze possono essere localizzate anche a diverse megabasi dai geni influenzati. Tuttavia, grazie ai ripiegamenti della cromatina indotti dagli eRNA, saranno in grado di svolgere la loro attività di regolazione anche in cis (Statello et al., 2022).

Infine, i lncRNA sono anche in grado di legare direttamente l'mRNA bersaglio e in questo modo possono agire modulando lo splicing, inibendo la traduzione oppure portando alla degradazione dell'mRNA (rispettivamente: Fig 1.E, 1.F e 1.G). In alcuni casi, la sola trascrizione o le sequenze di DNA adiacenti ai loci dei lncRNA sono responsabili della regolazione genica locale (Amaldi et al., 2018; Yao et al., 2019).

Un certo numero di lncRNA viene invece esportato nel citosol, dove regolano la stabilità dell'mRNA, la sua traduzione ed interferiscono con le modificazioni post traduzionali. La regolazione della stabilità dell'mRNA è una funzione di particolare interesse ai fini dell'argomento trattato in questa tesi.

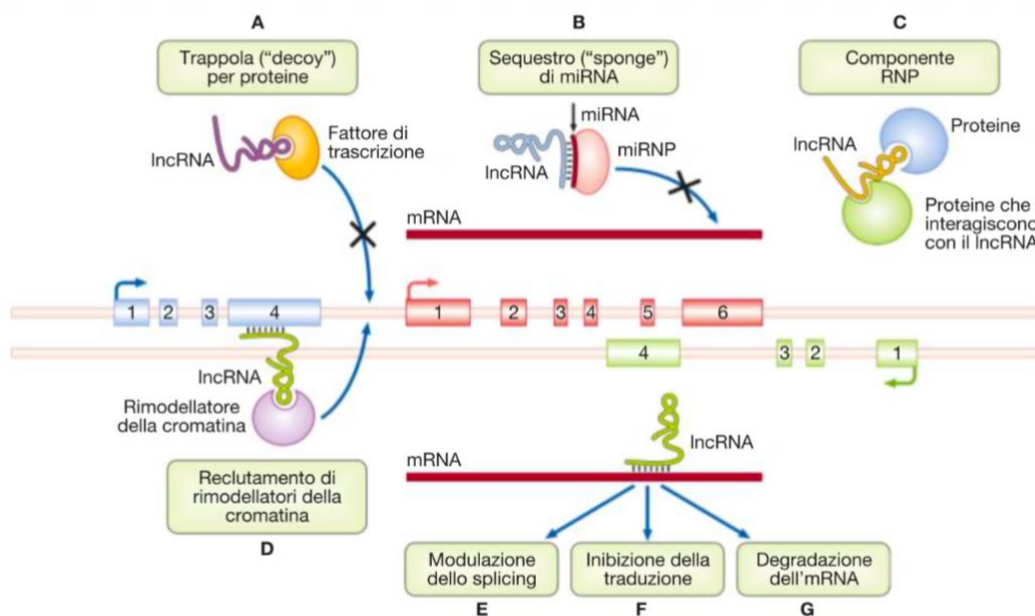


Figura 1. **Funzioni biologiche dei lncRNA.** La figura riassume le diverse funzioni caratterizzate dei lncRNA: (A) sequestro dei fattori di trascrizione; (B) sequestro e competizione come “spugne” con i microRNA; (C) partecipazione alla formazione di complessi RNA-Proteine (RNP); (D) reclutamento di rimodellatori e modificatori della cromatina, come nel caso descritto di Xist; (E) modulazione dello splicing; (F) blocco della traduzione dell’ mRNA; e infine (G) avvio dell’ mRNA verso la degradazione (Amaldi et al., 2018)

1.3 lncRNA citoplasmatici

I lncRNA dal nucleo possono raggiungere il citoplasma guidati da NXF1. In questo compartimento svolgono diverse funzioni, una delle principali è quella di regolazione post-trascrizionale della stabilità dell’ mRNA attraverso il meccanismo miRNA *sponge*. Questa funzione è svolta da specifici RNA competitivi endogeni (ceRNA) che per complementarità di alcune porzioni di sequenza, legano in maniera competitiva i miRNA sottraendoli dalla loro normale azione di legame e regolazione degli mRNA bersaglio (Yao et al., 2019; Amaldi et al., 2018). La relazione tra la quantità di ceRNA e miRNA deve essere stechiometrica per garantire un effetto misurabile sull’ espressione dell’ mRNA bersaglio (Statello et al., 2022).

Questo meccanismo gioca un ruolo fondamentale in molti processi regolativi del differenziamento e dello sviluppo cellulare. In questo contesto, si è trovato che i lncRNA svolgono un ruolo nella formazione, la modulazione della crescita o la soppressione di tumori (Amaldi et al., 2018). Un esempio importante del ruolo dei lncRNA nella fisiologia delle cellule tumorali è rappresentato dal lncRNA gLINC. Si è trovato infatti che gLINC è sovraespresso nei tumori e, interagendo con il proto-oncogene c-Myc, riprogramma il metabolismo cellulare attraverso la formazione guidata di metaboloni, ovvero complessi di enzimi glicolitici uniti non covalentemente, per garantire un maggiore apporto energetico alla cellula tumorale, anche in presenza di ossigeno, in modo tale da migliorarne la sopravvivenza (Zhu et al., 2022). Il meccanismo d’ azione di questo specifico lncRNA verrà discusso più dettagliatamente all’ interno di questa tesi

2. RIPROGRAMMAZIONE DEL METABOLISMO TUMORALE

Prima di affrontare nel dettaglio la funzione di gLINC è importante prendere in esame il funzionamento del metabolismo tumorale, in quanto sono proprio gli enzimi coinvolti nel metabolismo ad essere oggetto di questo tipo di regolazione che garantisce una maggiore sopravvivenza alle cellule. I tumori derivano da mutazioni a carico di oncogeni e geni oncosoppressori, i quali controllano in modo diretto l'espressione e l'attività dei geni metabolici. La proliferazione continua e incontrollata è una caratteristica intrinseca dei tumori e il metabolismo anormale è uno dei maggiori tratti distintivi (Lu e Wang, 2018).

La loro rapida crescita rispetto alle cellule normali è dovuta alla perdita dell'inibizione da contatto dei vasi che le nutrono; questo, tuttavia, le rende incapaci di procurarsi efficientemente l'ossigeno portandole ad una condizione di ipossia permanente con una parallela privazione cronica dei nutrienti. Per resistere e adattarsi a questi stress ambientali, le cellule tumorali assumono metaboliti da fonti esterne e modificano le loro vie metaboliche per massimizzare l'efficienza dell'attività dei propri enzimi metabolici (Lu e Wang, 2018).

I primi studi, che evidenziarono la differenza tra il metabolismo delle cellule normali e di quelle tumorali, furono condotti da Otto Warburg negli anni '20 del secolo scorso. Egli scoprì che nelle cellule tumorali i meccanismi respiratori sono particolarmente danneggiati, soprattutto a livello mitocondriale. Questi non possono quindi usare la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) ma ricavano l'ATP attraverso la sola glicolisi anche in ambienti ricchi di ossigeno, che viene per questo definita glicolisi aerobica. Questo fenomeno è stato riscontrato *in vivo* in circa il 70-80% dei tumori umani (Vaupel e Multhoff, 2021). Nello specifico, le iniziali condizioni di ipossia alle quali le cellule tumorali sono sottoposte portano all'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 (Hypoxic Inducible Factor-1) che stimola la produzione degli enzimi glicolitici e dei trasportatori del glucosio (GLUT-1 e GLUT-3). Cresce anche la sintesi dell'ormone peptidico VEGF che stimola l'angiogenesi aumentando la vascolarizzazione del tumore e quindi l'apporto di glucosio.

All'interno delle cellule tumorali, poi, il piruvato ottenuto dalla glicolisi non va incontro al ciclo di Krebs (TCA) o a OXPHOS ma viene convertito in lattato ad opera della lattato deidrogenasi (LDHA) nel citosol, per essere poi esportato ed accumulato nello spazio extracellulare a disposizione delle cellule che lo usano come fonte energetica per mantenere la glicolisi aerobica. (Fig. 2) (Vaupel e Multhoff, 2021).

Studi più recenti hanno però dimostrato che i mitocondri nelle cellule tumorali restano intatti e potrebbero quindi produrre energia attraverso la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) (Lu e Wang, 2018). Nonostante ciò, la maggior parte delle

cellule tumorali fa utilizzo della glicolisi aerobica e l'effetto Warburg costituisce una parte essenziale, su più livelli, della riprogrammazione del metabolismo tumorale (Vaupel e Multhoff, 2021).

