

Titolo: Vitamina C nella riprogrammazione delle cellule staminali e nel cancro - Vitamin C in stem cell reprogramming and cancer.

Codice: ASC009

Autore: Cimmino et al.

Data: 2018

Rivista: *Trends in Cell Biology* 28(9): 698-708

Argomento: acido ascorbico

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.04.001>

URL: [https://www.cell.com/trends/cell-biology/Cimmino et al 2018](https://www.cell.com/trends/cell-biology/Cimmino%20et%20al%202018)

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2024/09/15/asc009-cimmino-et-al-2018/>

Parole chiave: vitamina C, epigenetica, cellule staminali, proteine TET, metilazione, cancro

Tumore: n/a

Traduzione: l'articolo è stato tradotto in tutte le sue sezioni con semplificazioni

Punti di interesse: La vitamina C è un requisito alimentare essenziale per gli esseri umani, noto soprattutto per il suo ruolo nella protezione contro lo scorbuto. Il ripristino della vitamina C nella dieta inverte i sintomi dello scorbuto per il ripristino dell'attività delle prolidrossilasi del collagene che necessita della vitamina C come cofattore. Le prolidrossilasi sono una famiglia di enzimi diossigenasi dipendenti da Fe^{2+} e α -chetoglutarato (Fe^{2+}/α -KGDD; vedere Glossario) che necessitano della vitamina C come cofattore per mantenere la loro attività enzimatica. Altri enzimi di questo tipo sono fondamentali per la vita cellulare organizzata, in quanto sono regolatori epigenetici che controllano l'espressione genica e hanno un ruolo fondamentale nella programmazione cellulare, nelle cellule sane e nel cancro. Queste diossigenasi necessitano della vitamina C per svolgere correttamente la loro funzione. Si stima che la carenza di vitamina C sia ampiamente diffusa nella popolazione. Il modo in cui la carenza di vitamina C influenza la progressione delle malattie, dato il suo ruolo come regolatore epigenetico, necessita ancora molte indagini.

Il ruolo antiossidante della vitamina C

La vitamina C svolge un ruolo importante nella protezione delle cellule dallo stress ossidativo mantenendo l'equilibrio redox intracellulare. Agendo come donatore di elettroni, la vitamina C può ridurre le specie reattive dell'ossigeno (ROS) generati durante le normali funzioni cellulari. Estinguendo i radicali liberi, la vitamina C protegge dal danno ossidativo al DNA, dalla perossidazione lipidica e dall'ossidazione dei residui di amminoacidi in modo da mantenere l'integrità proteica.

La vitamina C è un cofattore chiave per Fe^{2+}/α -KGDD ed è coinvolta nella programmazione cellulare

Oltre al ruolo antiossidante, la capacità di agire come donatore di elettroni per ridurre il ferro ferrico (Fe^{3+}) in ferro ferroso (Fe^{2+}) è il meccanismo chiave mediante il quale la vitamina C agisce come cofattore per le diossigenasi dipendenti da Fe^{2+} e α -chetoglutarato. Importanti regolatori epigenetici sono diossigenasi regolate dalla vitamina C e sono:

- 1) le istone demetilasi contenenti il dominio chiamato Jumonji C: agiscono sulla metilazione degli istoni, le proteine che compattano il DNA nella cromatina, compattando o scompattando il DNA e rendendolo idoneo o meno alla trascrizione;
- 2) demetilasi del DNA e dell'RNA della famiglia ALKBH: demetilano direttamente molecole di DNA o RNA attivando la trascrizione genica di sequenze specifiche;

3) la famiglia delle DNA idrossilasi di traslocazione dieci-undici (TET): agenti ipometilanti il DNA. (Box 2 e 3 e vedi glossario)

Attraverso la modulazione dell'attività dei fattori epigenetici, la vitamina C è in grado di svolgere una funzione di controllo della trascrizione del DNA attraverso reazioni di demetilazione, sia degli istoni, sia direttamente del DNA attivando o disattivando così la trascrizione genica. In studi indipendenti è stato dimostrato che la vitamina C potenzia l'attività delle diossigenasi dipendenti da ferro e α -chetoglutarato e può promuovere la demetilazione del DNA nelle cellule staminali embrionali e migliorare la riprogrammazione delle cellule somatiche in cellule staminali pluripotenti indotte.

