

Le RIP (proteine inattivanti i ribosomi): struttura e potenziali applicazioni biotecnologiche

Nota del socio Alberto Di Donato¹ e di Antimo Di Maro²
(Adunanza del 20 dicembre 2019)

Keywords: immunotoxins, ribosome inactivating proteins, ricin.

Abstract - Ribosome inactivating proteins (RIP), found in many plants, are able to alter 28S rRNA, by depurinating a single adenine (N- β -glycosidase activity) and making ribosomes unable to operate protein synthesis. They include type 1 RIP, consisting of a single chain, and type 2, consisting of an A chain with N-glycosidase activity bound to a lectin B chain able to bind glycidic chains with galactosyl residues. B chain binds receptors on cell surface, allowing A chain to enter cytoplasm and exert its enzymatic activity. For this reason, many type 2 RIP are powerful toxins (e.g.: ricin), whereas type 1 RIP are less toxic because of their difficulty to enter the cell. Due to their properties, RIPs can be used for different biotechnological applications such as: i) possible antiviral agents in both plants and animals; ii) conjugated to carrier molecules in biomedical applications.

Riassunto – Le proteine inattivanti i ribosomi (ribosome inactivating proteins, RIP), isolate da numerose piante, alterano l'rRNA 28S, depurinando una specifica adenina (attività N- β -glicosidasica), rendendo i ribosomi incapaci di operare la sintesi proteica. Le RIP possono essere di tipo 1, costituite da una sola catena, o di tipo 2, costituite da una catena A con attività N- β -glicosidasica unita ad una catena B lectinica capace di legare catene glucidiche con residui di galattosio. La catena B si lega a recettori sulla superficie cellulare, permettendo l'entrata nel citoplasma della catena A, dove esercita la sua attività enzimatica. Per questo motivo, molte RIP di tipo 2 sono potenti tossine (es., la ricina); mentre le RIP di tipo 1 penetrano con difficoltà nelle cellule e di conseguenza sono relativamente poco tossiche. Per le loro proprietà, le RIP possono essere utilizzate per possibili

¹ Dipartimento di Biologia, Università Federico II di Napoli, Complesso Universitario di Monte S. Angelo, via Cinthia, 80126 Napoli e Accademia di Scienze Fisiche e Matematiche della Società Nazionale di Scienze, Lettere e Arti in Napoli, via Mezzocannone 8, 80134 Napoli.

² Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali Biologiche e Farmaceutiche, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Via Vivaldi 43, 81100 Caserta.

applicazioni biotecnologiche come: i) possibili agenti antivirali sia in piante che animali; ii) coniugati a molecole vettrici in applicazioni biomediche.

1 - INTRODUZIONE

Le tossine di origine vegetale sono molecole prodotte e secrete dalle piante superiori per difendersi dai predatori. Esse includono molecole che hanno un effetto tossico sugli organismi bersaglio, siano essi microbi, insetti, animali o piante parassite. Le tossine vegetali possono essere sia piccole molecole organiche (metaboliti secondari) che macromolecole complesse, come proteine/enzimi che riconoscono peculiari bersagli in grado di arrestare la crescita dei parassiti o provocarne la morte. Tra queste, le RIP '*ribosome inactivating proteins*' sono le tossine più studiate date le loro peculiarità strutturali ed enzimatiche alla base di interessanti applicazioni, sia nel settore farmaceutico che in campo agricolo. Lo studio delle RIP prosegue da decenni, poiché è importante comprenderne il ruolo biologico nelle piante e i meccanismi struttura/funzione alla base della loro citotossicità. D'altro canto la loro tossicità è nota da oltre un secolo, quando fu isolata la prima RIP dai semi di ricino, una proteina tossica, poi chiamata ricina.

2 - ATTIVITA' ENZIMATICA, STRUTTURA E DISTRIBUZIONE

Le proteine inattivanti i ribosomi conosciute con l'acronimo di RIP, appartengono a una classe di enzimi (EC 3.2.2.22) ampiamente distribuita in piante, funghi (Girbes et al. 2004) e ritrovata fino ad ora in un'unica alga (Liu et al. 2002). Le RIP presentano un'attività rRNA N- β -glicosidasi, che porta alla scissione di un singolo residuo di adenina in un sito conservato dell'rRNA 28S denominato Loop α -Sarcina Ricina (SRL) (Endo e Tsurugi 1987). In particolare, l'adenina scissa nell'rRNA 28S di ratto è la numero 4324 (Fig. 1).

La scissione del singolo legame N- β -glicosidico è irreversibile e l'assenza della singola adenina, impedisce l'associazione dei fattori di allungamento con il ribosoma (EF-G e EF-2 in procarioti ed eucarioti, rispettivamente) portando al blocco della sintesi proteica, provocando la morte cellulare per apoptosi (Montanaro et al. 1975). Oltre agli effetti citotossici alcune RIP hanno effetti biologici specifici su differenti linee cellulari e/o su organismi *in toto*. Tuttavia, queste attività aggiuntive possono in alcuni casi non dipendere direttamente dall'attività N- β -glicosidasi. Inoltre, in letteratura è riportato che alcune RIP sono attive su substrati differenti dall'rRNA (Barbieri et al. 1994). In alcuni casi si è riscontrata la capacità di alcune RIP di agire su DNA, lipidi, chitina e ione superossido, esibendo quindi attività DNasica, fosfatasica, chitinasica e superossido dismutasica (Stirpe 2013).