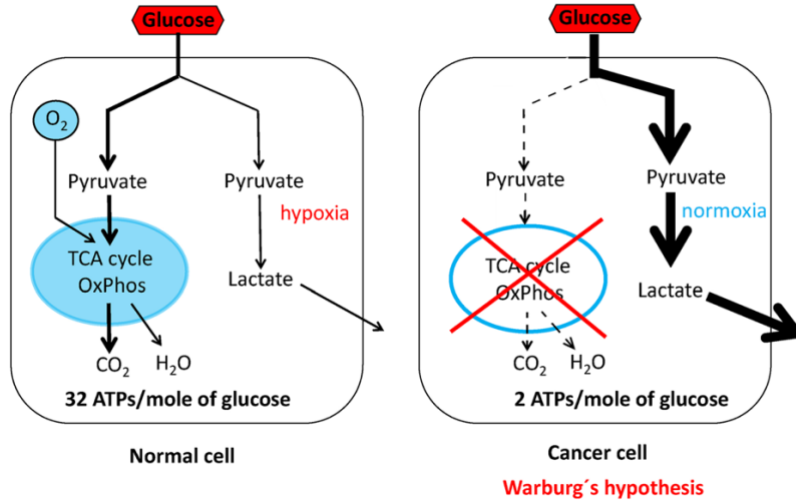


Figura 2. **Warburg's effect hypothesis.** La grande necessità di energia da parte delle cellule tumorali differenzia il loro metabolismo rispetto a quelle normali. Gli studi di Otto Warburg furono i primi ad evidenziare le strategie metaboliche messe in atto da queste cellule in condizioni di stress per poter sopravvivere e proliferare (Vaupel e Multhoff, 2021).

2.1 Caratteristiche metaboliche dei tumori

Nella riprogrammazione del metabolismo tumorale di fondamentale importanza è la regolazione operata nelle vie che utilizzano glucosio, glutammina e acidi grassi poiché questi forniscono l'energia (sotto forma di ATP) e gli intermedi necessari per il mantenimento e la sopravvivenza delle cellule tumorali (Park et al., 2020). Il metabolismo del glucosio costituisce la fonte principale di carbonio metabolico ed energia nelle cellule. Una volta entrato nella cellula, a seconda della necessità, potrà essere impiegato nella glicolisi, nella via di sintesi dell'esosamina, nella via del pentosio fosfato (PPP) o nella biosintesi della serina (SSP). Quindi, il mantenimento del metabolismo del glucosio è un requisito essenziale per garantire la crescita delle cellule normali e diventa di conseguenza essenziale per le cellule tumorali. Non a caso, diventa tanto più efficiente quanto più il tumore è aggressivo (Lu e Wang, 2018).

La glicolisi è la principale via di utilizzo del glucosio nelle cellule per ottenere ATP e NADH. È stato dimostrato che mutazioni che comportano l'attivazione di oncogeni, come ad esempio c-Myc e Ras, e la perdita di funzione degli oncosoppressori (in particolare p53) aumentano i livelli degli enzimi glicolitici e dei trasportatori di glucosio nelle cellule (Vaupel e Multhoff, 2021).

Questa via metabolica coinvolge il catabolismo del glucosio che viene trasformato, attraverso dieci passaggi, in piruvato e ATP. Vista l'importanza del glucosio, le cellule tumorali, grazie alle mutazioni a carico di oncogeni e oncosoppressori, sovraesprimono i trasportatori GLUT1 e GLUT3 in modo da garantire un maggiore accumulo di glucosio nella cellula. Altro importante bersaglio sono le chinasi, gli enzimi che catalizzano l'aggiunta di gruppi fosfato tramite reazioni di fosforilazione. In particolare, l'isoforma 2 della piruvato chinasi (PKM2) che catalizza la reazione finale della glicolisi convertendo il fosfoenolpiruvato (PEP) in piruvato trasferendo un gruppo fosfato dal PEP all'ADP che diventa ATP (Park et al., 2020). Questo enzima è molto importante poiché oltre ad avere un ruolo metabolico nella glicolisi, controlla anche l'espressione genica nel nucleo e fosforila molteplici proteine coinvolte in altre vie metaboliche o nel mantenimento dell'omeostasi redox delle cellule, promuovendo l'effetto Warburg e la tumorigenesi (Vaupel e Multhoff, 2021; Park et al., 2020). Quest'ultimo aspetto è molto importante, poiché tutte le vie metaboliche alterate che aumentano la sintesi di elementi costitutivi e di energia generano inevitabilmente specie reattive dell'ossigeno (ROS) che in quantità elevate potrebbero attivare i segnali di morte cellulare. Per evitare questo fenomeno viene sovraregolata la via del pentosio fosfato, avviata da un intermedio della glicolisi (glucosio 6-fosfato), che ripristina i livelli di glutazione necessario per proteggere le cellule dallo stress ossidativo (Lu e Wang, 2018).

La carenza di nutrienti è un altro dei problemi che le cellule tumorali devono affrontare durante il loro adattamento. La via di biosintesi dell'amminoacido non essenziale serina si collega alla glicolisi poiché necessita dell'intermedio 3-fosfoglicerato (3PG). Il fabbisogno di serina può essere colmato assorbendo quella extracellulare; tuttavia, quando la sua concentrazione esogena è troppo bassa, viene ridotta l'attività della PKM2 con conseguente diminuzione della produzione di piruvato e ATP per indirizzare gli intermedi della glicolisi alla SSP (Fig. 3). Contemporaneamente viene attivata la fosfoglicerato deidrogenasi (PHGDH), primo enzima della SSP dal metabolita, intermedio della glicolisi, 2-fosfoglicerato (2PG) che aumenta la produzione di serina necessaria alla proliferazione tumorale. In queste condizioni interviene anche il protooncogene c-Myc che, in condizioni di deprivazione di serina, grazie all'interazione con i ncRNA, trasattiva molti degli enzimi coinvolti nella glicolisi e nell'SSP in modo tale da garantire la proliferazione delle cellule. Nonostante ciò, non sono ancora stati completamente chiariti i meccanismi responsabili dell'aumento dell'SSP e della grande richiesta di produzione di energia attraverso la glicolisi (Zhu et al., 2022).

2.2 Le vie di segnalazione oncogeniche

Vari studi hanno trovato correlazioni tra segnalazione oncogenica e fenotipi metabolici aberranti (Lu e Wang, 2018). Le mutazioni genetiche a carico degli oncogeni e dei geni oncosoppressori sono alla base della regolazione diretta della trascrizione di enzimi metabolici oppure regolano in maniera indiretta l'attività degli enzimi attraverso la gestione delle modifiche post-traduzionali (PTM) o i circuiti di feedback positivo e negativo. Queste interazioni tra segnalazione e metabolismo conferiscono al tumore una grande flessibilità metabolica consentendo alle cellule di adattarsi allo stress metabolico (Lu e Wang, 2018).

Tra i vari percorsi di segnale presenti, di rilevante importanza per le funzioni controllate è l'oncogene MYC. Si trova all'incrocio di molti percorsi di trasduzione del segnale che regolano la crescita cellulare. Alterazioni di questo oncogene sono state trovate in molti tumori umani, come ad esempio il linfoma di Burkitt, sottolineando la frequenza di questa via nella loro insorgenza.

Nelle cellule normali, MYC è coinvolto nella crescita e nella proliferazione cellulare e proprio per questo la sua espressione è altamente regolata da una serie di meccanismi che coinvolgono motivi regolatori trascrizionali situati nella regione prossimale al suo promotore (Dang, 2012).

La proteina Myc si compone di un dominio trascrizionale N-terminale, seguito da un segnale di localizzazione nucleare e da una regione C-terminale. In quest'ultima regione è presente un dominio di legame al DNA che dimerizza con la proteina Max per poi legare il promotore di circa 6.000 geni e guidarne o reprimerne la trascrizione (Dang, 2012); tra questi, circa 700 sono coinvolti nella biogenesi tumorale. Solitamente MYC lega il DNA nel sito canonico E-box 5'-CACGTG-3', che è uno tra i motivi di legame più frequenti nel genoma e che infatti può essere normalmente legato anche da altri fattori. In condizioni fisiologiche, MYC è coinvolto in molte tappe preparatorie del ciclo cellulare che guidano l'accumulo di intermedi, come ad esempio la biogenesi dei ribosomi, nel ciclo cellulare stesso e nella regolazione del metabolismo energetico tramite l'attivazione degli enzimi glicolitici. Inoltre, può guidare l'attività metabolica tramite la repressione dei microRNA e l'aumento dell'espressione dei lncRNA (Dang, 2012).

Quando le cellule sono stimolate a proliferare, si è dimostrato che il gene c-Myc può accumulare mutazioni a carico di residui di serina e tirosina presenti nella sua sequenza, oppure subire alterazione delle sequenze regolative con aumento della sua trascrizione e della quantità di proteina MYC che andrà ad occupare i siti E-box. La sovraespressione di c-Myc è stata documentata come una tra le principali cause nell'insorgenza dei tumori ed orchestra molti dei tratti distintivi che caratterizzano le cellule cancerose garantendone sopravvivenza e proliferazione (Dang, 2012). In particolare, nell'ambito della glicolisi, si è visto che nelle prime fasi di adattamento metabolico, quando si verificano condizioni di ipossia,

l'espressione deregolata di c-Myc sembrerebbe collaborare con il fattore di trascrizione HIF-1 per aumentare l'espressione dei geni glicolitici favorendo così la crescita delle cellule tumorali (Dang, 2012). Questa sua influenza nella glicolisi è di rilevante importanza, poiché si è scoperta essere alla base del meccanismo di co-regolazione con gLINC per la costituzione poi di un complesso metabolico enzimatico che amplifica ancora di più l'utilizzo del glucosio come fonte principale per la produzione di ATP all'interno di queste cellule.

