



Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Scienze
Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Tesi di Laurea Triennale

PROTEOSTASI DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO: UN CHECKPOINT CHIAVE NEL CANCRO
ENDOPLASMIC RETICULUM PROTEOSTASIS: A KEY CHECKPOINT IN CANCER

Candidato: BEVILACQUA LISA
Matricola: 1076483

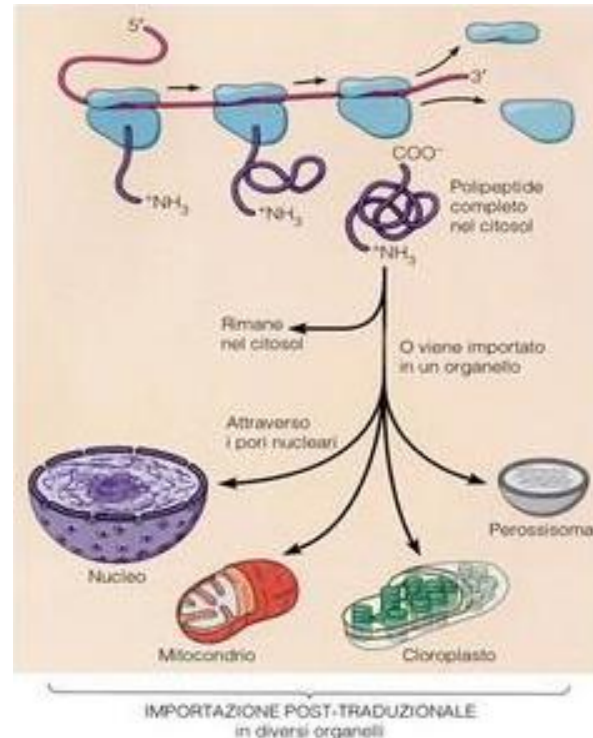
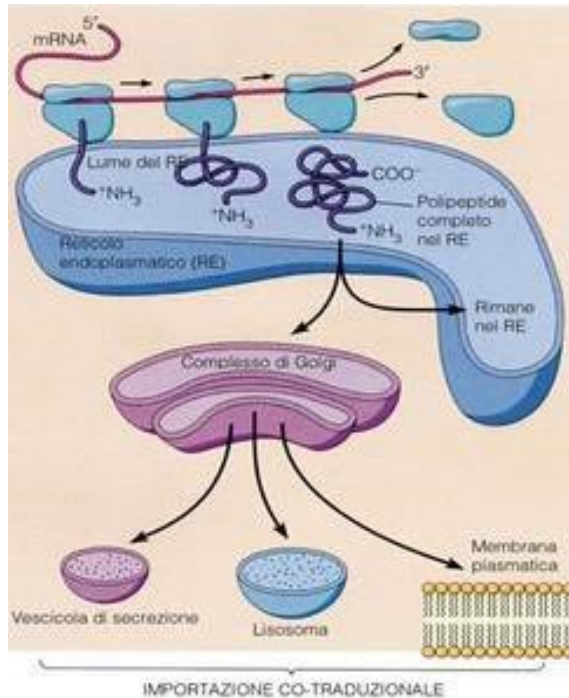
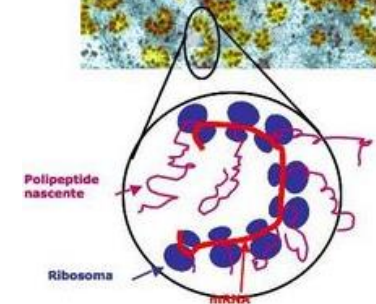
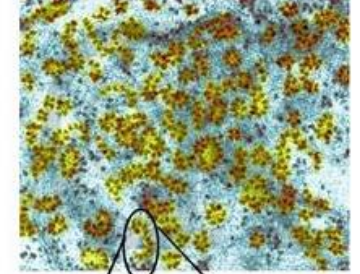
Relatore: PROF.SSA TIZIANA CACCIAMANI

ANNO ACCADEMICO 2019/2020
Sessione straordinaria

Il reticolo endoplasmatico è un sistema di endomembrane situato nel citoplasma che da un punto di vista strutturale può essere distinto in reticolo endoplasmatico liscio (**REL**) e reticolo endoplasmatico rugoso (**RER**) quest'ultimo così chiamato per la presenza di ribosomi.

Questi ultimi sono sintetizzati nel nucleolo e esportati nel citoplasma, dove possono essere sia liberi e sia legati al lato citoplasmatico delle membrane del Reticolo Endoplasmatico (ER).

Al microscopio elettronico i ribosomi appaiono associati in catene di 5-20 elementi, denominati **POLISOMI**, dove avviene la traduzione degli mRNA, ovvero la sintesi proteica.



La traduzione degli mRNA inizia nel citoplasma ma in dipendenza di specifici segnali può continuare ed ultimare nel citoplasma stesso > proteine citosoliche oppure sui ribosomi legati all'ER > proteine di membrana; proteine secrete.

Per operare adeguatamente, il RER necessita dei giusti livelli di ATP e Ca⁺⁺, nonché del giusto stato redox.

Unfolded protein response

L'UPR è una rete di segnalazione intracellulare controllata da tre proteine transmembrana del reticolo endoplasmatico che controllano lo stato di ripiegamento proteico:

- **IRE1 α** (inositol-requiring enzyme 1)
- **PERK** (PRK-like kinase)
- **ATF6** (fattore 6 attivante la trascrizione)