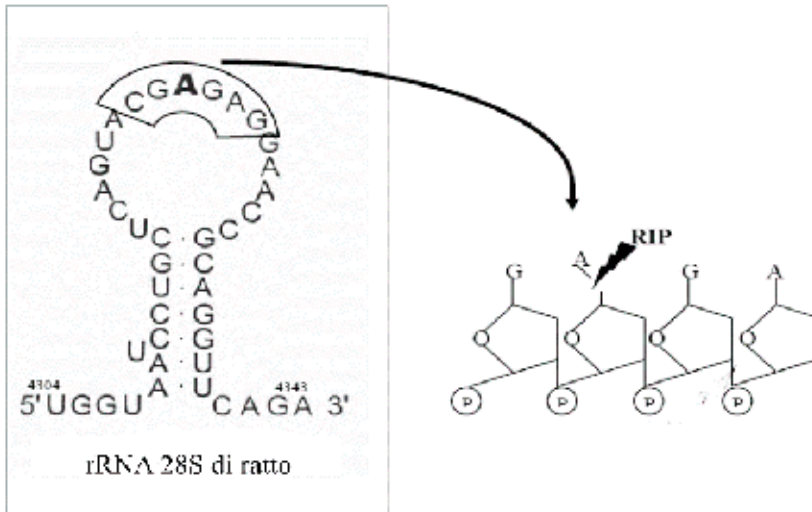


Fig. 1 – Struttura secondaria dell’rRNA 28S di ratto nel quale il residuo di adenina (evidenziato in grassetto) viene eliminato dall’azione delle RIP.

La maggior parte delle RIP può essere classificata in due gruppi, che si distinguono in base all’assenza (RIP di tipo 1) o alla presenza (RIP di tipo 2) di una catena lectinica (la catena B) legata ad una catena “tossica” (catena A) tramite interazioni idrofobiche e un ponte disolfurico intracatena (Fig. 2) (Barbieri et al. 1993). La catena enzimatica A promuove il rilascio del residuo di adenina e quindi possiede l’attività rRNA N-β-glicosidasi tossica. La catena lectinica B, dove presente, si lega in modo specifico a recettori galattosil terminali presenti sulla superficie cellulare dei mammiferi, promuovendo l’ingresso della catena A nelle cellule (IC₅₀³ sulla linea cellulare Hela 0,0003-1,7 nM) (Stirpe e Gilibert-Oriol 2017). L’assenza della catena lectinica B limita in modo significativo l’accesso delle RIP di tipo 1 nelle cellule, determinando una loro minore citotossicità (IC₅₀ sulla linea cellulare Hela 170-3300 nM) (Stirpe e Gilibert-Oriol 2017). Oltre ai due principali gruppi, alcune RIP come la b-32 isolata dal mais presentano una struttura risultante dall’unione di due polipeptidi (di circa 15 e 9 kDa) dotati di attività N-β-glicosidasi. Queste RIP costituiscono secondo alcuni autori il gruppo delle RIP di tipo 3, mentre per altri rappresentano soltanto un singolare sottogruppo di RIP di tipo 1 (Hey et al. 1995; Chaudhry et al. 1994).

Le RIP di tipo 1 sono proteine a catena singola di circa 30 kDa con un punto isoelettrico basico e un IC₅₀ *in vitro* minore di 0,01 - 4,0 nM (Stirpe e Gilibert-Oriol 2017). Tra le più note vi sono la PAP (da *Phytolacca americana* L.), la

³ Concentrazione di inibitore (farmaco, enzima, tossina o veleno) necessaria ad inibire il 50% del bersaglio in esame (enzima, cellula, recettore o microrganismo).

tricosantina (da *Trichosanthes kirilowii* L.), la gelonina (da *Gelonium multiflorum* L.), le PD-S/PD-Ls (da *Phytolacca dioica* L.), e le saporine (da *Saponaria officinalis* L.).

La maggior parte delle RIP di tipo 2 provenienti da piante superiori ha una struttura dimerica (circa 60 kDa), un punto isoelettrico compreso tra 6 e 8 e valori di IC_{50} *in vitro* compresi tra 43 e 88 nM (Stirpe e Gilabert-Oriol 2017). Tra le più note vi sono la ricina (da *Ricinus communis* L.), l'abrina (da *Abrus precatorius* L.) e l'ebulina (da *Sambucus ebulus* L.).

Alcune RIP di tipo 2 sono costituite da una singola catena A con attività N- β -glicosidasi che interagisce con più catene B capaci di legare differenti recettori glicosil terminali sulla superficie cellulare. Esempi di tali proteine, dotate di struttura quaternaria complessa includono, RIP tetrameriche e ottameriche isolate dal genere *Sambucus* (Girbes et al. 1993).

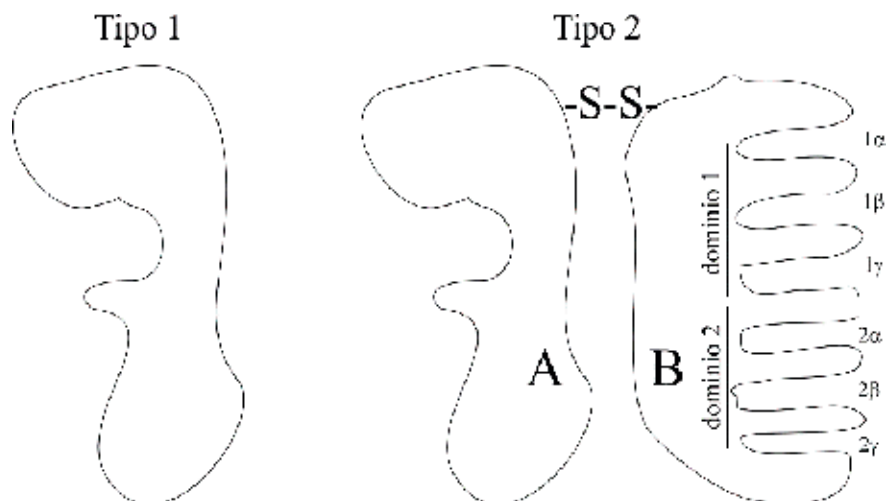


Fig. 2 – Rappresentazione delle RIP di tipo 1 e di tipo 2 (con catena enzimatica A e lectinica B). Per la catena B lectinica è messa in evidenza l'organizzazione in domini e motivi alla base del riconoscimento degli zuccheri.