3. METODOLOGIE DELLO STUDIO

Lo studio sperimentale condotto per comprendere il ruolo del lncRNA gLINC nelle cellule tumorali si è avvalso dell'utilizzo di diversi materiali e tecniche che hanno consentito il rilevamento della sua attività e dei suoi livelli nel corso di tutto il progetto. Tra questi, alcuni sono risultati di maggiore importanza durante la determinazione

3.1 Modello sperimentale

Le analisi *in vitro* sono state condotte su specifiche linee cellulari derivanti da tessuti umani. In particolare, sono state impiegate le cellule HepG2, le cellule HeLa e la linea cellulare di linfoma di Burkitt umano P493-6.

Le cellule HepG2 sono una linea derivata dal tessuto epatico di un paziente con carcinoma epatocellulare e vengono solitamente usate come modello per studi sul metabolismo epatico e sulle sue disfunzioni patologiche. Presentano alcune caratteristiche uniche che le rendono un ottimo modello per lo svolgimento delle analisi. In particolare, si distinguono per: durata illimitata, fenotipo stabile, elevata disponibilità e maneggevolezza (Donato et al., 2015).

Le cellule HeLa derivano dai tessuti di cancro alla cervice uterina di Henrietta Lacks. Si tratta di un modello sperimentale estremamente usato per due caratteristiche principali: anzitutto sono "immortalizzate" perché presentano una versione molto attiva dell'enzima telomerasi, che impedisce ai telomeri di accorciarsi e quindi inibisce i processi di invecchiamento e morte; in secondo luogo, presentano un numero di cromosomi maggiore che permette di usarle per svariate applicazioni.

Per gli studi *in vivo*, invece, è stato eseguito uno xenotrapianto di cellule HepG2, opportunamente trasdotte con lentivirus per esprimere i costrutti selezionati, in topi di sesso femminile di 4 settimane, alimentati con diete differenti a seconda del controllo che si voleva eseguire. Trenta giorni dopo l'impianto, il tumore veniva asportato per eseguire le analisi (Zhu et al., 2022).

3.1 Metodo sperimentale

Nel corso dello studio, sono state impiegate diverse metodiche sia per la manipolazione dei campioni che per la rilevazione dei risultati. Tre dei saggi prevalentemente usati sono stati: l'RNA interference, il pull-down dell'RNA con biotina (RPD) e l'immunoprecipitazione dell'RNA (RIP).

L'RNA interference si basa sul silenziamento selettivo di un gene target attraverso l'utilizzo di uno short hairpin RNA (shRNA), ovvero una piccola sequenza di RNA che curvandosi forma una struttura a forcina e lega in maniera specifica e selettiva il gene bersaglio (Rao et al., 2009).

RPD e RIP sono invece due tecniche che consentono di analizzare le interazioni instaurate tra lncRNA e proteine per capire come queste vengano alterate nelle cellule tumorali. Nello specifico, l'RPD utilizza proteine ancorate a sfere magnetiche per legare specifiche proteine presenti nei lisati cellulari. Nel caso specifico di questo studio, si sfrutta l'RPD per recuperare gli enzimi del complesso metabolico enzimatico legati a gLINC per monitorarne i livelli (Bierhoff, 2018). Mentre, nell'immunoprecipitazione dell'RNA (RIP) viene utilizzato un anticorpo specifico, generato contro la proteina d'interesse, per spezzare il legame tra la proteina legante l'RNA e l'RNA stesso e isolare quindi i vari componenti per monitorarne composizione e concentrazione (Gagliardi e Matarazzo, 2016).

4. RUOLO E FUNZIONAMENTO DI gLINC NELLE CELLULE TUMORALI

Tra la vastità di ruoli svolti dai lncRNA, c'è un crescente interesse per il controllo regolatorio operato sugli enzimi metabolici attraverso interazioni dirette RNA-proteina. Gli studi si sono concentrati su uno specifico lncRNA, reattivo a c-Myc chiamato glycoLINC (gLINC), il quale funge da spina dorsale nella formazione di complessi, definiti metaboloni, tra gli enzimi della fase di payoff della glicolisi: fosfoglicerato chinasi 1 (PGK1), fosfoglicerato mutasi 1 (PGAM1), enolasi 1 (ENO1) e piruvato chinasi 2 (PKM2); assieme alla lattato deidrogenasi (LDHA) (Zhu et al., 2022).

La privazione di serina e glicina esogena dalle cellule tumorali, attiva l'SSP la quale sottrae dalla glicolisi il carbonio derivato dal glucosio. La produzione incompleta di ATP porta allo stress metabolico e il mancato ripristino dei suoi livelli conduce a conseguenze negative, come l'induzione dell'apoptosi. Tuttavia, la sovraespressione di gLINC, indotta da c-Myc, e la conseguente formazione del complesso di enzimi glicolitici favorita da questo RNA non codificante, aumentano il flusso glicolitico e incrementano la produzione di ATP, consentendo alle cellule tumorali di sopravvivere anche in carenza di serina (Fig. 3) (Zhu et al., 2022).

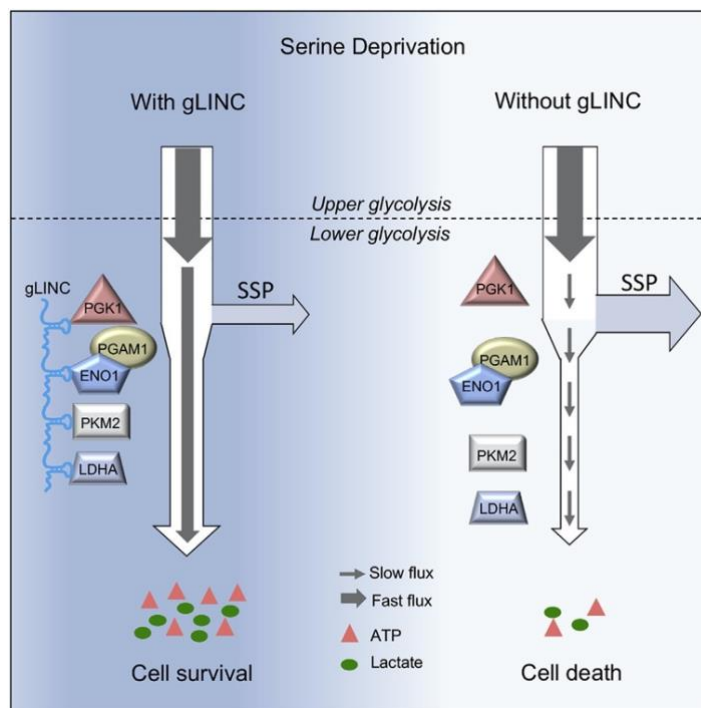


Figura 3. Rappresentazione schematica del funzionamento di gLINC nell'assemblaggio del complesso metabolico enzimatico in condizioni di deprivazione di serina (Zhu et al., 2022)

L'importanza di gLINC nella riprogrammazione metabolica è stata evidenziata in seguito al suo esaurimento; infatti, questo rallenta lo sviluppo dello xenotrapianto di cellule tumorali in topi alimentati con una dieta priva di serina. Gli studi sperimentali condotti si sono anzitutto focalizzati sulla caratterizzazione di gLINC per quanto riguarda la struttura e la funzione (Zhu et al., 2022).

4.1 I metaboloni

Il funzionamento di gLINC si esplica nel guidare l'assemblaggio del complesso PGK1-PGAM1-ENO1-PKM2-LDHA per migliorare la capacità glicolitica delle cellule tumorali (Zhu et al., 2022).

L'esistenza dei metaboloni è stata postulata per la prima volta negli anni '70 del secolo scorso dagli studi condotti da P. A. Srere sugli enzimi del ciclo di Krebs. Si tratta di complessi multiproteici formati da enzimi con ruolo strutturale-funzionale, definiti anche canalizzazioni metaboliche poiché nel corso delle reazioni i substrati sono mantenuti al loro interno finché non viene catalizzata l'intera reazione. Sono abbondanti in molte vie metaboliche e si distinguono dai complessi multienzimatici presenti nel citosol o nelle membrane cellulari per la loro estrema dinamicità e transitorietà (Zhang e Fernie, 2020).

I metaboloni sono costituiti dagli enzimi sequenziali di una via metabolica, come in questo caso da quelli della fase di payoff della glicolisi, uniti tra loro da interazioni fisiche transitorie, proteina-proteina o proteina-lipidi, che permettono la canalizzazione del substrato in modo tale da regolare il flusso metabolico associando o dissociando le varie componenti (Fig. 4) (Zhang e Fernie, 2020). La loro formazione può essere guidata da assemblaggio autodiretto oppure da meccanismi biofisici come la chemiotassi guidata da substrato (Zhu et al., 2022) presenti nel citosol o nelle membrane cellulari.