Coadiuvate da chaperoni quali

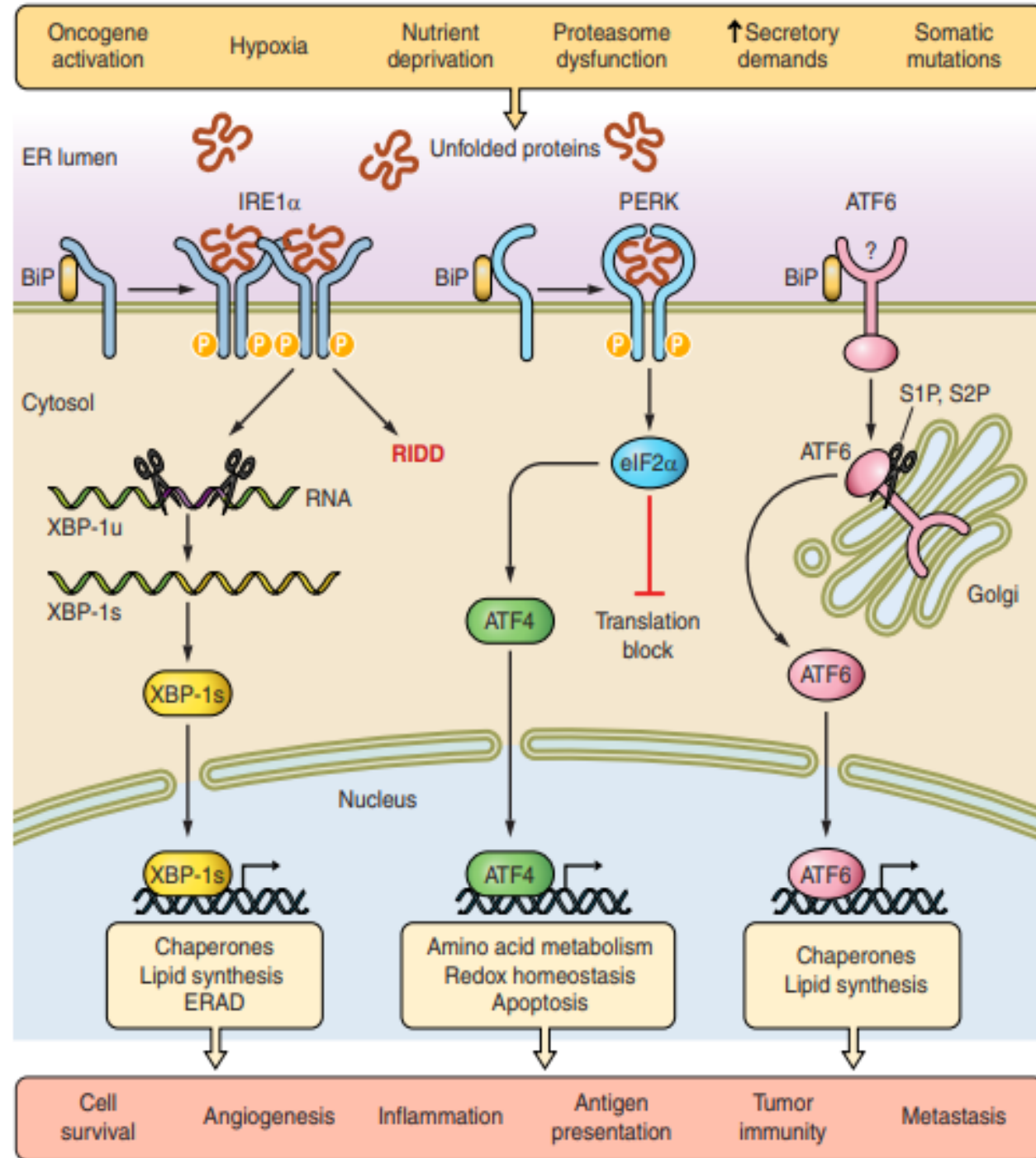
- **Bip** [binding immunoglobulin protein; oppure GRP78 (78-kDa glucose-regulated proteina)]
- **HSPA5** (heat shock protein family A member 5)].

Tra le condizioni che possono portare all'accumulo di proteine mal ripiegate, e conseguentemente ad uno stress dell'ER \rightarrow scarsità di nutrienti, disfunzioni del proteasoma, richieste sostenute nella secrezione o mutazioni somatiche.