Le strutture tridimensionali delle RIP di tipo 1 sono accumulate da uno stesso ripiegamento, noto come 'RIP fold'. In particolare, il 'RIP fold' è costituito da un dominio N-terminale risultante dall'unione di α -eliche e β -foglietti e un dominio C terminale dove sono presenti prevalentemente α -eliche (Monzingo et al. 1993). Un residuo di glutammato, di arginina e di triptofano sono strutturalmente conservati nel sito catalitico e la specificità enzimatica delle diverse RIP è determinata da piccole variazioni conformazionali della struttura delle singole catene polipeptidiche, in particolare in regioni circostanti il sito catalitico, che influenzano il legame enzima-substrato (Di Maro et al. 2014). Ciò è confermato da studi

strutturali effettuati utilizzando analoghi dei substrati. Tali studi indicano che la specificità enzimatica di ogni singola RIP dipende dalla stabilità degli stati di transizione durante il processo di legame substrato-enzima e durante la catalisi (Ghosh e Batra 2006; Guo et al. 2003). Questi studi indicano che differenti valori di pH ottimali per l'attività enzimatica e diverse modalità di legame degli analoghi dei substrati originano da differenze strutturali che riguardano il sito attivo (Gu e Xia 2000; Watanabe et al. 1994).

Per quanto riguarda le caratteristiche strutturali delle RIP di tipo 2, la catena A è strutturalmente simile alla struttura delle RIP di tipo 1, mentre la catena B è una proteina globulare con due domini (domino 1 e 2) omologhi presenti all'N- e al C terminale, ciascuno costruito da tre motivi omologhi, chiamati α , β e γ , che probabilmente derivano da eventi di duplicazione genica da un motivo ancestrale di riconoscimento dei carboidrati (Rutenber et al. 1987). Ciascun dominio è costituito da circa 40 residui amminoacidici. Sebbene i sottodomini α , β e γ abbiano la stessa conformazione di base, solo i motivi 1α e 2γ , alle estremità della catena B, hanno la capacità di legare monosaccaridi facenti parte di catene glicidiche complesse legate a proteine di membrana (Fig. 3). La catena B, che non influenza in alcun modo l'attività N- β -glicosidasi delle RIP di tipo 2, riveste un ruolo rilevante nella capacità di rendere le RIP di tipo II altamente tossiche nei confronti di determinate linee cellulari dato che i motivi 1α e 2γ possono riconoscere recettori contenuti nelle strutture glicidiche contenenti galattosio, mannosio o acido sialico con differente capacità di legame. Inoltre, sostituzioni amminoacidiche nei motivi 1α e 2γ , che ne compromettono la struttura, rendono alcune RIP di tipo 2 poco tossiche perdendo la capacità di interagire con le catene glicidiche complesse (Iglesias et al. 2018).

Il maggior numero di RIP è stato isolato dalle Angiosperme, in particolare in alcune famiglie (Caryophyllaceae, Sambucaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Phytolaccaceae e Poaceae) mentre non sono state isolate RIP dalle Gimnosperme (Di Maro et al. 2014). Molti di questi enzimi sono generalmente espressi in differenti tessuti della pianta (ad esempio le saporine sono presenti in foglie, semi e radici di *Saponaria officinalis* L.) (Ferrerias et al. 1993) sebbene siano noti esempi di piante che ne mostrano la presenza solo in tessuti specifici (ad es. la ricina nei semi di *Ricinus communis* L.). La loro espressione è strettamente correlata all'omeostasi, essendo la risposta a condizioni di stress abiotico e biotico come calore, stress osmotico, freddo, salinità, o in seguito all'attacco di virus, microrganismi, insetti e funghi patogeni (Stirpe et al. 1996).

La maggior parte delle RIP è risultata citotossica nei confronti di differenti linee cellulari tumorali *in vitro* ed *in vivo* (Gilabert-Oriol et al. 2014). Da quanto riportato in letteratura, sembra che la citotossicità sia dovuta alla loro attività enzimatica di danneggiare i ribosomi nel citoplasma, ma è anche fortemente correlata al percorso di internalizzazione cellulare. Infatti, la loro entrata nel citoplasma promuove l'inattivazione dei ribosomi con conseguente morte cellulare per

apoptosi (Lord e Spooner 2011). Ciò è confermato dall'esistenza di RIP di tipo 2 non tossiche, identificate in alcune piante (ad es. *Sambucus*), che pur possedendo attività rRNA N- β -glicosidasi, non sono tossiche perché sono degradate a seguito di un'internalizzazione con percorsi intracellulari non ancora del tutto chiari, differenti dalle RIP di tipo 2 tossiche (Girbes et al. 1993; Tejero et al. 2015).

Tuttavia, la possibilità di dirigere selettivamente le RIP verso specifici bersagli cellulari da eliminare, come indicato dai diversi percorsi di internalizzazione, mette in risalto le grosse potenzialità di questi enzimi per possibili applicazioni in campo biomedico, come dimostrato da numerosi studi preclinici e clinici (Gilbert-Oriol et al. 2014). Sulla base di tali osservazioni e tenendo conto delle tecniche biotecnologiche ad oggi disponibili, che permettono di scegliere selettivamente le popolazioni cellulari da eliminare con specifici vettori, le RIP sono sempre più utilizzate (Polito et al. 2016). In parallelo, l'ingegneria proteica sta migliorando nel contempo il meccanismo di ingresso cellulare di questi preparati tossici, la loro specificità, così come la loro emivita nel plasma e la loro resistenza alle proteasi nei liquidi extracellulari o nel citoplasma, riducendone la loro antigenicità.