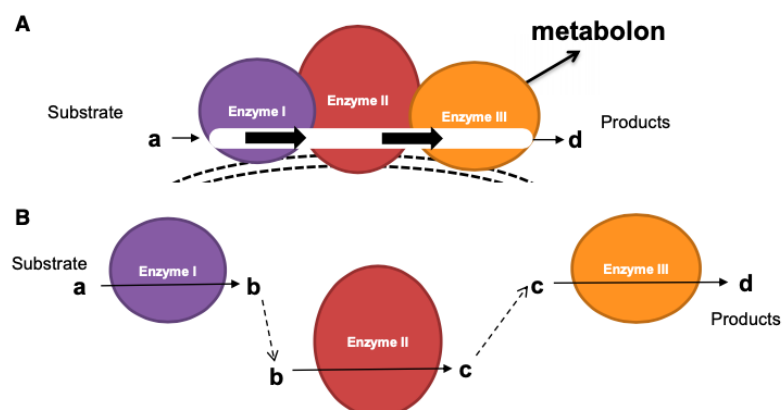


Figura 4. **Associazione degli enzimi a formare il metabolone**

Via metabolica in cui il prodotto d è sintetizzato dal substrato a attraverso le reazioni catalizzate dagli enzimi I, II e III. b e c sono intermedi di percorso. (A) L'associazione del metabolone migliorerà le reazioni del percorso e dovrebbe aumentare la regolazione del

percorso. (B) La dissociazione del metabolone sottoregola il percorso (Zhang e Fernie, 2020).

4.2 Scoperta dei ruoli di gLINC nel metabolismo tumorale

Per comprendere quali lncRNA fossero coinvolti nella regolazione del metabolismo cellulare guidata da c-Myc, si è utilizzata la linea cellulare di linfoma di Burkitt umano P493-6 la quale presenta un sistema tet-off di c-MYC. Questo sistema viene sfruttato per regolare l'espressione genica e utilizza la tetraciclina o la doxiciclina come interruttore di controllo per interrompere l'espressione genica di specifici geni bersaglio (Zhu et al., 2022).

In seguito al trattamento con doxiciclina per inibire c-Myc, tramite analisi microarray, è stato possibile identificare i primi 10 lncRNA dipendenti da c-Myc. Questi sono stati verificati con PCR quantitativa (qPCR) usando come riferimento il fattore inibitorio di lncRNA c-Myc responsivo (MIF) (Zhu et al., 2022).

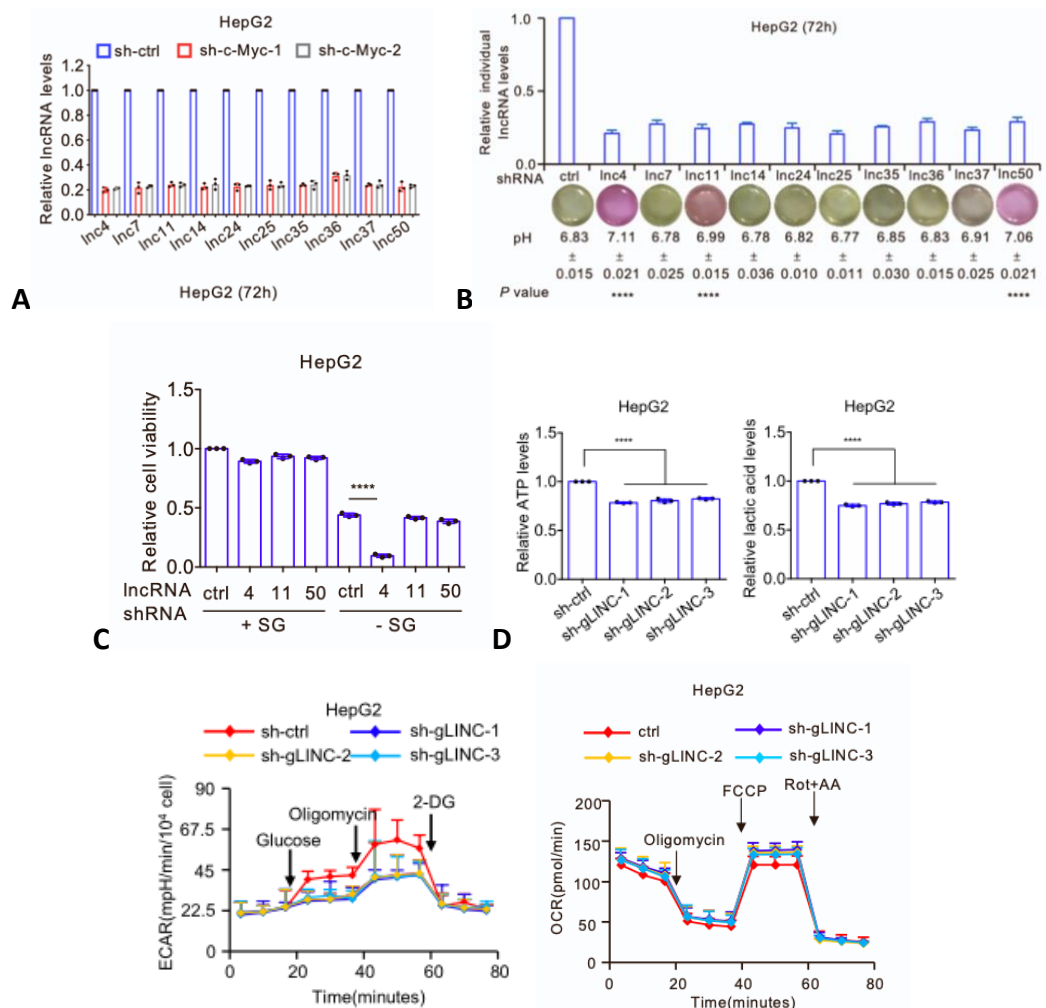
In seguito, per capire se tutti questi 10 lncRNA fossero espressi e regolati in maniera simile, sono stati testati nelle cellule di carcinoma epatico umano (HepG2) dove c-Myc è regolato in maniera endogena. Le analisi ottenute dal sequenziamento dell'RNA (RNA-seq), hanno confermato che la maggior parte dei lncRNA viene sovraespressa in presenza di c-Myc mentre è ridotta in seguito al suo knockdown (Fig. 5.A) (Zhu et al., 2022).

Individuati i 10 lncRNA, si è poi cercato di determinare l'effetto metabolico di ciascuno di essi, per capire in particolare se contribuivano al metabolismo della serina. Per fare ciò, sono state usate cellule HepG2 trasdotte con lentivirus contenenti short hairpin RNA (shRNA) disegnati per bersagliare i diversi lncRNA. Quest'analisi ha messo in rilievo 3 lncRNA (lnc4, lnc11 e lnc50), in quanto in normali condizioni di crescita il loro silenziamento portava ad un ritardo nell'acidificazione del mezzo di coltura (ECAR), causato da una ridotta produzione di lattato e indice quindi del loro coinvolgimento nella formazione dei complessi di enzimi glicolitici (Fig. 5.B) (Zhu et al., 2022).

Successivamente, si è cercato di capire quale tra questi lncRNA fosse effettivamente responsabile dell'assemblaggio del metabolone. Tramite esperimenti di silenziamento, si è visto che specialmente l'assenza di lnc4 riduce la vitalità delle cellule in seguito a condizioni di coltura prolungate in assenza di glicina e serina (Fig. 5.C). Questi risultati hanno evidenziato il ruolo di lnc4 nel metabolismo della glicina/serina che permette la sopravvivenza delle cellule tumorali anche in loro assenza (Zhu et al., 2022).

lnc4 presenta 5 diverse isoforme di cui la più abbondante, sia in condizioni normali che quando viene sovraespresso c-Myc, è la 3. Anche se l'analisi della sua sequenza di questa isoforma con il *coding potential calculator* (CPC) ha rivelato un punteggio basso, la sua reale natura di lncRNA è stata confermata, poiché dalla

sua traduzione *in vitro* non è stata prodotta alcuna proteina. È quindi possibile affermare, con un elevato livello di confidenza, che l'isoforma 3 di Inc4 è il gLINC coinvolto nella sovraregolazione della glicolisi nelle cellule tumorali e nell'assemblaggio dei complessi di enzimi glicolitici. A suggerire effetti sulla glicolisi è stato in particolare il silenziamento di gLINC. Questo è stato ottenuto nelle cellule HepG2 usando tre diverse sequenze bersaglio indipendenti legate da tre diversi shRNA. In tutti e tre i casi è stata evidenziata una diminuzione nella produzione di ATP e lattato ed è stato misurato un ritardo del tasso di acidificazione extracellulare (ECAR), mentre si è verificato un aumento del tasso di consumo di ossigeno (OCR) (Fig 5.D), dati che complessivamente sono indice quindi dell'assenza del complesso enzimatico glicolitico. Viceversa, la sovraespressione di gLINC era caratterizzata dall'aumento della produzione di ATP, lattato con incremento dell'ECAR e un contemporaneo rallentamento dell'OCR (Fig 5.E). Lo stesso esperimento è stato ripetuto su cellule di cancro cervicale HeLa ottenendo risultati paragonabili. Grazie a questi esperimenti è stato quindi possibile stabilire che gLINC aumenta la glicolisi aerobica rallentando invece la fosforilazione ossidativa (Zhu et al., 2022).