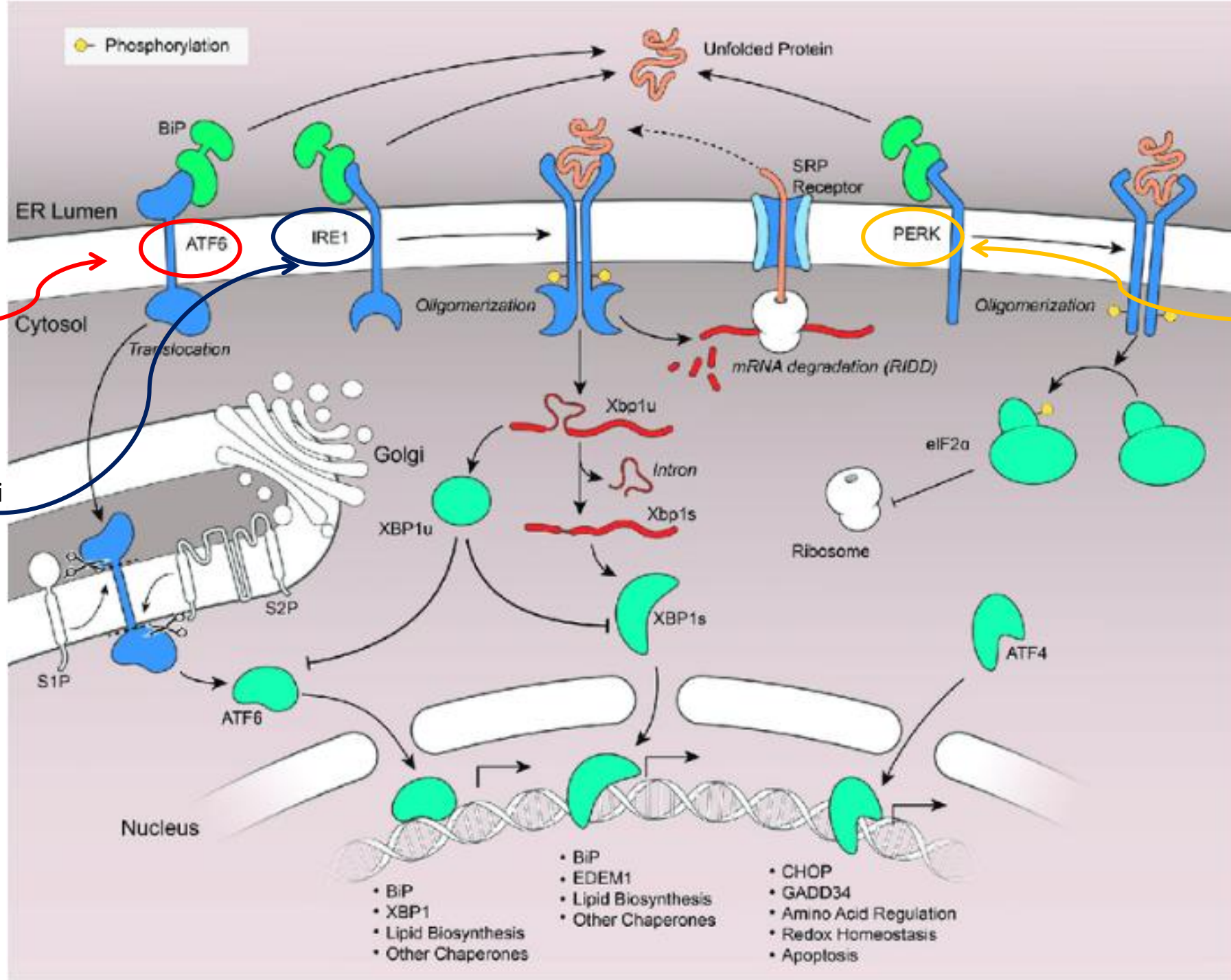
Basso
↓
Adattamento
cellulare

Livello di stress

Alto
↓
Distruzione
cellulare

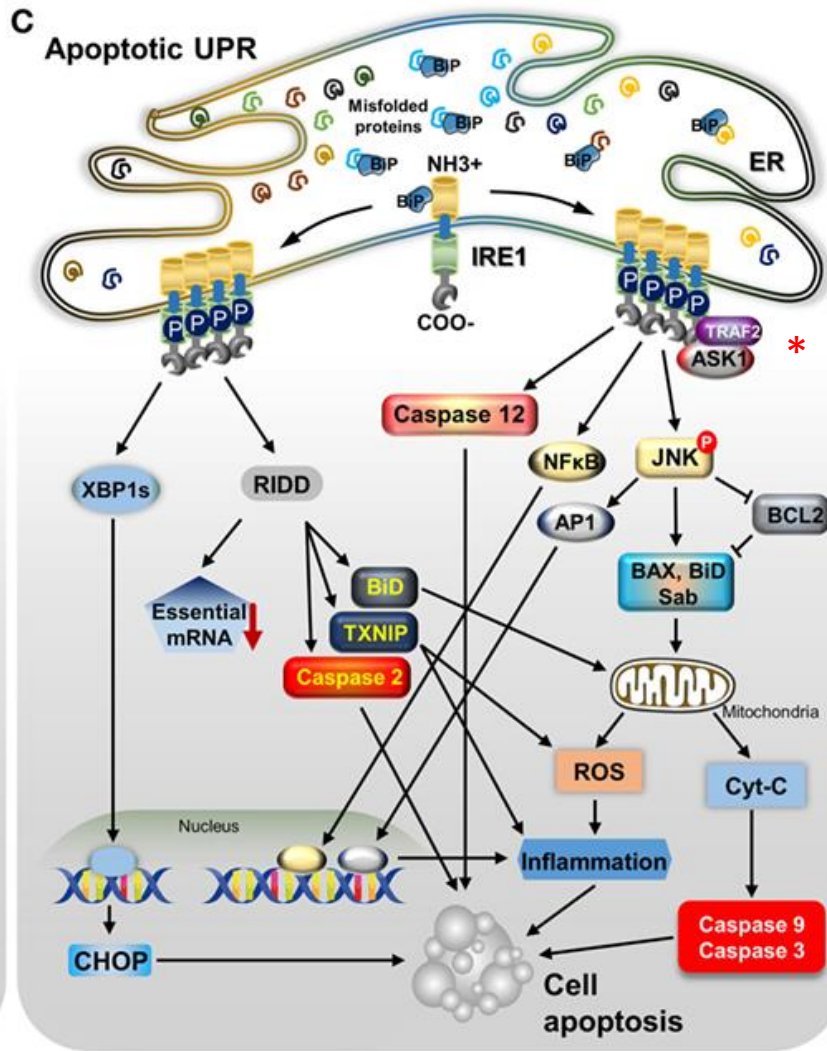
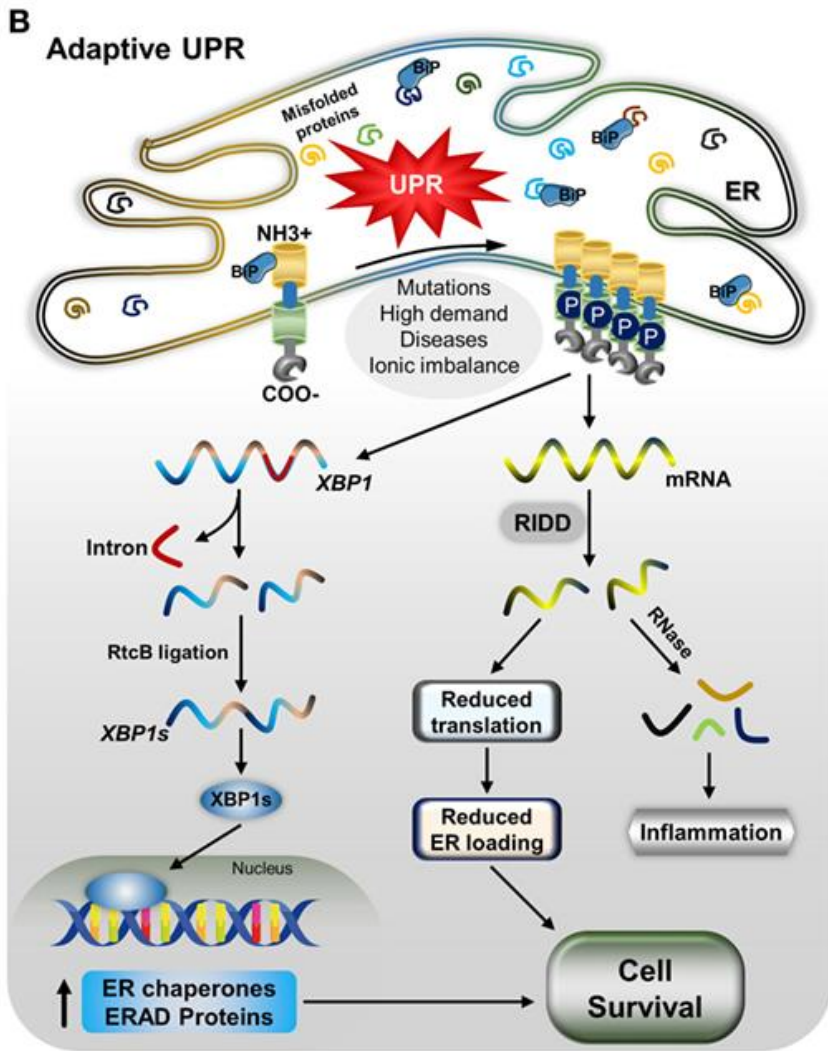