Regolazione epigenetica della vitamina C delle cellule staminali emopoietiche (HSC)

Sulla base delle precedenti osservazioni, il ruolo della vitamina C nel mantenimento ottimale dell'attività degli enzimi diossigenasi TET nelle cellule staminali ematopoietiche (HSC) durante i processi di differenziamento nelle diverse linee cellulari del sangue, ha recentemente attirato l'attenzione dei ricercatori. Le mutazioni inattivanti enzimi TET sono le più diffuse in pazienti con tumori del sangue. La perdita di funzione di TET causa cambiamenti di stati di metilazione nel genoma delle cellule staminali ematopoietiche con cambiamenti dell'espressione genica specifica, instabilità genomica e cambiamenti del regolare sviluppo delle cellule ematopoietiche. Ne conseguono crescita alterate e aberranti delle varie linee cellulari. Visto che la vitamina C è necessaria per il mantenimento di un sistema immunitario sano, ed è importante nel regolare l'attività degli enzimi TET, il potenziale della vitamina C nel modulare la differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche attraverso la regolazione dell'epigenoma è stato sorprendentemente trascurato. Carenze di vitamina C possono alterare la funzionalità degli enzimi TET nei processi di differenziazione delle cellule ematopoietiche, che possono essere invertite con l'assunzione di vitamina C nella dieta.

L'ipermetilazione del DNA è un segno distintivo delle cellule staminali embrionali umane aberranti provenienti da pazienti con tumori del sangue con una mutazione per gli enzimi TET. Farmaci ipometilanti del DNA provocano un tasso di risposta più elevato nei pazienti con mutazioni TET2. È stato dimostrato che la vitamina C agisce in sinergia con la decitabina (agente ipometilante) per migliorare l'ipometilazione del DNA. L'integrazione di vitamina C nella dieta potrebbe migliorare le risposte terapeutiche nei pazienti trattati con agenti ipometilanti del DNA.

Vitamina C come adiuvante per la terapia del cancro

I pazienti con neoplasie ematopoietiche o altri tumori sono spesso marcatamente carenti di vitamina C e il ripristino o il mantenimento di livelli fisiologici ha dimostrato di rallentare la crescita delle cellule maligne in molteplici contesti. A basse dosi, la vitamina C agisce come antiossidante e mantiene livelli sufficienti di ferro nello stato ferroso per promuovere l'attività delle diossigenasi. A dosi più elevate la vitamina C può comportarsi come un pro-ossidante, causando stress ossidativo e deplezione del GSH che porta all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Box 4).

L'aumento del ferro labile e della deplezione del GSH sono effettori distintivi della ferroptosi, una forma di morte cellulare non apoptotica causata dalla perossidazione lipidica letale. Questo potrebbe essere un meccanismo aggiuntivo attraverso il quale la vitamina C esercita la sua funzione di terapia antitumorale.

Osservazioni conclusive e direzioni future

La vitamina C è recentemente emersa come un importante regolatore della biologia delle cellule staminali e della progressione del cancro attraverso la sua capacità di modulare l'epigenoma. Mantenere una dieta ricca di vitamina C potrebbe aiutare a prevenire o sopprimere la progressione

del cancro e le dosi farmacologiche potrebbero agire in sinergia con le terapie ipometilanti o dannose per il DNA. Inoltre, migliorare la biodisponibilità della vitamina C e comprendere la base strutturale con cui la vitamina C può agire come cofattore specifico per $\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$ può aiutare nello sviluppo di terapie mirate per trattare pazienti con carenze di regolatori epigenetici. La perdita di funzione nei regolatori epigenetici è un segno distintivo del cancro e, nel caso della malignità ematopoietica, è un fattore determinante nella progressione della malattia. La potenzialità della vitamina C di modulare l'epigenoma come terapia epigenetica naturale e non tossica per la prevenzione e il trattamento del cancro ha ulteriormente ampliato il ruolo di questa vitamina essenziale nella biologia umana.