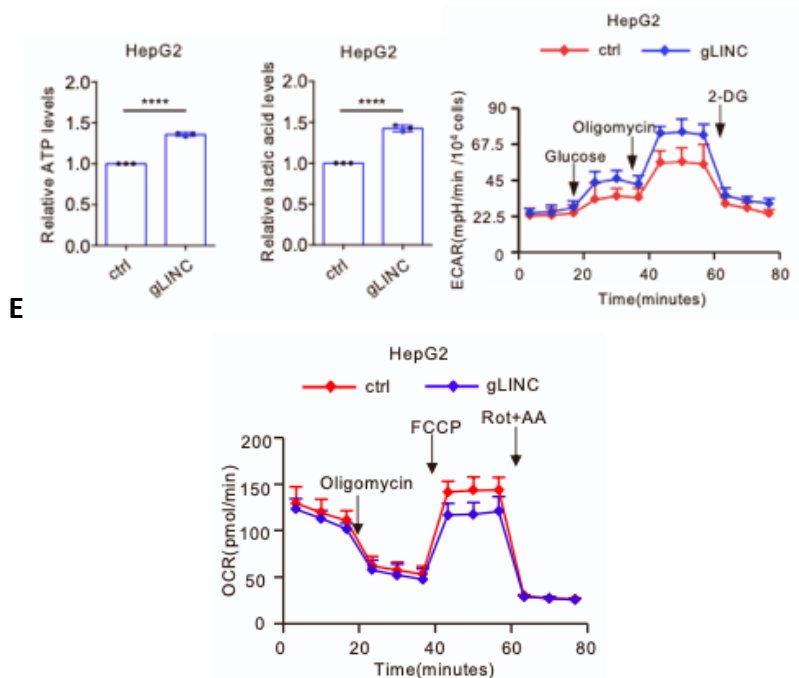


Figura 5. **Risultati sperimentali.** (A) Il knockdown di c-Myc ad opera di shRNA diminuisce l'espressione di 10 lncRNA nelle cellule HepG2. (B) il silenziamento dei lncRNA 4, 11 e 50 in cellule HepG2 causa ritardo nell'acidificazione del mezzo di coltura. (C) Il knockdown di lnc4 ma non di lnc11 o lnc50 causa l'inibizione della crescita nelle cellule HepG2 in condizioni di privazione di serina e glicina. (D) Il silenziamento di gLINC usando 3 diverse sequenze bersaglio nelle cellule HepG2 ha evidenziato una diminuzione nella produzione di ATP e lattato, un ritardo dell'ECAR, e un aumento dell'OCR. (E) La sovraespressione di gLINC ha aumentato la produzione di ATP e lattato, accelerato l'ECAR e ritardato l'OCR nelle cellule HepG2 (Zhu et al., 2022).

4.3 Interazione tra c-Myc, gLINC e USP2a

Dopo aver analizzato il ruolo di gLINC nel metabolismo tumorale, è stata presa in esame la relazione regolatoria che intercorre tra c-Myc e gLINC. Il modello più accreditato prevede un meccanismo di regolazione reciproca. Infatti, è stata osservata una bassa espressione di gLINC in linee cellulari normali con bassi livelli di espressione di c-Myc, mentre nelle linee cellulari tumorali, in cui i livelli di c-Myc sono più elevati, si sono riscontrate concentrazioni maggiori di gLINC. In accordo con il modello di regolazione proposto, in condizioni di coltura normali, il silenziamento di gLINC portava alla riduzione dei livelli di c-Myc, mentre la sua sovraespressione aumentava la concentrazione di c-Myc (Zhu et al., 2022).

Ulteriori prove a favore di questo modello sono state ottenute esaminando il contesto genomico di gLINC. Questo ncRNA è noto anche come ubiquitina carbossi-terminale idrolasi 2 (USP2) – antisense RNA1 (USP-AS1 o THY-AS1). Il gene corrispondente è infatti localizzato sul cromosoma 11q23 testa a testa con il gene USP2 e in prossimità del gene THY1 (Fig. 6). Una volta trascritto, gLINC si concentra nel citoplasma (Zhu et al., 2022).

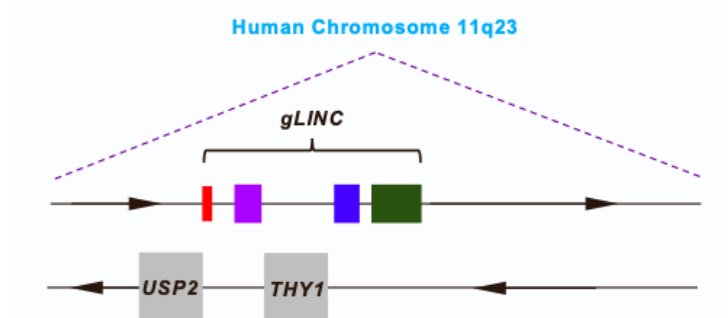


Figura 6. Localizzazione cromosomica di gLINC (Zhu et al., 2022)

Inoltre, il sito di legame di c-Myc E-box, è situato all'interno dell'esone 1 di gLINC e si è rivelato essere un sito trascrizionalmente attivo che favorisce il legame del complesso della RNAPol II. Per verificare il funzionamento di questo sito è stato realizzato un costrutto reporter contenente questo sito di legame per c-Myc: se il BS era intatto, il costrutto rispondeva all'espressione di c-Myc ectopica, mentre mutazioni del sito responsivo impedivano la risposta del costrutto anche in presenza di sovraespressione di c-Myc. Quindi, la transattivazione di gLINC ad opera di c-Myc avviene quando questo lega lo specifico c-Myc BS localizzato nell'esone 1 di gLINC (Zhu et al., 2022).

Vista la posizione genomica di gLINC, si è voluto anche analizzare la sua influenza sulla regolazione dell'espressione dei geni attigui USP2 e THY1. Il silenziamento con shRNA e la sovraespressione di gLINC, nel caso di USP2 hanno evidenziato, rispettivamente, la repressione e la sovraespressione dell'mRNA USP2a, prodotto principale della trascrizione di questo gene. Invece, per quanto riguarda THY1 né il silenziamento né la sovraespressione di gLINC hanno influenzato la sua espressione. Vista l'influenza di gLINC su USP2a, si è pensato che la sola interazione tra gLINC e c-Myc non fosse sufficiente per la formazione del complesso di enzimi glicolitici; si è quindi silenziato USP2a per vedere eventuali cambiamenti. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il suo silenziamento riduceva l'espressione basale di c-Myc e bloccava la capacità di gLINC sovraespresso di incrementare la concentrazione di c-Myc (Fig. 7.A). Si è quindi giunti alla conclusione che, tramite un ciclo di feedforward positivo che include c-Myc, gLINC e USP2a, gLINC sia in grado di promuovere l'espressione di c-Myc attraverso USP2a (Fig. 7).

Grazie al meccanismo di regolazione reciproca, in presenza di USP2a, gLINC migliora la glicolisi guidata da c-Myc, mentre c-Myc è necessario affinché gLINC sia in grado di formare i metaboloni enzimatici (Zhu et al., 2022).

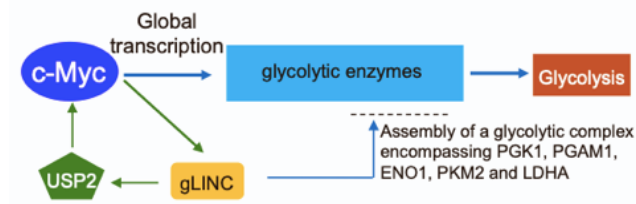


Figura 7. Ciclo feedforward positivo tra c-Myc, gLINC e USP2 che promuove la glicolisi tramite l'assemblaggio di un complesso metabolico enzimatico (Zhu et al., 2022)

Per testare questa triplice regolazione, sono stati misurati i livelli di ATP, lattato e ECAR dopo aver manipolato sia gLINC che c-Myc nelle cellule HepG2 e HeLa. Si è osservato che il silenziamento sia di gLINC che di c-Myc aboliva l'incremento di ECAR, ATP e lattato mentre aumentava l'OCR, innescato rispettivamente dalla sovraespressione di c-Myc e gLINC. Tuttavia, nelle cellule silenziate stabilmente per USP2a non sono stati rilevati questi due fenotipi, ad indicare l'importanza di questo gene nel collegamento dell'espressione di gLINC e c-Myc (Zhu et al., 2022).

4.4 Modalità di assemblaggio del complesso enzimatico glicolitico ad opera di gLINC

L'assemblaggio del complesso PGK1-PGAM1-ENO1-PKM2-LDHA, guidato da gLINC, migliora in primo luogo la capacità delle cellule tumorali di compiere la glicolisi per ricavare energia e in secondo luogo l'efficienza catalitica degli enzimi, aumentandone anche la concentrazione. Per comprendere al meglio come gLINC eserciti questa funzione, si è partiti dall'analisi con spettrometria di massa dell'interattoma, ovvero dell'insieme complessivo di interazioni che gLINC instaura con le proteine all'interno della cellula. Questo ha permesso l'identificazione dei cinque isoenzimi che fanno parte del metabolone. La loro presenza è stata verificata tramite western blotting eseguito su campioni pulldown di RNA (RPD), che ha evidenziato la co-precipitazione di gLINC con ciascuno degli isoenzimi (Fig. 8.A). PGAM1 è l'unico dei cinque a non essere stato individuato con la spettrometria di massa; tuttavia, è nota la sua interazione diretta con ENO1. Silenziando infatti ENO1 nei campioni pulldown di gLINC si è visto come venisse represso anche PGAM1, suggerendo che la sua presenza sia solo in funzione del rapporto che ha con ENO1. Da questi dati, è stato quindi possibile dedurre che gLINC agisce come componente strutturale per facilitare l'associazione tra gli enzimi della fase di payoff della glicolisi e la LDHA a formare i metaboloni. Non a caso, le cellule in condizioni di stress scelgono di usare un prodotto a bassa energia, quale l'RNA, per ottimizzare l'utilizzo delle risorse disponibili (Zhu et al., 2022).