Proteina transmembrana di tipo II che ha un fattore di trascrizione bZIP nella coda citoplasmatica.



Contiene una chinasi citosolica che fosforila eIF2α

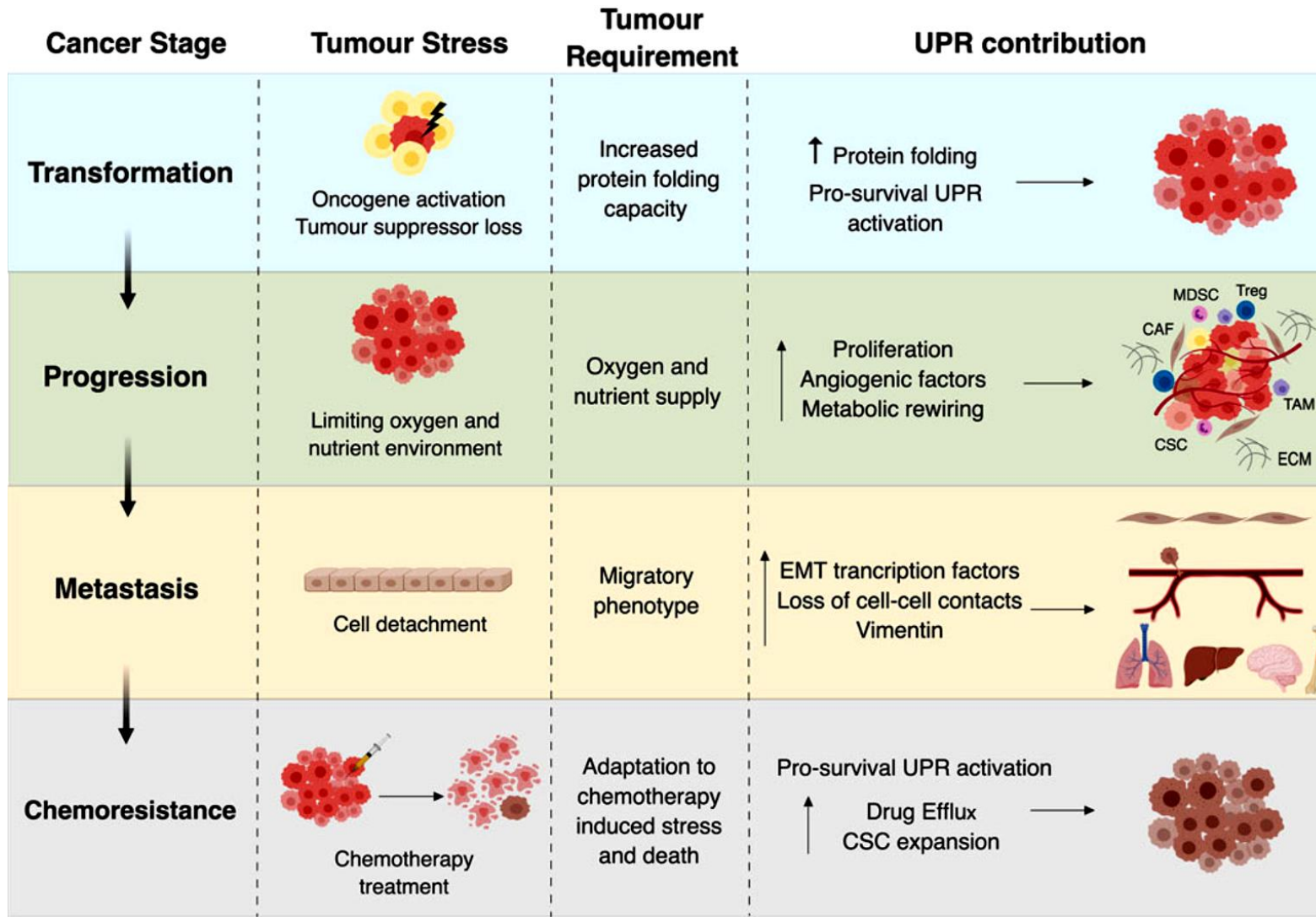
Chinasi/endoribonucleasi bifunzionale (RNAsi)



IRE1a è il maggiore attore nella transizione fra UPR adattivo e terminale perché la forma oligomerica viene riconosciuta dal complesso TRAF2-ASK1 (*) che attiva la cascata degli eventi apoptotici
 Inoltre l'aumento/ stabilizzazione di XBP1s induce la trascrizione di CHOP (CCAAT- enhancer -binding protein attivatore dell'apoptosi)

Notare, inoltre, come L'UPR comunica in modi complicati e poco conosciuti con numerose vie di segnalazione. Ad esempio, le vie **NF-KB** (INFIAMMAZIONE) e **HIF-1 α** (IPOSSIA) sono entrambe vie di segnalazione ben note nel promuovere la genesi dei tumori.

RUOLO DELL'UPR NELLA PROGRESSIONE TUMORALE



Diversi studi hanno documentato alti livelli di attivazione dell'UPR in ampi range di tumori solidi.