3 - POTENZIALITÀ APPLICATIVE DELLE RIP

La citotossicità delle RIP è stata studiata *in vivo* e *in vitro* su un ampio numero di linee cellulari cancerose e non, mostrando che ogni RIP è in grado di danneggiare (azione citostatica) o uccidere (azione citotossica) differenti linee cellulari. Queste azioni richiedono l'entrata delle RIP di tipo 1 o della catena A delle RIP di tipo 2 nel citoplasma delle cellule bersaglio per esplicare l'attività rRNA N- β -glicosidasi sui ribosomi. Il passaggio dall'esterno all'interno della cellula è uno dei punti nevralgici alla base della differente citotossicità delle RIP di tipo 1 e di tipo 2, ed è strettamente correlata con il percorso intracellulare, una volta attraversata la membrana plasmatica. Tale percorso può variare sia in base alle caratteristiche strutturali delle RIP, sia in base all'ultrastruttura delle cellule in esame, e dipende: i) dai ligandi sulla superficie cellulare; ii) dall'indirizzamento dei complessi RIP-recettore nella cellula bersaglio; e iii) dal numero di catene integre (RIP di tipo 1 o catena A delle RIP di tipo 2) capaci di esplicare la loro azione enzimatica nel citoplasma (de Virgilio et al. 2010).

In generale, i macrofagi e i trofoblasti sono risultati le cellule con maggiore sensibilità alle RIP, probabilmente a causa della loro capacità di interagire con un vasto numero di molecole esterne, data la presenza di un elevato e diversificato numero di recettori o strutture recettoriali sulla loro superficie (Barbieri et al. 1993). In genere, le RIP entrano nella cellula legandosi prima a recettori o strutture della superficie cellulare, dopodiché attraversano la membrana plasmatica

mediante endocitosi ed infine, vengono traslocate nel citoplasma, fluendo attraverso un determinato compartimento intracellulare (che di preferenza è il Golgi) (de Virgilio et al. 2010). Le RIP di tipo 2 (ad es. la ricina) interagiscono con la membrana plasmatica, dopo essersi legate a strutture contenenti galattosio, riconosciute dalla catena lectinica B, attraversano la membrana plasmatica per endocitosi e arrivano alle vescicole dell'apparato del Golgi. Il contenuto delle vescicole viene quindi rilasciato e trasportato mediante un successivo trasporto vescicolare retrogrado fino al reticolo endoplasmatico (RE). Una volta nel lume del RE, le catene A e B delle RIP di tipo 2 subiscono un processo di dissociazione, ed infine, una minima quantità di catena A trasloca nel citoplasma dove, esplicando la sua attività rRNA N- β -glicosidasica, danneggia i ribosomi (Sowa-Rogozinska et al. 2019).

Al contrario, data la loro struttura monomerica, le RIP di tipo 1 mancano della catena lectinica B, mostrando una maggiore difficoltà ad entrare nelle cellule (motivo per cui sono meno tossiche). Tuttavia, la maggior parte degli studiosi concorda sul fatto che le RIP di tipo 1 necessitano di specifici meccanismi di accesso, ancora poco noti o sconosciuti. Una volta internalizzate, le RIP di tipo 1 vengono rilasciate nel citoplasma attraverso un percorso diverso da quello utilizzato dalla catena A della ricina, indipendente dalla via del Golgi, che ne limita la tossicità, portando ad un inefficiente rilascio nel citoplasma (Polito et al. 2013).

4 - UTILIZZO DELLE RIP IN CAMPO BIOMEDICO (IMMUNOTOSSINE E CONIUGATI)

Un approccio ipotizzato da Paul Ehrlich all'inizio del 1900 per lo sviluppo di farmaci mirati ('magic bullet' in inglese) volto a migliorare l'efficacia terapeutica di nuovi farmaci, utili a bloccare o eliminare cellule dannose dell'organismo (ad esempio le cellule cancerose), è la combinazione di molecole capaci di riconoscere uno specifico bersaglio cellulare con un'altra/altra capace/i di attività citotossica nei confronti delle cellule che presentano tale bersaglio (Strebhardt e Ullrich 2008). Un esempio è rappresentato dalle immunotossine, macromolecole chimeriche ottenute combinando un anticorpo (vettore) con una tossina. Queste macromolecole chimeriche si basano sulla capacità della tossina legata all'anticorpo di entrare nelle cellule bersaglio e di esplicare, dopo internalizzazione, l'azione citotossica sulle cellule bersaglio. La specificità del bersaglio è data dall'affinità dell'anticorpo selezionato nei confronti di uno specifico bersaglio (recettore, proteina di membrana o specifici polisaccaridi o lipidi complessi). Queste molecole bifunzionali hanno una potente azione citotossica *in vitro*, ma il loro uso *in vivo* è spesso limitato o presenta problemi, data la capacità di indurre la risposta immunitaria, tossica per il fegato, così come la capacità di danneggiare i vasi sanguigni e bassa attività sui tumori solidi dati i problemi di diffusione nei tessuti.

Negli ultimi anni, i progressi dell'ingegneria proteica, per la produzione di anticorpi ricombinanti e delle tecniche biochimiche, per ottenere proteine di fusione, hanno portato ad un rapido aumento di biomolecole capaci di riconoscere specifici bersagli, avendo maggior affinità per il bersaglio e di cui è più facile studiare la farmacocinetica. In particolare, si sono ottenuti progressi nel diminuire sia la grandezza delle molecole chimeriche, sia la loro antigenicità. Oggi le immunotossine sono considerate potenti 'immunofarmaci' specifici contro cellule cancerose e utili per il trattamento di malattie virali o parassitarie.

Tale processo di evoluzione molecolare *in vitro*, ha portato le RIP di tipo 1 e le catene A delle RIP di tipo 2, ad essere attori di primo piano per un ampio spettro di applicazioni. Infatti, tra le prime immunotossine prodotte, ci sono molecole chimeriche basate sulle RIP generate accoppiando le RIP di tipo 1 o la catena A delle RIP di tipo 2, con un anticorpo nativo (inizialmente da topo) attraverso leganti covalenti, generalmente ponti disolfurici, tra le due molecole (Fig. 3) (Vitetta et al. 1982).