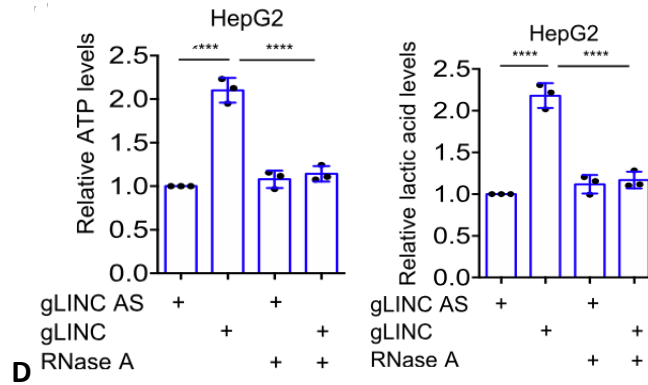
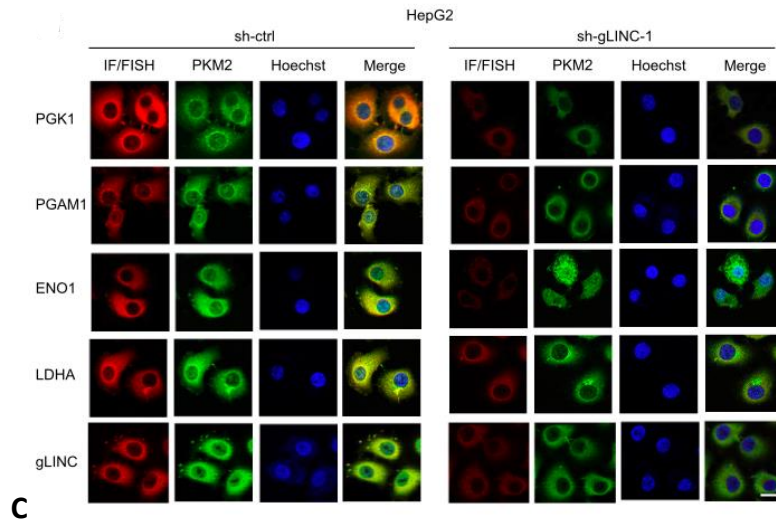
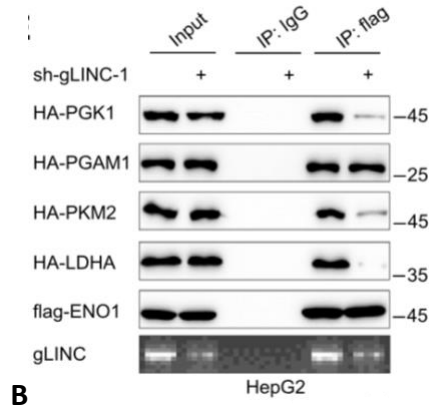
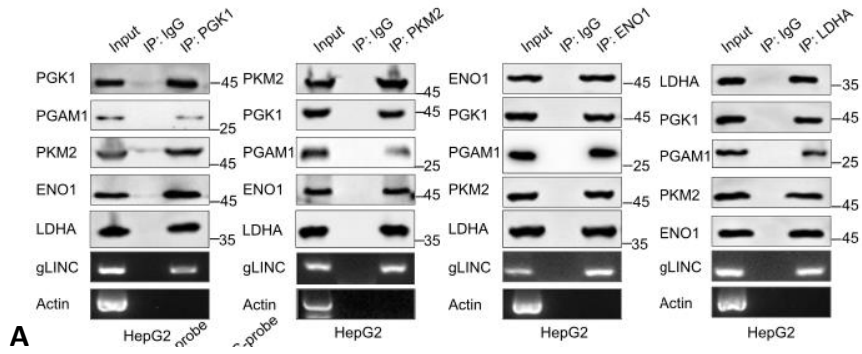
Il ruolo strutturale di gLINC è stato anzitutto confermato dal pretrattamento degli estratti cellulari con RNasi A, poiché questo ha infatti abolito l'interazione tra

PGK1, ENO1, PKM2 e LDHA dimostrando che l'RNA è necessario per la formazione del complesso. Tuttavia, come previsto, la RNasi A non ha influenzato il legame ENO1-PGAM1. Analogamente, il silenziamento di gLINC con tre diversi shRNA ha ridotto il legame tra ENO1 e PGK1 e tra PKM2 e LDHA senza però influenzare il legame tra ENO1 e PGAM1 (Fig. 8.B). Un'altra analisi eseguita usando la centrifugazione a gradiente di densità ha dimostrato che i cinque isoenzimi si disponevano nella stessa frazione ad alto peso molecolare, mentre nelle cellule in cui la concentrazione di gLINC era bassa si è osservata una maggiore dispersione degli enzimi. Questo suggerisce l'importanza della stechiometria di gLINC nell'assemblaggio del complesso ad alto peso molecolare (Zhu et al., 2022).

Le analisi di distribuzione subcellulare eseguite con la FISH (ibridazione fluorescente in situ) hanno confermato la localizzazione di gLINC nel citoplasma (Fig 8.C). Coerentemente con questo, le analisi di distribuzione cellulare condotte con microscopia confocale, hanno mostrato una colocalizzazione citoplasmatica di PGK1, ENO1, PGAM1, PKM2 e LDHA che si riduceva nelle cellule impoverite di gLINC; in questa condizione l'unica colocalizzazione a non venire intaccata era quella tra ENO1 e PGAM1 (Zhu et al., 2022).

Inoltre, il ruolo di gLINC nell'assemblaggio del complesso enzimatico è stato ulteriormente validato da studi in vitro in cui i cinque isoenzimi erano presenti come proteine ricombinanti purificate. L'aggiunta di gLINC, sintetizzato in vitro, ha infatti guidato la co-associazione dei cinque enzimi ricombinanti; inoltre, come previsto, l'associazione tra ENO1 e PGAM1 si è verificata anche in assenza di gLINC. Ottenuto il complesso in vitro, questo è stato incubato con gli intermedi acido 1-3 bifosfoglicerico, ADP e NAD necessari agli enzimi per produrre ATP e lattato confermando ulteriormente il ruolo strutturale di gLINC, che si è tradotto in un aumento dell'efficienza catalitica del complesso. (Fig. 8.D)

L'ultima analisi strutturale in vitro condotta su gLINC ha messo in evidenza le specifiche regioni di legame utilizzate dall'RNA non codificante per la formazione del complesso glicolitico. Sono stati utilizzati mutanti di delezione di gLINC in combinazione con saggi RPD (Zhu et al., 2022). In particolare, si è trovato che alla regione 1-510 si legava PKM2 ma non gli altri enzimi, alla regione 511-764 si legavano ENO1 (e di conseguenza anche PGAM1) e LDHA, mentre era necessario gLINC intatto per permettere il legame di PGK1 (Fig. 8.E) (Zhu et al., 2022).



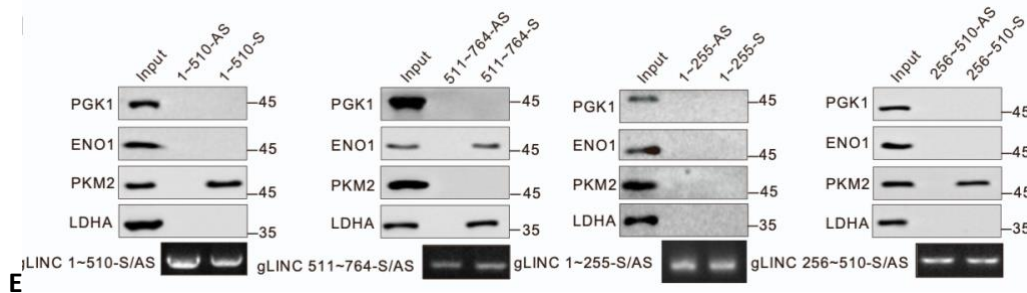


Figura 8. Risultati sperimentali. (A) La co-associazione tra gLINC e i cinque isoenzimi è stata verificata tramite western blotting su campioni RPD. (B) Il silenziamento di gLINC ha ridotto il legame tra ENO1 e PGK1 e tra PKM2 e LDHA senza però influenzare il legame tra ENO1 e PGAM1. (C) La tecnica FISH mette in evidenza la localizzazione dei cinque isoenzimi nel citoplasma, confrontata con il silenziamento di gLINC che invece ne riduce la colocalizzazione. (D) gLINC, in presenza degli intermedi glicolitici ATP, NAD e 1-3 bifosfoglicerato, ha aumentato la produzione di lattato nelle cellule HepG2. (E) L'utilizzo di mutanti di delezione di gLINC in saggi RPD ha evidenziato a quali regioni si legano i vari enzimi (Zhu et al., 2022).