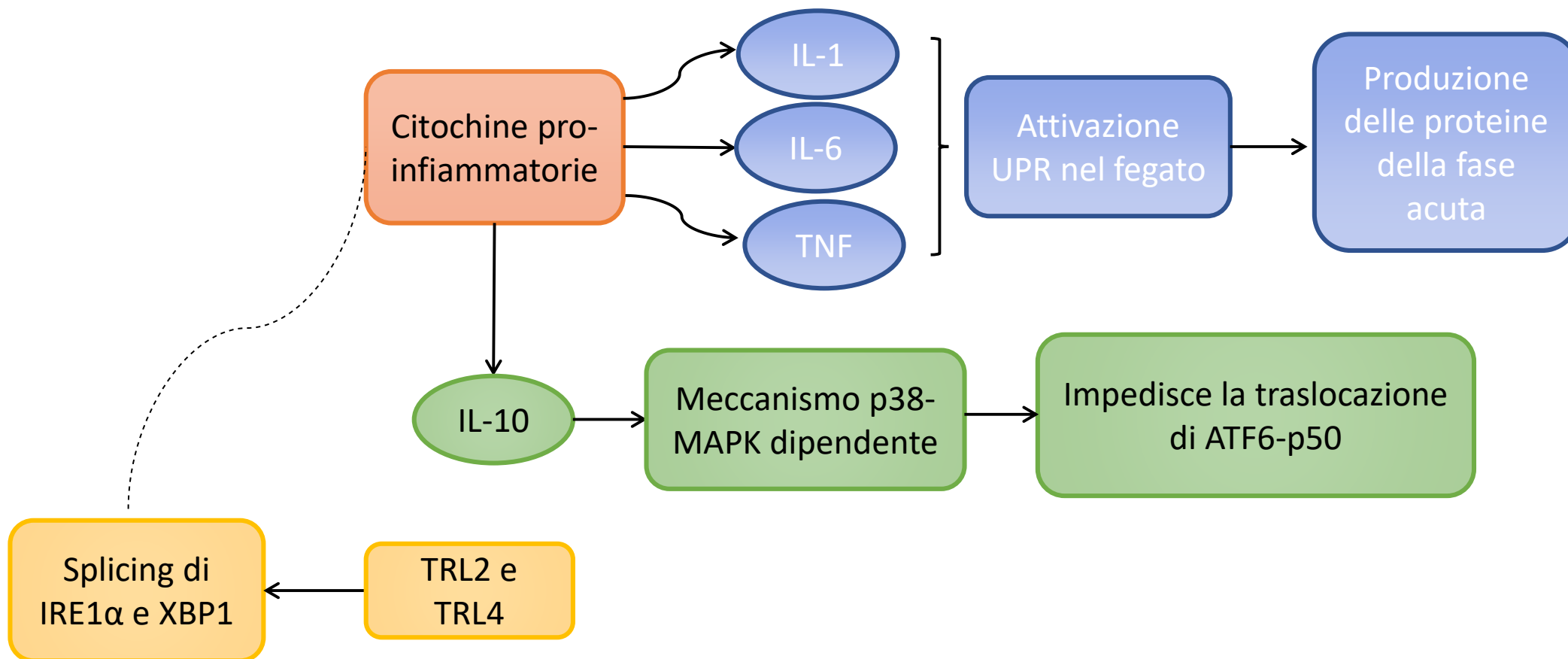
Mentre mutazioni somatiche in IRE1 α o PERK sono rare (1%).

Gli studi di xenotrapianto sui topi, a prova che l'UPR supporta la crescita tumorale, mostrano che l'eliminazione genetica di uno o più rami dell'UPR o l'alterazione dell'espressione degli chaperoni dell'ER, influenza la crescita in vivo delle cellule tumorali.

Le scoperte suggeriscono che, non solo l'UPR è spesso attivato nei tumori, ma che può essere necessario per la sopravvivenza e/o la crescita delle cellule cancerogene.

Negli ultimi 10 anni è diventato noto che l'UPR gioca un ruolo fondamentale nella corretta differenziazione e funzione di molti tipi di cellule immunitarie.

Eosinofili, macrofagi e cellule di Paneth sono altamente dipendenti dal braccio di IRE1 α /Xbp1 dell'UPR per la sopravvivenza e/o la loro funzione.

