***DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO***

**Proposta di progetto per Dottorato**

**Titolo della ricerca:** Studiare il ruolo dei recettori del dominio discoidinico (DDRs)

nell’invasione tumorale: una prospettiva per nuove strategie terapeutiche

**Supervisore(i)/Docente guida** *(includere E-mail)***:** laura.rosano@cnr.it

**Tutor interno al collegio *(includere E-mail)*:** loretta.tuosto@uniroma1.it

**Struttura(e) ospitante(i):** IBPM-CNR

**DESCRIZIONE DELLA RICERCA**

**Obiettivi della ricerca (generale e specifici):** Lo scopo di questo progetto di ricerca è quello di studiare i meccanismi molecolari dell’interazione tra i discoidin domain receptor 1 e 2 (DDR1, DDR2), una famiglia di recettori del collagene non integrinici ad attività tirosin chinasica, e le proteine β-arrestine (β-arrs). Ci focalizzeremo sugli effetti funzionali di questa interazione per fornire una più profonda comprensione delle attività molecolari che sono alla base di processi come l’invasione e la metastatizzazione tumorale. A tal fine, utilizzando modelli tumorali 2D e 3D, gli obiettivi specifici saranno quelli di:

 Analizzare l’impatto delle β-arrestine come scaffolds molecolare nei segnali intracellulari dei DDRs, concentrandosi sulle vie di segnalazione legata al rimodellamento del citoscheletro di actina, ed alla transizione epitelio-mesenchima (EMT);

 Valutare il ruolo della segnalazione β-arrestina/DDRs nella formazione di strutture invasive, gli invadopodi, nel rimodellamento proteolitico della matrice extracellulare, e l'invasione cellulare;

 Validare l’effetto del blocco specifico di β-arrestina/DDRs nei processi invasivi.

**Stato delle conoscenze:**

Il collagene è il componente della matrice extracellulare (ECM) più abbondante nei tessuti tumorali, e il suo rimodellamento è considerato un driver e un marker di progressione tumorale (1). I recettori di adesione per il collagene fibrillare includono le integrine e i recettori a dominio discoidale (DDR), DDR1 e DDR2, che legano motivi distinti e separati del collagene fibrillare e sono dei recettori ad attività tirosina chinasici (RTK) a sei domini transmembrana (2). Essi sono attivata mediante fosforilazione specifica di residui di tirosina, ed in alcuni casi richiedono il coinvolgimento di c-Src e il reclutamento di proteine adattatrici (3, 4). In virtù dell’abbondanza di collageni fibrillari nell'ECM tumorale, l'attivazione dei DDRs è coinvolta in diversi processi tumorali dipendenti da cambiamenti dell’ECM, quali proliferazione, chemioresistenza, immunità antitumorale, EMT, secrezione di proteasi e

invasione (1,5). Inoltre, è stato dimostrato che i DDR si localizzano in protrusioni invasive specializzate ad attività proteolitica, chiamate invadopodi, sebbene con caratteristiche specifiche, ovvero in invadosomi lineari caratterizzati dall’assenza di marcatori di adesione focale e di integrine (5-10). Tuttavia, mentre il significato funzionale delle interazioni del

collagene con le integrine nei processi invasivi è ben definito, le interazioni molecolari e

l'impatto nella via di segnale DDR-collagene non sono completamente conosciuti e dipendono dal contesto tumorale, suggerendo la necessità di ulteriori studi per chiarire in