4.5 Influenza della di carenza di serina

Le cellule cancerose mettono in atto diverse modalità di adattamento per sopravvivere allo stress associato alla necessità di energia e nutrienti necessari per la loro proliferazione (Maddocks et al., 2017). In particolare, la carenza di serina porta inizialmente le cellule ad assorbire quella esogena e in un secondo momento ad attivare *de novo* la SSP aumentando il suo metabolismo (Maddocks et al., 2017). Questo aumenta gli enzimi SSP che indirizzano l'intermedio della glicolisi 3-fosfoglicerato verso la sintesi della serina stessa, limitando così la glicolisi aerobica necessaria, invece, per la produzione di energia. Questo perché tale aminoacido è essenziale per la sintesi di acidi nucleici, proteine e lipidi che sono cruciali per la proliferazione tumorale (Antonov et al., 2014). In queste condizioni, in particolare *in vivo*, si è osservata una sovraregolazione degli enzimi del complesso glicolitico, ad eccezione di PGAM1, ad opera di c-Myc e gLINC.

4.5.1 Influenza su gLINC

Per comprendere come l'assenza di serina influenzasse il metabolismo tumorale e nello specifico il funzionamento di gLINC, le analisi condotte precedentemente sono state ripetute in carenza di serina e glicina. Serina e glicina sono infatti collegate biosinteticamente dall'enzima serina metil-tranferasi (SHMT) che trasforma glicina in serina (Maddocks et al., 2017).

Nonostante ciò, è stato osservato che solo la rimozione della serina, e non della glicina dal mezzo di coltura riduceva la vitalità delle cellule HepG2 (Fig. 9.A). Inoltre, le analisi dei livelli di gLINC in condizioni di privazione di serina, hanno mostrato una sua sovraregolazione dovuta alla maggiore espressione di c-Myc.

Sulla base di quest'ultimo risultato, si è operato il silenziamento di gLINC con tre diversi shRNA sia nelle cellule HepG2 che nelle cellule HeLa, osservando una riduzione della vitalità cellulare in assenza di glicina/serina (Fig. 9.B). Inoltre, sempre in queste condizioni, l'esaurimento di gLINC ha ridotto i livelli di ATP e acido lattico rallentando l'ECAR (Zhu et al., 2022).

Tramite marcatura delle cellule con glucosio marcato con ^{13}C , si è osservato che in condizioni di carenza di serina/glicina il silenziamento di gLINC ritardava il flusso glicolitico, mentre veniva favorita la SSP poiché gli intermedi della glicolisi venivano indirizzati a questa via (immagine). Quindi, da questi dati si può affermare che gLINC favorisce e migliora il flusso glicolitico nel momento in cui la carenza di serina indirizza l'intermedio 3PG verso la sua stessa sintesi (Zhu et al., 2022).

Sono stati anche usati saggi clonogenici a lungo termine (Fig. 9.C) nelle cellule HepG2 e HeLa per valutare gli effetti di gLINC sulla vitalità cellulare. Il silenziamento di gLINC in presenza di livelli normali di serina/glicina ha mostrato livelli inibitori minimi, viceversa in carenza di serina/glicina riduceva la vitalità cellulare. Questa condizione poteva essere modificata aggiungendo al mezzo di coltura ATP esogeno, in modo da ripristinare la vitalità delle cellule anche in assenza di gLINC (Zhu et al., 2022).

È stato anche possibile confrontare *in vivo* i dati ottenuti *in vitro*, monitorando la crescita dello xenotrapianto in topo. È stato osservato che nei topi sottoposti a dieta priva di serina e glicina veniva inibita la crescita tumorale, in particolare in presenza di bassi livelli di gLINC (Fig. 9.D). Inoltre, è stato visto che *in vivo* le conseguenze dovute all'esaurimento dei livelli di gLINC sono più accentuate che *in vitro* per l'instaurarsi di interazioni più stabili. Nelle cellule con normali livelli di gLINC, la privazione di serina e glicina ne ha indotto una maggiore espressione che ha anche evidenziato una maggiore espressione delle sue componenti *in vivo* (Zhu et al., 2022). In accordo con i risultati raccolti *in vitro*, la privazione di glicina e serina aumenta l'espressione degli enzimi PGK1, ENO1, PKM2 e LDHA ma non PGAM1 e riduce i livelli di ATP (Zhu et al., 2022).

Anche l'alimentazione dei topi con xenotrapianto ha influenzato i livelli plasmatici di serina e glicina. Infatti, nei topi alimentati con cibo carente dei due aminoacidi questi sono diminuiti. In caso invece di silenziamento di gLINC, i livelli aumentavano solo se i topi venivano alimentati con cibo normale, ad indicare che i soli cambiamenti metabolici indotti da questo lncRNA erano in grado di modificare i livelli di glicina e serina (Zhu et al., 2022).

Dalle analisi *in vivo* è quindi possibile validare la funzione di gLINC nella sopravvivenza e crescita delle cellule tumorali, che può garantire il corretto apporto di ATP soprattutto quando la serina è carente. Tuttavia, a complicare questo risultato, va ricordato il circuito feedforward positivo instaurato tra c-

Myc/USP2a e gLINC, oltre al fatto che gli enzimi glicolitici sono transattivati da c-Myc. È stato infatti osservato che il silenziamento di c-Myc rallenta la crescita delle cellule tumorali causandone anche l'apoptosi. Quindi, per favorirne la proliferazione è necessario non alterare il circuito feedforward positivo e mantenere bassi i livelli di serina e glicina nella dieta per garantire un migliore funzionamento di gLINC (Zhu et al., 2022).

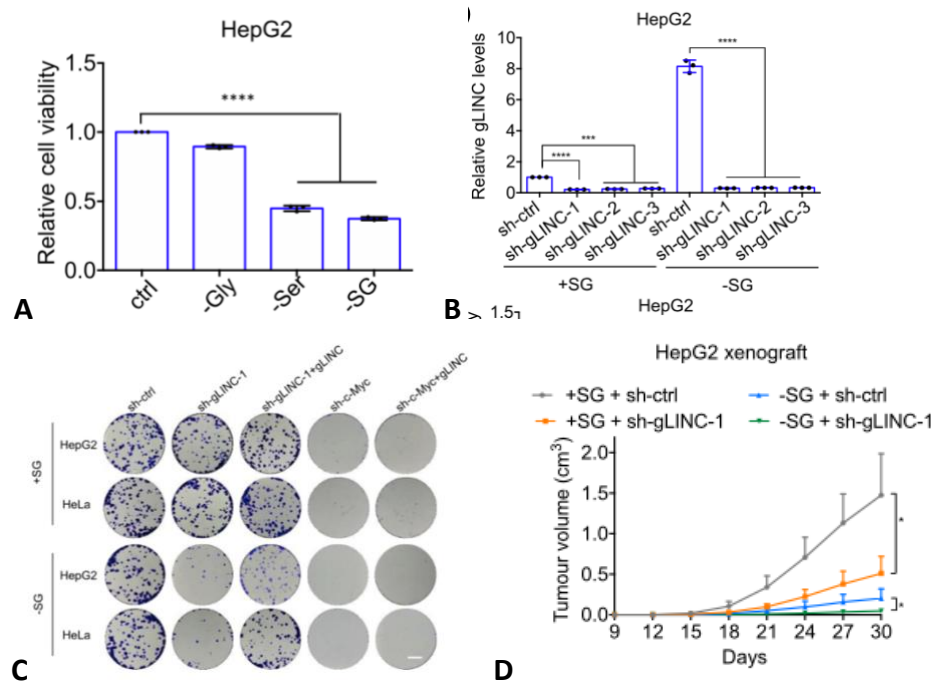


Figura 9. **Risultati sperimentali.** (A) La rimozione della serina e non della glicina dal mezzo colturale riduceva la vitalità delle cellule HepG2. (B) Il silenziamento di gLINC in condizioni sia di presenza che di carenza di serina/glicina ne riduceva i livelli nelle cellule HepG2. (C) Saggi clonogenici condotti su cellule HepG2 in condizioni sia di presenza che di carenza di serina/glicina. (D) Bassi livelli di gLINC rallentano la crescita della massa tumorale dello xenotrapianto in topo (Zhu et al., 2022).

4.5.2 Influenza sul complesso enzimatico glicolitico

Coerentemente con il percorso di regolazione operato da c-Myc/USP2a e gLINC, esperimenti *in vitro*, condotti su cellule HeLa e HepG2, hanno evidenziato che la carenza di serina e glicina aumentava gli enzimi del complesso glicolitico PKG1, ENO1, PKM2 e LDHA (Zhu et al., 2022).

Test RPD e RIP, hanno evidenziato un aumento della quantità degli isoenzimi glicolitici complessati con gLINC in condizioni di deprivazione di serina e glicina (Fig. 10.) (Zhu et al., 2022).