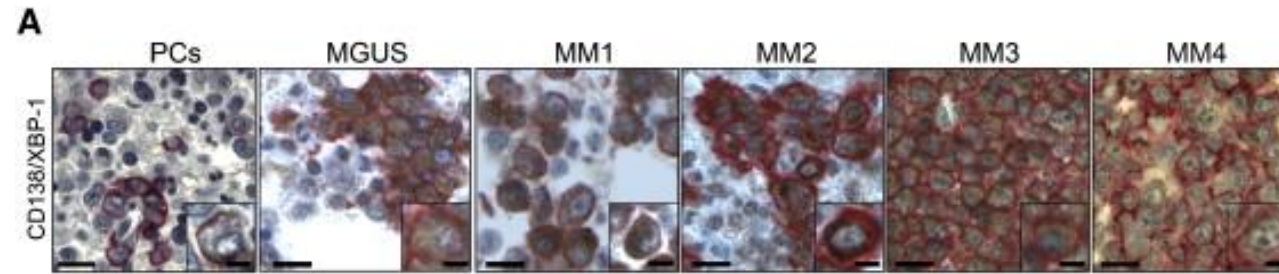


Il caso del mieloma multiplo

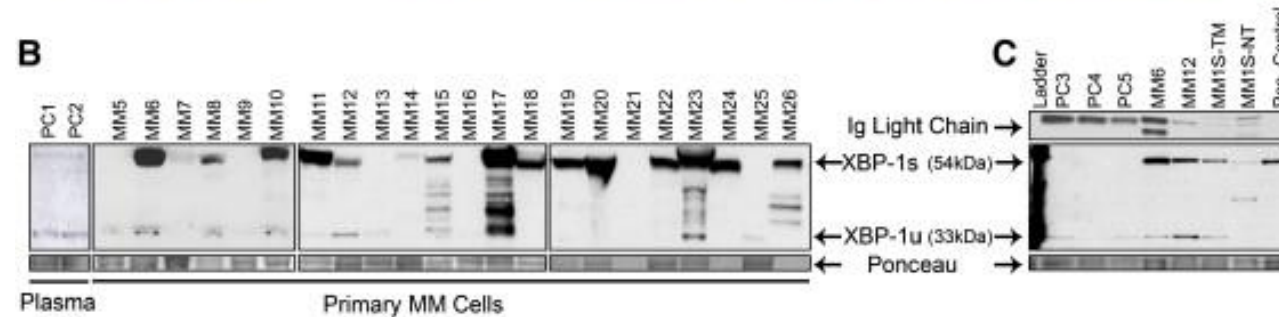
IRE1 α e il suo target omeostatico XBP1 sono entrambi richiesti per la differenziazione dei linfociti B nelle plasmacellule \rightarrow 50% di mielomi primari mostra alti livelli di XBP1.

ipotesi \rightarrow Forse l'attivazione costitutiva dell'IRE1a può favorire lo sviluppo del mieloma multiplo

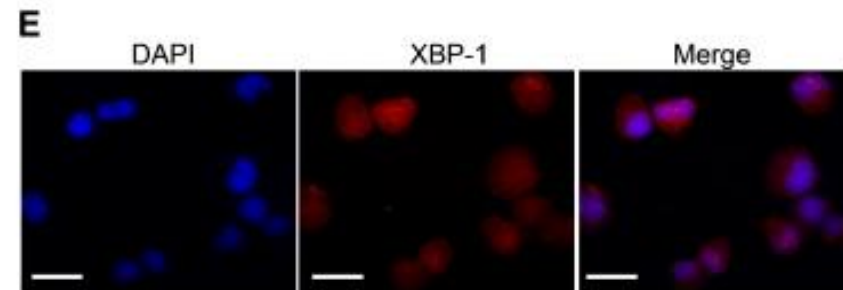
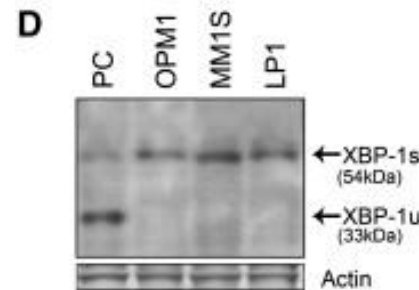
topi transgenici che sovra-esprimono XBP-1s sviluppano una patologia simile al MM



Immunohistochimica



Western blot



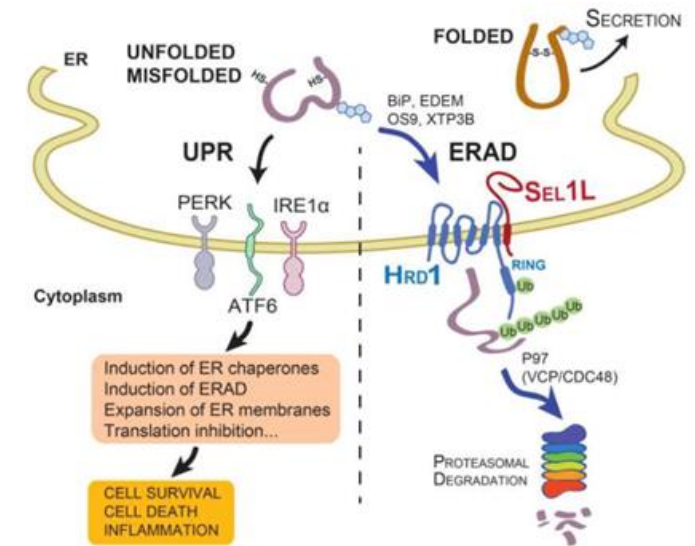
Immunofluorescenza

Donatori sani (PC) (n = 10)
 Pazienti MGUS (n = 20)
 Pazienti MM (n = 70)

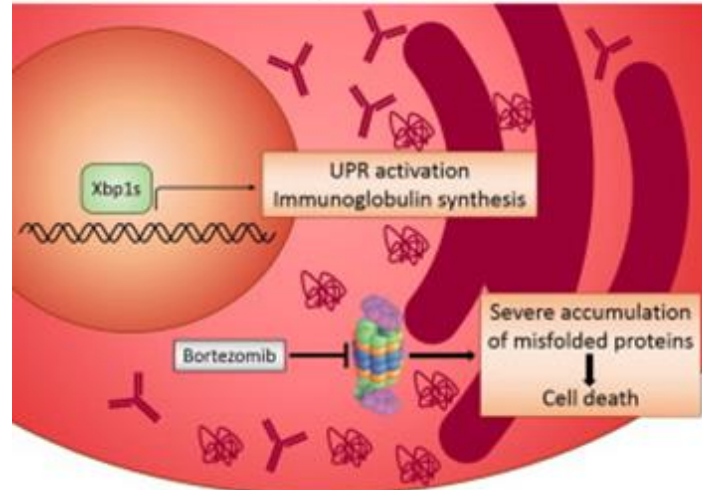
Quindi numerosi laboratori hanno sintetizzato diversi inibitori per bloccare l'UPR, potenzialmente utili per la terapia anticancro.

BORTEZOMIB → impedisce lo smaltimento delle proteine mal ripiegate tramite il percorso ERAD e innesca l'apoptosi dallo stress dell'ER.