Inoltre, le iniziali immunotossine basate sulle RIP, prevedevano l'utilizzo di tossine deglicosilate, al fine di ridurre legami non specifici o reazioni aspecifiche o per diminuirne l'antigenicità che comprometterebbe l'azione di questi immunconiugati. In particolare, tra le prime immunotossine ottenute vi è quella basata sulla catena A della ricina deglicosilata legata ad un anticorpo monoclonale anti-CD22 murino (un recettore presente sulle cellule tumorali della maggior parte dei pazienti con leucemia linfoblastica acuta) (Ghetie et al. 1988). Successivamente, avendo a disposizione un numero sempre maggiore di RIP di tipo 1, che evitano procedure di separazione della catena A dalla catena lectinica B, sono state prodotte nuove immunotossine. Inoltre, la loro purificazione da piante differenti (la saporina da *S. officinalis*, la PAP da *P. americana* e la tricosantina da *T. kirilowii*), permetteva in linea di principio di poter avviare cicli di cure in cui gli immunconiugati erano realizzati con RIP di tipo 1 differenti e quindi in grado di sfuggire alla risposta anticorpale del paziente (Stirpe 2013).

Nonostante i risultati incoraggianti ottenuti, questi primi approcci sperimentali misero in evidenza svariati problemi per queste prime immunotossine, definite di prima generazione (Fig. 3). Tra i principali problemi riscontrati c'erano: i) scarsa stabilità dovuta al legame tra anticorpo e tossina; ii) composizione eterogenea e ridotta affinità di legame, causata da una non specifica coniugazione chimica; iii) scarsa penetrazione nella massa tumorale solida per le grosse dimensioni delle macromolecole (circa 100 kDa); iv) immunogenicità; e v) difficoltà di produzione su larga scala.

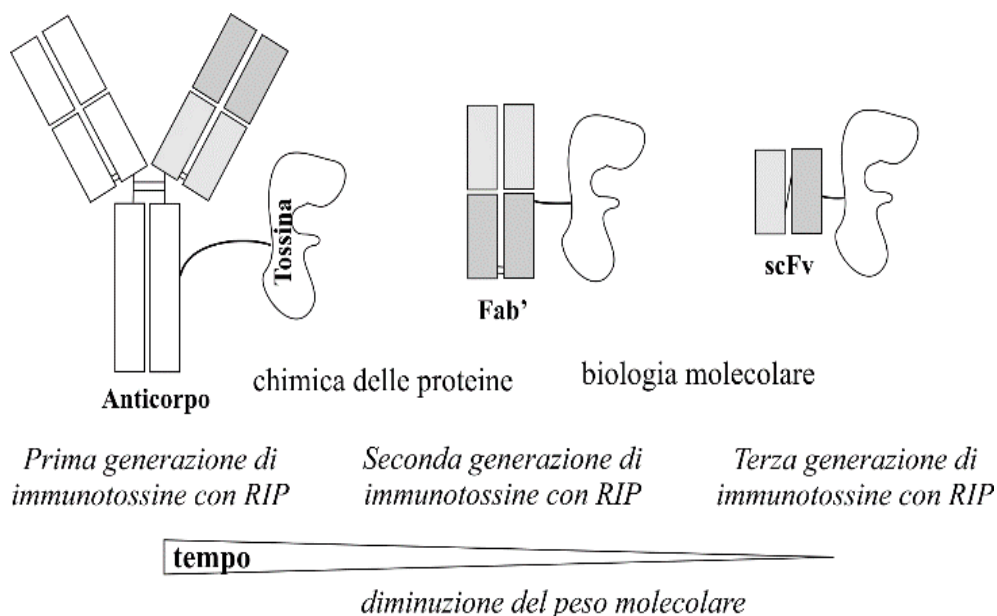


Fig. 3 – Evoluzione schematica delle immunotossine basate sulle RIP.

Per migliorare la farmacocinetica e ridurre gli effetti collaterali di queste immunotossine, sono stati fatti grandi sforzi per produrre una nuova generazione di immunotossine basate sulle RIP, mediante l'utilizzo di tecniche del DNA ricombinante e ottimizzazione dei sistemi di espressione che utilizzano lievito, batteri, cellule di ovaio di criceto o cellule di insetto. Lo sviluppo di queste nuove immunotossine basate sulle RIP comporta due passaggi critici: i) progettazione e costruzione di frammenti di anticorpi come i frammenti Fab' (seconda generazione di immunotossine) e poi i mini anticorpi (svFc; terza generazione) ottenuti con metodi ricombinanti, con peso molecole ridotto; ii) sviluppo di metodologie per la produrre anticorpi umanizzati; e iii) miglioramento dell'espressione e delle metodologie di purificazione di questi costrutti chimerici in sistemi eterologhi di espressione. In tale contesto, le RIP si sono rivelate uno strumento adatto a validare le ipotesi alla base di queste nuove idee e per mettere a punto gli iniziali protocolli per lo sviluppo di nuove generazioni di immunotossine (Antignani e Fitzgerald 2013).

Come esempio, ricordiamo lo sviluppo di immunoconiugati costruiti utilizzando la saporina S6, RIP di tipo 1, utilizzata in molecole chimeriche differenti, in cui veniva cambiato l'anticorpo selettivo (anticorpo o parte di esso) rendendola capace di divenire tossica per differenti tipi di cellule maligne o tumori solidi. La scelta della saporina S6, è dovuta alle sue intrinseche caratteristiche strutturali e funzionali, come un'alta resistenza alla denaturazione e alla proteolisi, nonché

alla sua forte efficacia catalitica accoppiata a una citotossicità meno accentuata su cellule non cancerose. Nel 1985, la saporina S6, fu coniugata per la prima volta all'anticorpo monoclonale murino anti-Thy 1.1 e al suo frammento Fab' (Thorpe et al. 1985). Da allora, la saporina S6 è stata ampiamente utilizzata come parte tossica in una varietà di immunoconiugati che colpiscono le molecole della superficie cellulare (marcatori CD, o marcatori dei gruppi di differenziazione) di diverse cellule ematiche maligne e tumori solidi. La maggior parte dei marcatori CD riconosciuti da immunotossine saporina S6/anticorpo sono recettori o molecole di adesione cellulare o specifici ligandi. Successivamente, al fine di eliminare la risposta anticorpale umana nei confronti degli anticorpi murini (mAB), sono stati sviluppati nel tempo nuovi immunoconiugati chimerici, sostituendo domini costanti degli anticorpi murini con domini costanti umanizzati. Negli ultimi anni, infine, sono stati utilizzati parti variabili di anticorpi ricombinanti, in cui solo la parte ipervariabile era murina (anticorpi umanizzati) diminuendo ancora di più la grandezza molecolare e l'antigenicità di tali immunotossine.