Traduzione articolo

Riassunto

La vitamina C è un requisito dietetico essenziale per gli esseri umani. Oltre al suo noto ruolo di antiossidante, la vitamina C è un cofattore per le diossigenasi dipendenti da Fe^{2+} e α -chetoglutarato ($\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$) che comprendono un gran numero di enzimi diversi, tra cui la collagene prolil idrossilasi e regolatori epigenetici della metilazione degli istoni e del DNA. La vitamina C può modulare la funzione delle cellule staminali embrionali (ESC), migliorare la riprogrammazione dei fibroblasti in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e ostacolare l'auto-rinnovamento aberrante delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) attraverso la sua capacità di migliorare l'attività delle demetilasi istoniche contenenti il dominio Jumonji C (JmjC) o delle proteine idrossilasi di traslocazione dieci-undici del DNA (TET). Dato che la disregolazione epigenetica è un noto fattore scatenante della malignità, la vitamina C può svolgere un nuovo ruolo come agente antitumorale epigenetico.

In evidenza

La vitamina C è essenziale per gli esseri umani e i livelli plasmatici sono strettamente controllati dai trasportatori di vitamina C dipendenti dal sodio che sono responsabili dell'assorbimento alimentare e dell'assorbimento nell'intero corpo.

La vitamina C è un antiossidante e un cofattore per $\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$.

La vitamina C migliora la riprogrammazione epigenetica dei fibroblasti in iPSC e mantiene la pluripotenza delle ESC, regolando l'attività delle istone demetilasi contenenti il dominio JmjC e delle idrossilasi TET.

La carenza di vitamina C può promuovere un auto-rinnovamento anomalo nelle HSC e accelerare la progressione della leucemia riducendo l'attività delle idrossilasi TET.

Dosi farmacologiche di vitamina C possono ripristinare la funzione TET nelle HSC e possono rappresentare un promettente adiuvante alle terapie standard per il trattamento della leucemia e di altri tumori.

Vitamina C: un nuovo regolatore epigenetico

La vitamina C è un requisito alimentare essenziale per gli esseri umani, noto soprattutto per il suo ruolo nella protezione contro lo scorbuto. Questa malattia, causata da una grave carenza di vitamina C, se non curata può essere fatale ed è caratterizzata da emorragie e scarsa guarigione delle ferite [1]. Il ripristino della vitamina C nella dieta inverte i sintomi dello scorbuto per il ripristino mediato dalla vitamina C dell'attività delle prolilidrossilasi del collagene. Le prolilidrossilasi sono una famiglia di enzimi diossigenasi dipendenti da Fe^{2+} e α -chetoglutarato ($\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$; vedere Glossario) che regolano la sintesi del collagene [2]. Molte altre diossigenasi $\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KG}$ dipendenti necessitano della vitamina C come cofattore per mantenere la loro attività enzimatica. Tra quei enzimi ci sono i principali regolatori epigenetici della demetilazione degli istoni (vedi glossario) e

dell'idrossimetilazione del DNA. Questi regolatori epigenetici svolgono un ruolo regolatorio per l'espressione genica e un ruolo fondamentale nella riprogrammazione epigenetica delle cellule staminali e del cancro [3 – 6]. Studi recenti hanno dimostrato che la vitamina C può proteggere le cellule staminali emopoietiche dalle alterazioni epigenetiche che guidano la progressione della leucemia e, pertanto, la capacità della vitamina C di modulare l'epigenoma (vedi glossario) ha riaperto l'interesse per i potenziali benefici terapeutici della vitamina C [7,8]. In questa revisione riassumiamo le note funzioni biologiche della vitamina C e il suo ruolo come cofattore di Fe²⁺/α-KGDD per modificare l'epigenoma delle cellule staminali.