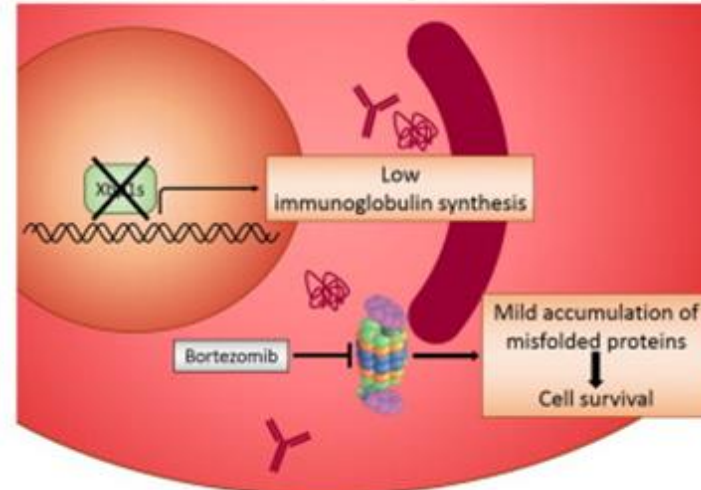
- 6 linee di mieloma testate.
- Xbp1-carenti resistenti al Bortezomib



Bortezomib sensitive Xbp1s-positive cell



Bortezomib resistant Xbp1s-negative cell

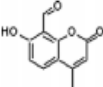
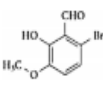
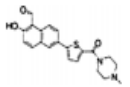
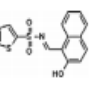
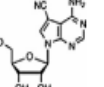
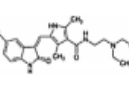
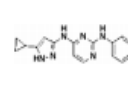
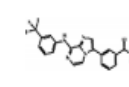
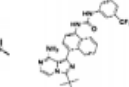


Quindi inizialmente gli inibitori dell'UPR sono stati testati nel mieloma multiplo, sperando di ottenere un effetto terapeutico maggiore rispetto al Bortezomib o un effetto sinergizzante. Ma è stato possibile osservare che se si riduce la sintesi di XBP1s le cellule diventano resistenti al Bortezomib.

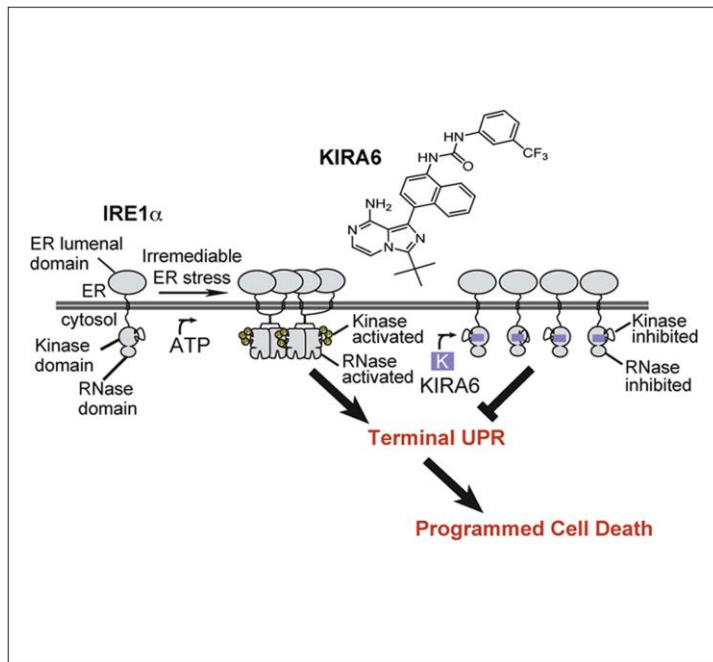
Questo risultato inatteso non ha ancora trovato una spiegazione, perché ulteriori studi sono necessari per chiarire le connessioni tra UPR e ERAD.

Modulare il segnale di IRE1a

Sono state identificate numerose piccole molecole che si legano e inibiscono l'RNAsi di **IRE1 α** e la maggior parte contengono un elettrofilo reattivo che lega covalentemente il sito attivo, con il farmacoforo di maggior successo che è una salicilaldeide.

Target	Catalytic core of the RNase domain					ATP binding pocket of the kinase domain				Kinase domain	
	Molecule	4 μ 8C	3-Methoxy-6-bromosalicyl-aldehyde	MKC-3946	STF083010	Toyocamycin	Type I	Type II			
Structure											
	IRE1 phosphorylation	Not effective	Not effective	Not effective	Not effective	Not effective	Not effective	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition
IRE1 oligomerization	Not effective	Not effective	Not effective	Not effective	Not effective	Not effective	Activation	Activation	Inhibition	Inhibition	Activation
XBP1 mRNA splicing	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Activation	Activation	Inhibition	Inhibition	Activation
RIDD	Inhibition	Inhibition	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibition	Inhibition
Survival	Not effective	ND	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition	ND	ND	ND	Activation	Activation
References	[23]	[22]	[21]	[24]	[25]	[29]	[28]	[24]	[31]	[31]	[30]

Bassa selettività

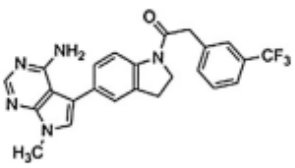
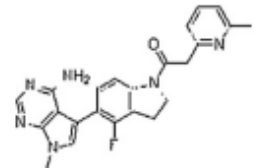
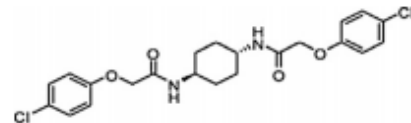
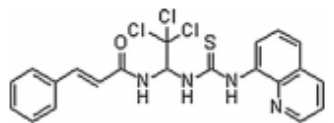
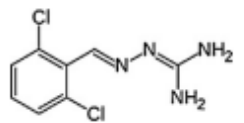


KIRA6 è capace di inibire in modo dose-dipendente l'attività chinasi di IRE1 α endogena e promuovere la sopravvivenza cellulare sotto stress ER.

- Intravitreale, KIRA6 **preserva la vitalità funzionale dei fotorecettori** in modelli di ratto di degenerazione retinica indotta da stress da ER.
- A livello sistemico, KIRA6 **preserva le cellule β pancreatiche, protegge da mutazioni nella pro-insulina** \rightarrow riduce l'iperglicemia nei topi diabetici Akita.

Modulare il segnale di PERK

Un team di GlaxoSmithKline (GSK) ha usato il design basato sulla struttura per sviluppare una serie di inibitori altamente potenti e selettivi del dominio chinasi di **PERK**.