dettaglio il loro ruolo nella progressione tumorale. Del resto, da un punto di vista farmacologico, i DDRs sono un potenziale bersaglio per la terapia del cancro. Mentre alcuni farmaci approvati dalla FDA, come dasatinib, nilotinib e imatinib, sono possono anche inibire l'attivazione di DDRs, allo stesso tempo sono stati sviluppati diversi inibitori specifici di DDRs, suggerendo che il targeting di DDRs potrebbe rappresentare un interessante obiettivo terapeutico (11). Da un punto di vista molecolare, gli RTK possono essere considerati recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) in virtù della loro capacità di interazione non solo con le proteine G eterotrimeriche, ma anche con altre proteine intracellulari legate ai GPCRs, come le β-arrestine (12, 13). Infatti, le β-arrestine possono interagire e mediare la segnalazione di RTKs, come IGF-1R e VEGFR, così come il cross- talk tra RTKs e GPCRs attraverso l'interazione funzionale con c-Src (14-16). Nel contesto tumorale, è stato ampiamente dimostrato che le β-arrestine agiscono da piattaforma di segnale capace di assemblare e promuovere l’attivazione di proteine che, a livello nucleare, controllano l’attività di fattori di trascrizione chiave dell’invasione tumorale, quali - catenin/TCF4, p53 e HIF1(17-21), mentre a livello citoplasmatico regolano il rimodellamento del citoscheletro di actina, facilitando l'invasione cellulare, la formazione di invadopodi, la degradazione della matrice extracellulare e la diffusione metastatica (22-26). L'esistenza di un'interazione funzionale tra le β-arrestine e le proteine che regolano il segnale dei DDRs, quali c-Src, suggerisce un possibile coinvolgimento delle β-arrs nella segnalazione DDRs, capace quindi di amplificare il loro segnale nei processi invasivi.

**Bibliografia**

1. Cox, T.R. (2021). The matrix in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 21:217-238Leitinger, B. (2014). Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. 310: 39–87.

2. Fu, H.L., Valiathan, R.R., Arkwright, R., Sohail, A., Mihai, C., Kumarasiri, M. et al. (2013).

Discoidin Domain Receptors: Unique Receptor Tyrosine Kinases in Collagen-mediated

Signaling.. *J.Biol.Chem.* 15;288: 7430-7437.

3. Yang, K., Kim, J.H., Park, I.S., Kim, I.Y., Yang, B.S. (2005). Tyrosine 740

Phosphorylation of Discoidin Domain Receptor 2 by Src Stimulates Intramolecular Autophosphorylation and Shc Signaling Complex Formation. *Mechanism of signal transduction*. Vol. 280, p39058-39066.

4. Majo, S., Auguste, P. (2021). The Yin and Yang of Discoidin Domain Receptors (DDRs): Implications in Tumor Growth and Metastasis Development. *Cancers (Basel).* 13: 1725.

5. Mehta, V., Chander, H.,Munshi, A. (2021). Complex roles of discoidin domain receptor tyrosine kinases in cancer. *Clin. Transl. Oncol.*

6. Di Martino, J., Henriet, E., Ezzoukhry, Z., Goetz, J.G., Moreau, V., Saltel, F. (2016). The microenvironment controls invadosome plasticity. *J. Cell. Sci.* 129, 1759–1768.

7. Juin, A., Martino, J.D., Leitinger, B., Henriet, E., Gary, A.S. Paysan, L. et al. (2014).

Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42–Tuba pathway. *J. Cell Biol.* 207: 517–533.

8. Ezzoukhry, Z., Henriet, E., Piquet, L., Boyé, K., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C. (2016).

TGF-β1 promotes linear invadosome formation in hepatocellular carcinoma cells, through DDR1 up-regulation and collagen I cross-linking. *Eur. J. Cell. Biol*. 95: 503-512.

9. Grither, W.R. and Longmore, G.D. (2018). Inhibition of tumor–microenvironment interaction and tumor invasion by small-molecule allosteric inhibitor of DDR2 extracellular domain. *PNAS*. 115 E7786-E7794.

10. Hammoud, A.A., Marais, S., Allain, N., Ezzoukhry, Z., Moreau, V., Saltel, F. (2020).

DDR2 induces linear invadosome to promote angiogenesis in a fibrillar type I collagen context.

11. Rammal, H., Saby, C., Magnien, K., Van-Gulick, L., Garnotel, R., Buache, E. (2016).

Discoidin Domain Receptors: Potential Actors and Targets in Cancer. *Frontiers in*

*Pharmacology*. Vol. 7.

12. Peterson YK, Luttrell LM. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled

Receptor Signaling. Pharmacol Rev. 2017 Jul;69(3):256-297.

13. Crudden C, Shibano T, Song D, Suleymanova N, Girnita A, Girnita L. Blurring Boundaries: Receptor Tyrosine Kinases as functional G Protein-Coupled Receptors. Int Rev Cell Mol Biol. 2018;339:1-40.

14. Miller, W.E., Maudsley, S., Ahn, S., Khan, K.D., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (2000). β- arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of β- arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 275:

11312-9.

15. Rosanò L, Cianfrocca R, Masi S, Spinella F, Di Castro V, Biroccio A, Salvati E, Nicotra MR,Natali PG, Bagnato A. Beta-arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 2806-11, 2009.