Biosintesi e assorbimento della vitamina C

La maggior parte dei mammiferi è in grado di sintetizzare la vitamina C de novo nel fegato dal glucosio tramite l'azione enzimatica della L-gulonolattone ossidasi (GULO). Tuttavia, negli esseri umani e in altri primati, oltre alle cavie, ai pipistrelli e ai pesci teleostei come il pesce zebra, il gene GULO è inattivo, rendendo la vitamina C un requisito dietetico essenziale [1,12]. Periodi prolungati di bassa assunzione dietetica di vitamina C (< 10 mg/giorno), portano a livelli plasmatici inferiori a ~10 μM, e si manifestano nella forma più grave come scorbutto. Tuttavia, una carenza di vitamina C più lieve potrebbe essere sottostimata a causa dei suoi sintomi non specifici come affaticamento, irritabilità, dolori sordi e perdita di peso [14,15]. Negli Stati Uniti si stima che > 7% della popolazione (> 20 milioni di persone) sia carente di vitamina C [15] e nel Regno Unito il 25-46% della popolazione a basso reddito e dei fumatori presenta livelli plasmatici di vitamina C carenti o impoveriti [16]. Il modo in cui la carenza di vitamina C può influenzare la progressione delle malattie umane anche a livelli inferiori allo scorbutto, dato il suo ruolo più recentemente definito come regolatore epigenetico, richiede ulteriori indagini.

Trasporto e omeostasi della vitamina C

La vitamina C è idrosolubile e viene assorbita nella dieta attraverso il lume intestinale per la distribuzione in tutto il corpo tramite il flusso sanguigno. Nel tratto gastrointestinale la forma ionizzata della vitamina C, L-ascorbato (ASC), e la sua controparte ossidata, L-deidroascorbato (DHA), vengono assorbite dalle cellule luminali attraverso diversi meccanismi tra cui diffusione passiva, diffusione facilitata e trasporto attivo [13]. La diffusione passiva è limitata dalla bassa idrofobicità di ASC e DHA e contribuisce solo a una frazione della regolazione complessiva dell'omeostasi della vitamina C nel corpo [17]. Il trasporto di DHA, ma non di ASC, avviene tramite diffusione facilitata attraverso diversi trasportatori del glucosio (GLUT1 – 4) con diverse distribuzioni tissutali e affinità per la vitamina C, ed è inibito in modo competitivo dal glucosio (Figura 1, Figura chiave) [13]. La diffusione facilitata di DHA attraverso GLUT1 è la modalità primaria di assorbimento della vitamina C da parte degli eritrociti. Una volta all'interno dell'eritrocita, il DHA viene ridotto ad ASC dal glutatone (GSH), mantenendo così un gradiente di concentrazione che favorisce l'assorbimento del DHA ma solo all'equivalente delle concentrazioni plasmatiche (Box 1) [13]. A differenza degli eritrociti, la concentrazione intracellulare di vitamina C in altre cellule può variare da 1 a 4 mM nei globuli bianchi fino a 10 mM nelle cellule cerebrali [18]. La capacità delle cellule di raggiungere concentrazioni intracellulari così elevate (mM) di vitamina C da bassi livelli plasmatici (μM) è attribuita all'azione di due trasportatori di vitamina C sodio-dipendenti (SVCT) che utilizzano il gradiente di sodio attraverso le membrane plasmatiche per trasportare ASC (ma non DHA) nella cellula (Figura 1) [18,19]. SVCT1 è espresso principalmente nelle cellule epiteliali e regola l'assorbimento gastrointestinale e il riassorbimento renale, mentre SVCT2 è espresso nella maggior parte dei tessuti e si pensa sia responsabile dell'assorbimento cellulare sistemico [13,18]. I livelli plasmatici di vitamina C sono strettamente controllati dai due SVCT, che a loro volta presentano caratteristiche di regolazione dipendente dal substrato. La carenza di vitamina C può anche promuovere un aumento dell'espressione di mRNA

sia di SVCT1 che di SVCT2 in vari tessuti tra cui fegato e intestino [13]. È stata segnalata una disregolazione della funzione dei trasportatori della vitamina C attraverso la variazione genetica [21], e ciò può influenzare l'assorbimento e la distribuzione nell'intero corpo, portando ad alterazioni sia nell'epigenoma che nell'equilibrio redox cellulare.