Target	ATP binding pocket of the kinase domain		ND	GADD34/PP1	
Molecole	GSK2606414	GSK2656157	ISRIB	Salubrinal	Guanabenz
Structure					
PERK phosphorylation	Inhibition	Inhibition	Not effective	Not effective	Not effective
eIF2α phosphorylation	Inhibition	Inhibition	Not effective	Prolonged	Prolonged
ATF4 expression	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Activation	Activation
CHOP expression	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Activation	Activation
Survival	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition
References	[35]	[36]	[38]	[39]	[40]

↓
**Protegge nei modelli preclinici
 di neurodegenerazione**

Tuttavia, molto altro lavoro è necessario per quanto riguarda i potenziali benefici e rischi di inibire PERK in vivo, perché la maggior parte degli inibitori testati fin ora causa la perdita delle cellule-β pancreatiche e il diabete.

→ **sindrome di
 Wolcott-Rallison**

CONCLUSIONI

A seconda del modello tumorale l'UPR, come visto nell'articolo, è implicato nella regolazione della sopravvivenza cellulare, angiogenesi, infiammazione, invasione e delle metastasi.

Nel complesso, gli esempi riportati nell'articolo mostrano che l'UPR, come target terapeutico nel cancro è molto promettente, poiché ampiamente coinvolto.

Tuttavia, dal momento che alcuni meccanismi molecolari non sono ancora ben noti, come ad esempio il contributo di ATF6 nella morte cellulare sotto condizioni di stress dell'ER è difficile identificare uno specifico ruolo dell'UPR nel cancro in generale.

Infatti, l'UPR potrebbe essere determinante in una o più fasi dello sviluppo tumorale ed essere specifico per nell'ambito di diversi tumori; quindi sono necessari molti più studi preclinici prima di capire i benefici e i rischi di somministrare farmaci all'UPR in qualunque particolare tipo di tumore.

Ad esempio, le scoperte suggeriscono che la riduzione del segnale IRE1 α /XBP1 porta ad un blocco nella maturazione delle plasmacellule e nella resistenza agli inibitori del proteasoma e mette in discussione i potenziali benefici di usare gli inibitori nel caso di mieloma.

Recentemente è stato visto come lo stress dell'ER e l'UPR influenzano la presentazione dell'antigene sulla cellula e considerati i recenti sviluppi nell'immunoterapia per il cancro, agire sull'UPR per aumentare la presentazione dell'antigene tumorale potrebbe essere una strategia promettente da usare.

Fortunatamente, lo sviluppo di inibitori per le molecole chiave dell'UPR ha finalmente reso fattibili gli esperimenti, e in particolare, gli inibitori selettivi di IRE1 α e PERK ora disponibili rappresentano strumenti utili per poter comprendere il ruolo dell'UPR nel cancro e sviluppare eventuali terapie.

REFERENZE

Škrott, Zdeněk; Cvek, Boris

Critical Linking the activity of bortezomib in multiple myeloma and autoimmune diseases

Reviews in Oncology/Hematology

Volume 92, Issue 2, November 2014, Pages 61-70

Qi L, Tsai B, Arvan P.

New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation.

Trends in Cell Biology. 2017 Jun;27(6):430-440.

Junjappa RP, Patil P, Bhattarai KR, Kim H-R and Chae H-J (2018) IRE1 α Implications in

Endoplasmic Reticulum Stress- Mediated Development and Pathogenesis of Autoimmune

Diseases. Front. Immunol. 9:1289.

SOMMARIO

Nel reticolo endoplasmatico rugoso (RER) vengono sintetizzate le proteine di membrana e quelle destinate alle vescicole secretorie o ai lisosomi che penetrano nel lume del RER, passano al Golgi e da qui smistate.

Nel lume del RER sono presenti gli enzimi deputati alla formazione dei ponti disolfuro e la glicosilazione delle proteine che continuerà nel Golgi e avviene il ripiegamento delle proteine tramite specifiche chaperonine.

In condizioni fisiologiche il RER opera un vero e proprio controllo qualità sulle proteine prodotte attraverso il meccanismo di risposta alle proteine non correttamente ripiegate (UPR).

Ipotesi, scarsità di nutrienti, disfunzione del proteasoma, richieste sostenute nella secrezione o mutazioni somatiche nelle proteine dell'ospite, condizioni spesso incontrate nelle cellule cancerogene, possono portare all'accumulo delle proteine mal ripiegate nell'ER causando l'attivazione dell'UPR.

A seconda del modello tumorale, come visto nell'articolo, l'UPR è implicato nella regolazione della sopravvivenza cellulare, angiogenesi, infiammazione, invasione e delle metastasi.

Nel complesso, gli esempi riportati nell'articolo mostrano che l'UPR, come target terapeutico nel cancro è molto promettente, poiché ampiamente coinvolto. Tuttavia, dal momento che alcuni meccanismi molecolari non sono ancora ben noti, come ad esempio il contributo di ATF6 nella morte cellulare in condizioni di stress dell'ER, è difficile identificare uno specifico ruolo dell'UPR nel cancro in generale.

Infatti, l'UPR potrebbe essere determinante in una o più fasi dello sviluppo tumorale ed essere specifico nell'ambito di diversi tumori; quindi sono necessari molti più studi preclinici prima di capire i benefici e i rischi di somministrare farmaci all'UPR in qualunque particolare tipo di tumore.

Ad esempio, le scoperte suggeriscono che la riduzione del segnale IRE1 α /XBP1 porta ad un blocco nella maturazione delle plasmacellule e nella resistenza agli inibitori del proteasoma e mette in discussione i potenziali benefici di usare gli inibitori nel caso di mieloma.

Recentemente è stato visto come lo stress dell'ER e l'UPR influenzano la presentazione dell'antigene sulla cellula e considerati i recenti sviluppi nell'immunoterapia per il cancro, agire sull'UPR per aumentare la presentazione dell'antigene tumorale potrebbe essere una strategia promettente da usare. Fortunatamente, lo sviluppo di inibitori per le molecole chiave dell'UPR ha finalmente reso fattibili gli esperimenti, e in particolare, gli inibitori selettivi di IRE1 α e PERK ora disponibili rappresentano strumenti utili per poter comprendere il ruolo dell'UPR nel cancro e sviluppare eventuali terapie.