16. Rosanò L, Cianfrocca R, Tocci P, Spinella F, Di Castro V, Spadaro F, Salvati E, Biroccio AM, Natali PG, Bagnato A. β-arrestin-1 is a nuclear transcriptional regulator of endothelin-1-induced β-catenin signaling. Oncogene 32:5066-77, 2012.

17. Rosanò L, Cianfrocca R, Tocci P, Spinella F, Di Castro V, Caprara V, Semprucci E, Ferrandina G, Natali PG, Bagnato A. Endothelin A receptor/β-arrestin signaling to the Wnt pathway renders ovarian cancer cells resistant to chemotherapy. Cancer Res

74:7453-7464, 2014.

18. Purayil HT, Zhang Y, Black JB, Gharaibeh R, Daaka Y. Nuclear βArrestin1 regulates androgen receptor function in castration resistant prostate cancer. Oncogene. 2021

Apr;40(14):2610-2620.

19. Tocci P, Cianfrocca R, Di Castro V, Rosanò L, Sacconi A, Donzelli S, Bonfiglio S, Bucci G, Vizza E, Ferrandina G, Scambia G, Tonon G, Blandino G, Bagnato A β- arrestin1/YAP/mutant p53 complexes orchestrate the endothelin A receptor signaling in high-grade serous ovarian cancer. Nat Commun. 2019 Jul 19;10(1):3196.

20. Shenoy SK, Han S, Zhao YL, Hara MR, Oliver T, Cao Y, Dewhirst MW. β-arrestin1 mediates metastatic growth of breast cancer cells by facilitating HIF-1-dependent VEGF expression. Oncogene. 2012 Jan 19;31(3):282-92.

21. Semprucci E, Tocci P, Cianfrocca R, Sestito R, Caprara V, Veglione M, Di Castro V, Spadaro F, Ferrandina G, Bagnato A, Rosanò L. Endothelin A receptor drives invadopodia function and cell motility through the β-arrestin/PDZ-RhoGEF pathway in ovarian carcinoma. Oncogene 35:3432- 342, 2016.

22. Rosanò L, Bagnato A. New insights into the regulation of the actin cytoskeleton dynamics by GPCR/β-arrestin in cancer invasion and metastasis. Int Rev Cell Mol Biol.

2019;346:129-155.

23. Paterson, E.K., Courtneidge, S.A. (2018). Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS J*. 285: 8-27

24. Di Modugno F, Caprara V, Chellini L, Tocci P, Spadaro F, Ferrandina G, Sacconi A, Blandino G, Nisticò P, Bagnato A, Rosanò L. hMENA is a key regulator in endothelin-

1/β-arrestin1-induced invadopodial function and metastatic process. Proc Natl Acad Sci

U S A. 115:3132-3137, 2018.

25. Chellini L, Caprara V, Spadaro F, Sestito R, Bagnato A, Rosanò L. Regulation of extracellular matrix degradation and metastatic spread by IQGAP1 through endothelin-

1 receptor signalling in ovarian cancer. Matrix Biol. 2018 Oct 25. pii: S0945-

053X(18)30303-2.

26. Masi I, Caprara V, Spadaro F, Chellini L, Sestito R, Zancla A, Rainer A, Bagnato A, Rosanò L. Endothelin-1 drives invadopodia and interaction with mesothelial cells through ILK. Cell Rep. 2021 Mar 2;34(9):108800

**Pubblicazioni degli ultimi 5 anni del supervisore**

1. Rosanò L, Cianfrocca R, Sestito R, Tocci P, Di Castro V, Bagnato A. Targeting endothelin-1 receptor/β-arrestin1 network for the treatment of ovarian cancer. Expert Opin Ther Targets. 21:925-932, 2017

2. Russignan A, Spina C, Tamassia N, Cassaro A, Rigo A, Bagnato A, Rosanò L, Bonalumi A, Gottardi M, Zanatta L, Giacomazzi A, Tinelli M, Salvadori U, Mosna F, Cassatella MA, Vinante F, Tecchio C. Endothelin-1 receptor blockade as new therapeutic approach in multiple myeloma. Br J Haematol. 178:781-793, 2017

3. Cianfrocca R, Rosanò L, Tocci P, Sestito R, Caprara V, Di Castro V, De Maria R, Bagnato A. Blocking endothelin-1-receptor/β-catenin circuit sensitizes to chemotherapy in colorectal cancer. Cell Death Diff. 24:1811-1820, 2017.