Il ruolo antiossidante della vitamina C

La vitamina C svolge un ruolo importante nella protezione delle cellule dallo stress ossidativo mantenendo l'equilibrio redox intracellulare. Agendo come donatore di elettroni, la vitamina C può ridurre le specie reattive dell'ossigeno (ROS), tra cui anioni superossido, radicali idrossilici, ossigeno singoletto e acido ipocloroso che vengono generati durante la normale respirazione metabolica/fosforilazione ossidativa mitocondriale (generazione di ATP aerobica). Estinguendo i radicali liberi, la vitamina C può quindi proteggere dalle mutazioni indotte dal danno ossidativo al DNA, dalla perossidazione lipidica e dall'ossidazione dei residui di amminoacidi in modo da mantenere l'integrità proteica [1]. Mantenere l'equilibrio redox attraverso il trasferimento di elettroni è inoltre fondamentale in molti processi metabolici, nonché per la formazione di intermedi metabolici che sono noti per svolgere un ruolo importante nella modulazione dell'attività dei regolatori epigenetici, come l' α -chetoglutarato e altri intermedi del ciclo dell'acido citrico [22]. La vitamina C ha quindi il potenziale per svolgere un ruolo nel mantenimento dell'integrità cellulare e per influenzare lo stato epigenetico tramite la sua proprietà antiossidante.

La vitamina C è un cofattore chiave per Fe^{2+}/α -KGDD

Oltre al ruolo antiossidante della vitamina C, la sua capacità di agire come donatore di elettroni per ridurre il ferro ferrico (Fe^{3+}) in ferro ferroso (Fe^{2+}) è un meccanismo chiave mediante il quale la vitamina C agisce come cofattore per diossigenasi dipendenti da Fe^{2+} e α -chetoglutarato (Fe^{2+}/α -KGDD). Diverse famiglie di Fe^{2+}/α -KGDD sono regolate dalla vitamina C, comprese le prolil idrossilasi [23] e i regolatori epigenetici come 1) le istone demetilasi contenenti uno specifico dominio chiamato Jumonji C (JmjC) (JHDM) [5], 2) demetilasi del DNA e dell'RNA della famiglia ALKBH [24,25] e 3) la famiglia delle DNA idrossilasi di traslocazione dieci-undici (TET) [3,6] (Riquadro 2 e Figura 1) (vedi glossario).

La vitamina C è spesso essenziale per l'attività massima delle diossigenasi dipendenti Fe^{2+}/α -KG e non può essere sostituita nella reazione da altri antiossidanti come vitamina E, glutatione e altri, indicando una specifica necessità di vitamina C come cofattore per questi enzimi [2,6,20,26]. Inoltre, è stato dimostrato che la vitamina C si lega direttamente ad alcune Fe^{2+}/α -KGDD come le proteine TET [14]. Vi sono anche prove che la vitamina C può agire semplicemente come agente riducente per mantenere il ferro nello stato ferroso, indipendentemente da qualsiasi attività coenzimatica diretta [27]. (Box 3).

Riprogrammazione epigenetica delle cellule staminali da parte della vitamina C

Nel 2010, due studi indipendenti hanno dimostrato che la vitamina C potrebbe promuovere la demetilazione del DNA nelle cellule staminali embrionali (ESC) [28] e migliorare la riprogrammazione delle cellule somatiche in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) [4]. La vitamina C è necessaria per mantenere la proliferazione delle ESC in vitro [28], ed è stata originariamente aggiunta al terreno di coltura delle cellule somatiche per contrastare i ROS generati durante la riprogrammazione nel tentativo di migliorare l'efficienza o la qualità delle iPSC generate [4]. La vitamina C ha dimostrato di essere sostanzialmente più efficiente nel migliorare la generazione di iPSC rispetto ad altri antiossidanti. Gli inibitori delle diossigenasi dipendenti da Fe^{2+}/α -KG hanno compromesso la riprogrammazione delle cellule somatiche in cellule staminali pluripotenti [5], implicando il coinvolgimento di questi enzimi nel meccanismo di riprogrammazione mediata dalla vitamina C.