Per evitare l'eterogeneità, migliorare la penetrazione nel tumore e aumentare la complessità della produzione, le tecniche del DNA ricombinante sono state applicate per produrre l'ultima generazione di immunotossine formate dalla saporina S6 e frammenti variabili a catena singola (noti come mini anticorpi) (Fig. 3). In questi costrutti il dominio di legame cellulare della tossina viene sostituito con la porzione Fv dell'anticorpo in cui si trovano i suoi frammenti variabili a catena leggera e pesante collegati con peptidi. I costrutti sono realizzati mediante sintesi proteica utilizzando un'unica molecola di RNA messaggero (Gilibert-Oriol et al. 2014).

Diverse RIP e la saporina S6 sopra descritta, sono state usate per costruire immunotossine contro diversi bersagli in molti studi preclinici, portando a risultati promettenti nella maggior parte dei casi. La grande efficacia di questo approccio è stata riportata in particolare nella cura di diversi modelli tumorali ematologici. Negli esperimenti condotti su topi, i trattamenti con le immunotossine basate sulle RIP, sono stati in grado di ridurre fortemente la dimensione dei tumori trapiantati in tutti i casi e in diversi modelli sperimentali si è arrivati alla totale eliminazione delle masse tumorali.

Oltre ad essere utilizzati per la produzione di immunotossine, alcune RIP sono state coniugate (sia chimicamente o mediante tecniche di ingegneria proteica) con molecole diverse da un anticorpo, ottenendo specifici agenti bifunzionali, citotossici e selettivi per una determinata popolazione cellulare, come ad esempio ligandi di recettori cellulari, inibitori di proteasi, ormoni, ecc. La prima RIP utilizzata a tale scopo è stata la saporina S6 fusa con l'urochinasi (uPA) una proteasi in grado di degradare sia la fibrina che il fibrinogeno esercitando così un'azione fibrinolitica. Il prodotto chimerico ottenuto si è dimostrato molto efficace su cellule che esprimevano il recettore per uPA (noto come uPAR), mentre

le linee cellulari prive di uPAR non erano influenzate dal coniugato (Cavallaro et al. 1993).

La transferrina è una proteina coinvolta nell'assorbimento del ferro da parte delle cellule, con la capacità, in seguito al legame con uno specifico recettore di membrana, di trasportare all'interno della cellula due ioni ferro nella forma ferri (Fe³⁺). Il recettore della transferrina, ampiamente distribuito in diversi tipi cellulari, è di solito iperespresso in cellule maligne. Pertanto, la transferrina è stata utilizzata per costruire coniugati contenenti RIP, come la saporina S6 e la catena A della ricina (Polito et al. 2013). Gli studi condotti su entrambi i coniugati hanno dimostrato un'alta selettività di questi coniugati su varie linee cellulari tumorali che esprimevano il recettore della transferrina, con differenti meccanismi di indirizzamento intracellulare.

Un approccio simile è stato usato con la curcina, una RIP di tipo 1 isolata dai semi di *Jatropha curcas* L., in grado di inibire la proliferazione delle cellule tumorali, portando alla morte cellulare per apoptosi. Poiché la citotossicità della curcina non è selettiva essa è stata fusa ad uno specifico peptide molto affine al recettore per la transferrina (TfRBP) rendendo altamente selettiva la molecola chimerica nei confronti di popolazioni cellulari iperesprimenti il recettore della transferrina, ottenendo anche una notevole riduzione del peso molecolare del costrutto chimerico (Zheng et al. 2013).

Un approccio alternativo per la costruzione di coniugati basati sulle RIP prevede il potenziamento della loro resistenza alla proteolisi. Infatti, è stato ampiamente dimostrato che la citotossicità delle RIP dipende non solo dal modo con cui entrano nelle cellule ed arrivano al citoplasma, ma anche dalla loro intrinseca resistenza agli agenti proteolitici durante il percorso cellulare (Santanche et al. 1997). Infatti, vari coniugati basati sulle RIP di tipo 1 fusi con inibitori di proteasi, hanno mostrato un aumento della loro citotossicità *in vitro* rispetto alle RIP di tipo 1 non coniugate (Tamburino et al. 2012).

Infine, negli ultimi anni, sono stati compiuti notevoli sforzi nello sviluppo di nanosistemi in grado di migliorare il riconoscimento e il rilascio di farmaci in specifiche cellule bersaglio, nella terapia antitumorale. Diversi nanomateriali sintetici sono stati sintetizzati basandosi su liposomi, polimeri organici e nanoparticelle inorganiche (Minko et al. 2013; Uddin et al. 2016). Inoltre, vale la pena anche evidenziate che le diverse nanoparticelle sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, aprendo nuove prospettive per il trasporto di farmaci al cervello. Le dimensioni nanometriche delle particelle consentono anche un accesso facilitato nella cellula e in vari compartimenti cellulari, incluso il nucleo. Una alternativa ai coniugati contenenti esclusivamente anticorpi è la costruzione di nanoconiugati delle RIP che contengono nanomateriali⁴ (Pizzo e Di Maro

⁴ I nanomateriali sono sostanze chimiche o materiali composti da particelle con dimensioni comprese tra 1 e 100 nanometri (nm).