4. Di Modugno F, Caprara V, Chellini L, Tocci P, Spadaro F, Ferrandina G, Sacconi A, Blandino G, Nisticò P, Bagnato A, Rosanò L. hMENA is a key regulator in endothelin-

1/β-arrestin1-induced invadopodial function and metastatic process. Proc Natl Acad Sci

U S A. 115:3132-3137, 2018.

5. Russignan A, Spina C, Tamassia N, Cassaro A, Rigo A, Bagnato A, Rosanò L, Bonalumi A, Gottardi M, Zanatta L, Giacomazzi A, Scupoli MT, Tinelli M, Salvadori U, Mosna F, Zamò A, Cassatella MA, Vinante F, Tecchio C. In reply to Schäfer et al: new evidence on the role of endothelin-1 axis as a potential therapeutic target in multiple myeloma. Br J Haematol. 2019;184:1052-1055.

6. Chellini L, Caprara V, Spadaro F, Sestito R, Bagnato A, Rosanò L. Regulation of extracellular matrix degradation and metastatic spread by IQGAP1 through endothelin-

1 receptor signalling in ovarian cancer. Matrix Biol. 2018 Oct 25. pii: S0945-

053X(18)30303-2.

7. Bagnato A, Rosanò L. New Routes in GPCR/β-Arrestin-Driven Signaling in Cancer

Progression and Metastasis. Front Pharmacol. 2019 Feb 19;10:114.

8. Rosanò L, Cianfrocca R, Bagnato A. Methods to Investigate β-Arrestin-1/β-Catenin

Signaling in Ovarian Cancer Cells. Methods Mol Biol. 2019;1957:393-406.

9. Rosanò L, Bagnato A. New insights into the regulation of the actin cytoskeleton dynamics by GPCR/β-arrestin in cancer invasion and metastasis. Int Rev Cell Mol Biol.

2019;346:129-155.

10. Tocci P, Cianfrocca R, Di Castro V, Rosanò L, Sacconi A, Donzelli S, Bonfiglio S, Bucci G, Vizza E, Ferrandina G, Scambia G, Tonon G, Blandino G, Bagnato A β- arrestin1/YAP/mutant p53 complexes orchestrate the endothelin A receptor signaling in high-grade serous ovarian cancer. Nat Commun. 2019 Jul 19;10(1):3196.

11. Tocci P, Rosanò L, Bagnato A. Targeting Endothelin-1 Receptor/β-Arrestin-1 Axis in Ovarian Cancer: From Basic Research to a Therapeutic Approach. Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Sep 4;10:609.

12. Tocci P, Cianfrocca R, Sestito R, Rosanò L, Di Castro V, Blandino G, Bagnato A.

Endothelin-1 axis fosters YAP-induced chemotherapy escape in ovarian cancer. Cancer

Lett. 2020 Nov 1;492:84- 95.

13. Masi I, Caprara V, Bagnato A, Rosanò L. Tumor Cellular and Microenvironmental Cues

Controlling Invadopodia Formation. Front Cell Dev Biol. 2020 Oct 15;8:584181.

14. Sestito R, Cianfrocca R, Tocci P, Rosanò L, Sacconi A, Blandino G, Bagnato A.

Targeting endothelin 1 receptor-miR-200b/c-ZEB1 circuitry blunts metastatic progression in ovarian cancer. Commun Biol. 2020 Nov 13;3(1):677.

15. Masi I, Caprara V, Spadaro F, Chellini L, Sestito R, Zancla A, Rainer A, Bagnato A, Rosanò L. Endothelin-1 drives invadopodia and interaction with mesothelial cells through ILK. Cell Rep. 2021 Mar 2;34(9):108800.

16. Del Rio D, Masi I, Caprara V, Spadaro F, Ottavi F, Strippoli R, Sandoval P, López- Cabrera M, Sainz de la Cuesta R, Bagnato A, Rosanò L. Ovarian Cancer-Driven

Mesothelial-to-Mesenchymal Transition is Triggered by the Endothelin-1/β-arr1 Axis. Front Cell Dev Biol. 2021 Dec 1;9:764375.