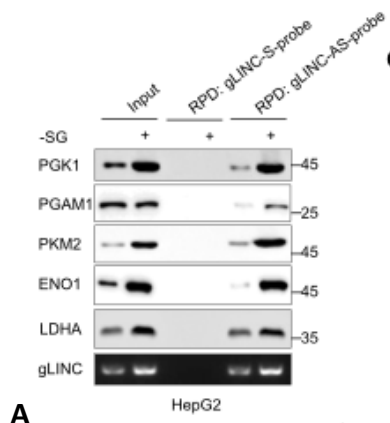


Figura 10. **Risultati sperimentali.** Un aumento dell'associazione tra gLINC, PGK1, ENO1, PKM2 e LDHA è stato osservato nel saggio RPD in seguito a privazione di serina/glicina (Zhu et al., 2022).

A ulteriore conferma della necessità di gLINC nella formazione del complesso enzimatico, sono stati usati i suoi mutanti di delezione 1-510 e 511-764 che hanno dimostrato l'importanza di avere gLINC per consentire il legame di tutti e quattro gli isoenzimi (Zhu et al., 2022).

La presenza di gLINC intatto è quindi essenziale per consentire la formazione di un complesso enzimatico glicolitico capace di mantenere attiva la glicolisi e di conseguenza la sopravvivenza cellulare, in condizioni di stress metabolico dovute alla carenza di serina (Zhu et al., 2022).

4.6 Limiti dello studio

Il confronto tra il genoma umano e quello di *Mus musculus* non ha mostrato somiglianze nelle sequenze gLINC impedendo quindi la possibilità di realizzare modelli di topi transgenici utili per validare *in vivo* i risultati ottenuti con le linee cellulari tumorali (Zhu et al., 2022).

Inoltre, in tre casi è stata evidenziata una tendenza opposta: infatti, alti livelli di espressione di gLINC sembrerebbero peggiorare la sopravvivenza delle cellule carcinoma epatocellulare, di adenocarcinoma del colon e del carcinoma a cellule squamose cervicali (Zhu et al., 2022).

5. CONCLUSIONE

Lo studio delle sequenze contenute all'interno di quello che veniva definito "DNA spazzatura" ha aperto la strada per la comprensione della loro importanza regolatoria e strutturale all'interno della cellula. Infatti, interagendo con DNA, RNA e proteine, gli RNA trascritti da queste regioni, modulano molte funzioni necessarie per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

In particolare, le analisi condotte sui lncRNA hanno sottolineato la fondamentale importanza del "DNA spazzatura". Grazie a studi recenti è stata evidenziata una loro funzione anche nelle cellule tumorali, aprendo una nuova strada nello studio dei meccanismi di adattamento metabolico messi in atto in condizioni di stress da queste cellule deregolate. Si è dimostrato infatti che uno specifico lncRNA è la colonna portante nella formazione di un complesso che collega assieme i cinque enzimi glicolitici (PGK1, PGAM1, ENO1, PKM2, LDHA) contribuendo a migliorare la produzione di energia, garantendo la proliferazione delle cellule tumorali in condizioni normali, ma soprattutto quando la concentrazione di serina è bassa.

Nonostante i limiti evidenziati soprattutto dalle differenze tra uomo e *Mus Musculus* nelle sequenze di gLINC, la potenzialità di questa scoperta è molto elevata. Infatti, il coinvolgimento di gLINC nel metabolismo tumorale e in particolare in associazione con l'oncogene c-Myc offre grandi vantaggi per comprendere al meglio il funzionamento del metabolismo tumorale stesso in modo tale da poter poi sviluppare delle terapie mirate. Risulta quindi essenziale proseguire gli studi su questo ncRNA. In particolare, sarebbe necessario comprendere quali siano gli ulteriori ruoli operati da gLINC nel metabolismo, durante gli adattamenti cellulari e ottenere un quadro più chiaro di come viene costituito il complesso metabolico guidato da gLINC. Sarebbe anche interessante studiare il suo ruolo nei tumori, come quelli al cervello, che usano come unica fonte energetica il glucosio.

Glossario

c-Myc: proto-oncogene coinvolto nei processi di proliferazione cellulare e implicato nello sviluppo di molti tumori umani

ECAR: tasso di acidificazione del mezzo colturale. Parametro utilizzato per misurare la produzione di lattato, e quindi il funzionamento della glicolisi, nelle cellule

ENO1: enolasi 1, enzima coinvolto nella fase di payoff della glicolisi. In particolare, catalizza l'ultimo step della conversione del glucosio in due molecole di piruvato

gLINC: lungo RNA non codificante coinvolto nella formazione del complesso enzimatico glicolitico nelle cellule tumorali, che consente un maggiore apporto di energia in condizioni di privazione di serina e glicina

LDHA: lattato deidrogenasi, enzima coinvolto nella conversione del piruvato in lattato in condizioni anaerobiche per produrre ulteriore glucosio permettendo la glicolisi

lncRNA: RNA non codificanti con lunghezza superiore ai 200 nt, coinvolti in svariati processi di regolazione cellulare

OCR: tasso di consumo di ossigeno. Parametro utilizzato per determinare se le cellule stanno lavorando in condizioni aerobiche o anaerobiche, e quindi i processi metabolici attivati, sulla base della quantità di ossigeno utilizzata

PGAM1: fosfoglicerato mutasi 1, enzima coinvolto nella fase di payoff della glicolisi. In particolare, catalizza l'ottava reazione del processo convertendo il 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato per il trasferimento di un gruppo fosfato

PGM1: fosfoglicerato chinasi 1, enzima coinvolto nella fase di payoff della glicolisi. In particolare, catalizza la settima reazione che a partire da 1,3-bifosfoglicerato e ADP produce 3-fosfoglicerato e ATP

PKM2: piruvatochinasi 2, enzima coinvolto nella fase di payoff della glicolisi. In particolare, catalizza l'ultima reazione del processo trasferendo un gruppo fosfato dal fosfoenolpiruvato all'ADP, producendo ATP e piruvato

RIP: immunoprecipitazione dell'RNA. Tecnica che consiste nell'utilizzo di un anticorpo specifico, generato contro la proteina d'interesse, per spezzare il legame tra la proteina legante l'RNA e l'RNA stesso e isolare quindi i vari componenti per monitorarne composizione e concentrazione

RPD: RNA pull-down assay. Tecnica che consiste nell'utilizzo di proteine ancorate a sfere magnetiche per legare, e recuperare, specifiche proteine presenti nei lisati cellulari

shRNA: short hairpin RNA. Ovvero, una piccola sequenza di RNA che curvandosi forma una struttura a forcina e lega in maniera specifica e selettiva il gene bersaglio. Viene solitamente impiegata nell'RNA interference per silenziare i geni d'interesse

SSP: via di biosintesi della serina. Si attiva nelle cellule in condizioni di carenza di serina e glicina per permetterne nuovamente la sintesi sottraendo gli intermedi della glicolisi

Bibliografia

1. Fantoni A. (2005) Gene e genoma. Enciclopedia dei ragazzi, Treccani
2. Mattick JS, Makuni IV (2006) Non coding RNA. *Hum Mol Genet* 15, R17–R29
3. Amaldi F., Benedetti P., Pesole G., Plevani P. (2018) *Biologia molecolare*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 468-470
4. Paloviita P, Vuoristo S. (2022) The non-coding genome in early human development - Recent advancements. *Semin Cell Dev Biol*, 131: 4-13
5. Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. (2022) Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, pp 96-118
6. Yao RW., Wang Y., Chen LL., (2019) Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat Cell Biol* 21, pp 542-551
7. Zhu Y, Jin L, Shi R, Li J, Wang Y, Zhang L, Liang CZ, Narayana VK, De Souza DP, Thorne RF, Zhang LR, Zhang XD, Wu M. (2022) The long noncoding RNA glycoLINC assembles a lower glycolytic metabolon to promote glycolysis. *Mol Cell*, 82(3):542-554.e6
8. Lu S, Wang Y (2018) Nonmetabolic functions of metabolic enzymes in cancer development. *Cancer Commun (Lond)*, 38(1):63
9. Vaupel P, Multhoff G. (2021) Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol*, 599(6):1745-1757
10. Park JH, Pyun WY, Park HW (2020) Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets *Cells*, 9(10):2308
11. Dang CV (2012) MYC on the path to cancer. *Cell*, 149(1):22-35
12. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. (2015) Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol*, 1250:77-93
13. Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(9):746-59.
14. Bierhoff H. (2018) Analysis of lncRNA-Protein Interactions by RNA-Protein Pull-Down Assays and RNA Immunoprecipitation (RIP). *Methods Mol Biol*, 1686:241-250
15. Gagliardi M, Matarazzo MR. (2016) RIP: RNA Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*, 1480:73-86

16. Zhang Y, Fernie AR. (2020) Metabolons, enzyme-enzyme assemblies that mediate substrate channeling, and their roles in plant metabolism. *Plant Commun*, 2(1):100081
17. Maddocks ODK, Athineos D, Cheung EC, Lee P, Zhang T, van den Broek NJF, Mackay GM, Labuschagne CF, Gay D, Kruiswijk F, Blagih J, Vincent DF, Campbell KJ, Ceteci F, Sansom OJ, Blyth K, Vousden KH. (2017) Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature*, 544(7650):372-376
18. Antonov A, Agostini M, Morello M, Minieri M, Melino G, Amelio I. (2014) Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. *Oncotarget*, 5(22):11004-13