2016). Ad esempio, la curcina, una RIP di tipo 1, è stata utilizzata con successo nella costruzione di nanoparticelle d'oro coniugate con l'acido folico e l'anticorpo antitransferrina, per ottenere una doppia e mirata nanoformulazione diretta verso i gliomi (Mohamed et al. 2014b). In questo costrutto, la proteina è stata coniugata in nanoparticelle tramite legami sensibili al pH per minimizzare la diffusione sistemica non specifica della tossina durante la circolazione e massimizzare l'efficienza del trasporto mirato dei farmaci alla zona invasa dal tumore. Un altro esempio sono i nanosistemi colloidali ibridi, costituiti da componenti polimerici lipidici altamente compatibili con le cellule endoteliali e neuronali umane. Quando queste nanoparticelle a base lipidica sono coniugate alla curcina, la nanoformulazione ottenuta si è dimostrata settivamente attiva contro le cellule di gliomi (Mohamed et al. 2014a).

5 - CONCLUSIONI

Le proteine inattivanti i ribosomi rappresentano una classe di enzimi, ampiamente distribuita nelle piante ed in misura minore, in altri organismi. Finora, molte informazioni strutturali e funzionali su queste proteine sono state accumulate; tuttavia, come di regola nella ricerca scientifica, le nuove domande poste dai risultati, probabilmente superano le risposte ottenute finora. Probabilmente la domanda più importante riguarda la funzione delle RIP in natura. Sono state avanzate diverse ipotesi ma predomina l'ipotesi della loro presenza per la difesa contro predatori, parassiti e virus. È possibile che le RIP di tipo 2 possano dissuadere gli animali dal mangiare piante in cui sono presenti, ma ciò non è facilmente verificabile per le RIP di tipo 1. Queste ultime, verosimilmente possono prevenire le infezioni virali, ma questa regola non è valida per tutti gli organismi che producono RIP di tipo 1. Il fatto che l'espressione delle RIP aumenti in condizioni di stress, porta a supporre che siano d'aiuto per le piante in condizioni ambientali sfavorevoli.

Comunque, dalla scoperta della ricina (Stillmark, 1888 e 1889), molto è stato compreso sulla struttura e sui meccanismi di questi enzimi. Inoltre, le loro attività antivirali e citotossiche sono da sempre al centro dell'interesse da parte della comunità scientifica, sia per applicazioni in campo biomedico, che in campo agricolo. Infatti, la moderna medicina non si focalizza solo sull'ottenimento di 'piccoli farmaci' ma anche su chemioterapici selettivi e senza effetti genotossici, come i differenti coniugati antitumorali delle RIP prodotti dallo sviluppo di metodi efficaci per ottenere specifici coniugati usando anticorpi, ormoni o nanostrutture hanno messo in evidenza che le RIP possono essere utilizzate nella terapia antitumorale mirata.

6 - BIBLIOGRAFIA

- Antignani A., Fitzgerald D. (2013) Immunotoxins: the role of the toxin. *Toxins (Basel)* 5 (8):1486-1502.
- Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F. (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1154 (3-4):237-282.
- Barbieri L., Gorini P., Valbonesi P., Castiglioni P., Stirpe F. (1994) Unexpected activity of saporins. *Nature* 372 (6507):624.
- Cavallaro U., del Vecchio A., Lappi D.A., Soria M.R. (1993) A conjugate between human urokinase and saporin, a type-I ribosome-inactivating protein, is selectively cytotoxic to urokinase receptor-expressing cells. *J. Biol. Chem.* 268 (31):23186-23190.
- Chaudhry B., Muller-Uri F., Cameron-Mills V., Gough S., Simpson D., Skriver K., Mundy J. (1994) The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J.* 6 (6):815-824.
- de Virgilio M., Lombardi A., Caliendo R., Fabbrini M.S. (2010) Ribosome-inactivating proteins: from plant defense to tumor attack. *Toxins (Basel)* 2 (11):2699-2737.
- Di Maro A., Citores L., Russo R., Iglesias R., Ferreras J.M. (2014) Sequence comparison and phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood method of ribosome-inactivating proteins from angiosperms. *Plant Mol. Biol.* 85 (6):575-588.
- Endo Y., Tsurugi K. (1987) RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262 (17):8128-8130.
- Ferreras J.M., Barbieri L., Girbes T., Battelli M.G., Rojo M.A., Arias F.J., Rocher M.A., Soriano F., Mendez E., Stirpe F. (1993) Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochim. Biophys. Acta* 1216 (1):31-42.
- Ghetie M.A., May R.D., Till M., Uhr J.W., Ghetie V., Knowles P.P., Relf M., Brown A., Wallace P.M., Janossy G., et al. (1988) Evaluation of ricin A chain-containing immunotoxins directed against CD19 and CD22 antigens on normal and malignant human B-cells as potential reagents for *in vivo* therapy. *Cancer Res.* 48 (9):2610-2617.
- Ghosh P., Batra J.K. (2006) The differential catalytic activity of ribosome-inactivating proteins saporin 5 and 6 is due to a single substitution at position 162. *Biochem. J.* 400 (1):99-104.
- Gilabert-Oriol R., Weng A., Mallinckrodt B., Melzig M.F., Fuchs H., Thakur M. (2014) Immunotoxins constructed with ribosome-inactivating proteins and their enhancers: a lethal cocktail with tumor specific efficacy. *Curr. Pharm. Des.* 20 (42):6584-6643.
- Girbes T., Citores L., Ferreras J.M., Rojo M.A., Iglesias R., Munoz R., Arias F.J., Calonge M., Garcia J.R., Mendez E. (1993) Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Mol. Biol.* 22 (6):1181-1186.
- Girbes T., Ferreras J.M., Arias F.J., Stirpe F. (2004) Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (5):461-476.

- Gu Y.J., Xia Z.X. (2000) Crystal structures of the complexes of trichosanthin with four substrate analogs and catalytic mechanism of RNA N-glycosidase. *Proteins* 39 (1):37-46.
- Guo Q., Zhou W., Too H.M., Li J., Liu Y., Bartlam M., Dong Y., Wong K.B., Shaw P.C., Rao Z. (2003) Substrate binding and catalysis in trichosanthin occur in different sites as revealed by the complex structures of several E85 mutants. *Protein Eng.* 16 (6):391-396.
- Hey T.D., Hartley M., Walsh T.A. (1995) Maize ribosome-inactivating protein (b-32). Homologs in related species, effects on maize ribosomes, and modulation of activity by pro-peptide deletions. *Plant Physiol.* 107 (4):1323-1332.
- Iglesias R., Ferreras J.M., Di Maro A., Citores L. (2018) Ebulin-RP, a novel member of the Ebulin gene family with low cytotoxicity as a result of deficient sugar binding domains. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1862 (3):460-473.
- Liu R.S., Yang J.H., Liu W.Y. (2002) Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A). *Eur. J. Biochem.* 269 (19):4746-4752.
- Lord J.M., Spooner R.A. (2011) Ricin trafficking in plant and mammalian cells. *Toxins (Basel)* 3 (7):787-801.
- Minko T., Rodriguez-Rodriguez L., Pozharov V. (2013) Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 65 (13-14):1880-1895.
- Mohamed M.S., Veerananarayanan S., Baliyan A., Poulouse A.C., Nagaoka Y., Minegishi H., Iwai S., Shimane Y., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. (2014a) Structurally distinct hybrid polymer/lipid nanoconstructs harboring a type-I ribotoxin as cellular imaging and glioblastoma-directed therapeutic vectors. *Macromol. Biosci.* 14 (12):1696-1711.
- Mohamed M.S., Veerananarayanan S., Poulouse A.C., Nagaoka Y., Minegishi H., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. (2014b) Type 1 ribotoxin-curcun conjugated biogenic gold nanoparticles for a multimodal therapeutic approach towards brain cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (6):1657-1669.
- Montanaro L., Sperti S., Mattioli A., Testoni G., Stirpe F. (1975) Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Inhibition of the binding of elongation factor 2 and of adenosine diphosphate-ribosylated elongation factor 2 to ribosomes. *Biochem. J.* 146 (1):127-131.
- Monzingo A.F., Collins E.J., Ernst S.R., Irvin J.D., Robertus J.D. (1993) The 2.5 Å structure of pokeweed antiviral protein. *J. Mol. Biol.* 233 (4):705-715.
- Pizzo E., Di Maro A. (2016) A new age for biomedical applications of Ribosome Inactivating Proteins (RIPs): from bioconjugate to nanoconstructs. *J. Biomed. Sci.* 23 (1):54.
- Polito L., Bortolotti M., Mercatelli D., Battelli M.G., Bolognesi A. (2013) Saporin-S6: a useful tool in cancer therapy. *Toxins (Basel)* 5 (10):1698-1722.
- Polito L., Djemil A., Bortolotti M. (2016) Plant Toxin-Based Immunotoxins for Cancer Therapy: A Short Overview. *Biomedicines* 4 (2).
- Rutenber E., Ready M., Robertus J.D. (1987) Structure and evolution of ricin B chain. *Nature* 326 (6113):624-626.

- Santanche S., Bellelli A., Brunori M. (1997) The unusual stability of saporin, a candidate for the synthesis of immunotoxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1):129-132.
- Sowa-Rogozinska N., Sominka H., Nowakowska-Golacka J., Sandvig K., Slominska-Wojewodzka M. (2019) Intracellular Transport and Cytotoxicity of the Protein Toxin Ricin. *Toxins (Basel)* 11 (6).
- Stillmark H. (1888) Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen (tesi di dottorato). University of Dorpat, Dorpat.
- Stillmark H. (1889) In: R. Kobert (ed) *Arbeiten des pharmakologischen Institutes zu Dorpat.* Enke, Stuttgart. vol. 3, pp 57-62.
- Stirpe F. (2013) Ribosome-inactivating proteins: from toxins to useful proteins. *Toxicon* 67:12-16.
- Stirpe F., Barbieri L., Gorini P., Valbonesi P., Bolognesi A., Polito L. (1996) Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS Lett.* 382 (3):309-312.
- Stirpe F., Gilibert-Oriol R. (2017) Ribosome-Inactivating Proteins: An Overview. In: Carlini CR, Ligabue-Braun R (eds) *Plant Toxins.* Springer Netherlands, Dordrecht, pp 153-182.
- Strebhardt K., Ullrich A. (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer.* 8 (6):473-480.
- Tamburino R., Pizzo E., Sarcinelli C., Poerio E., Tedeschi F., Ficca A.G., Parente A., Di Maro A. (2012) Enhanced cytotoxic activity of a bifunctional chimeric protein containing a type 1 ribosome-inactivating protein and a serine protease inhibitor. *Biochimie* 94 (9):1990-1996.
- Tejero J., Jimenez P., Quinto E.J., Cordoba-Diaz D., Garrosa M., Cordoba-Diaz M., Gayoso M.J., Girbes T. (2015) Elderberries: A Source of Ribosome-Inactivating Proteins with Lectin Activity. *Molecules* 20 (2):2364-2387.
- Thorpe P.E., Brown A.N., Bremner J.A., Jr., Foxwell B.M., Stirpe F. (1985) An immunotoxin composed of monoclonal anti-Thy 1.1 antibody and a ribosome-inactivating protein from *Saponaria officinalis*: potent antitumor effects in vitro and in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 75 (1):151-159.
- Uddin I., Venkatachalam S., Mukhopadhyay A., Usmani M.A. (2016) Nanomaterials in the pharmaceuticals: Occurrence, behaviour and applications. *Curr. Pharm. Des.*
- Vitetta E.S., Krollick K.A., Uhr J.W. (1982) Neoplastic B cells as targets for antibody-ricin A chain immunotoxins. *Immunol. Rev.* 62:159-183.
- Watanabe K., Dansako H., Asada N., Sakai M., Funatsu G. (1994) Effects of chemical modification of arginine residues outside the active site cleft of ricin A-chain on its RNA N-glycosidase activity for ribosomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58 (4):716-721.
- Zheng Q., Xiong Y.L., Su Z.J., Zhang Q.H., Dai X.Y., Li L.Y., Xiao X., Huang Y.D. (2013) Expression of curcumin-transferrin receptor binding peptide fusion protein and its anti-tumor activity. *Protein Expr. Purif.* 89 (2):181-188.