Le istone demetilasi con dominio Jumonji C (JHDM) nella riprogrammazione mediata dalla vitamina C

È stato dimostrato che la vitamina C potenzia l'attività di proteine enzimatiche, le istone demetilasi contenenti il dominio Jumonji C (JHDM) nelle reazioni di demetilazione di specifici istoni agendo sull'amminoacido lisina, in cellule in coltura e durante la riprogrammazione di cellule somatiche in cellule staminali [5, 29, 30] (VEDI GLOSSARIO). La sovraespressione di questi enzimi ha potenziato la riprogrammazione, mentre l'abbattimento ha compromesso la generazione di cellule staminali pluripotenti indotte [5]. La vitamina C potenzia l'attività enzimatica delle istone demetilasi.

Proteine TET nella riprogrammazione mediata dalla vitamina C

Studi recenti hanno dimostrato che anche la riprogrammazione delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e la demetilazione del DNA indotte dalla vitamina C dipendono dalle proteine enzimatiche TET. I fibroblasti embrionali senza questi enzimi non sono in grado di generare colonie di iPSC, mentre la sovraespressione delle proteine TET migliora la riprogrammazione cellulare [31 – 33]. La vitamina C aumenta drasticamente l'attività di questi enzimi.

Regolazione epigenetica della vitamina C delle cellule staminali emopoietiche (HSC)

Recentemente ha attirato l'attenzione dei ricercatori il ruolo della vitamina C nel mantenimento ottimale e funzionale dei livelli fisiologici di 5-idrossimetilcitosina (5hmC) e dell'attività enzimatica TET nelle cellule staminali ematopoietiche (HSC). Le proteine TET sono noti soppressori tumorali della linea emopoietica (rivisti in [36]). Le mutazioni inattivanti questi enzimi sono le più diffuse in pazienti con tumori del sangue [37,38]. La perdita di funzione di TET causa la perdita della citosina idrossimetilata nel genoma delle cellule staminali ematopoietiche che comporta cambiamenti dell'espressione genica specifica della tipologia cellulare e all'instabilità genomica [39 - 44]. Visto che la vitamina C è importante per il mantenimento di un sistema immunitario sano [45], il potenziale della vitamina C di modulare la funzione delle cellule staminali ematopoietiche attraverso la regolazione dei fattori epigenetici è stato sorprendentemente trascurato.

Carenza di vitamina C e progressione della leucemia

Recentemente, è stato scoperto che i livelli di vitamina C sono più elevati nelle cellule staminali ematopoietiche (HSC) rispetto ai tipi di cellule ematopoietiche più differenziate [7]. Il gene del trasportatore della vitamina C Svct2 è anche espresso in modo più abbondante sulle HSC rispetto ai progenitori con lignaggio limitato e alle cellule immunitarie mature. Utilizzando topi mancanti dell'enzima per la sintesi della vitamina C [46], è stato dimostrato che la carenza di vitamina C ha portato a una maggiore frequenza di HSC e ha causato una perdita della citosina idrossimetilata nel genoma. Questi effetti sono stati invertiti con l'assunzione di vitamina C nella dieta. [7, 47].

Ripristino della funzione TET mediante trattamento con vitamina C

Le mutazioni degli enzimi TET riscontrate nei pazienti sono quasi esclusivamente eterozigoti e influenzano la capacità dell'enzima di legare Fe²⁺ o α -KG, portando ad una compromissione dell'idrossilazione della 5-metilcitosina (5mC) e all'ipermetilazione del DNA [48,49]. Utilizzando modelli genetici di topi specifici, abbiamo scoperto che il ripristino dei livelli di espressione endogena di TET è sufficiente a bloccare l'auto-rinnovamento aberrante delle cellule staminali ematopoietiche, a far aumentare i livelli di citosina idrossimetilata, a promuovere la demetilazione del DNA e regolare positivamente l'espressione di geni importanti per la differenziazione delle cellule mieloidi [8]. Il trattamento con vitamina C delle cellule staminali e progenitrici emopoietiche (HSPC) carenti di TET potrebbe imitare il ripristino della funzione di

questi enzimi, causando una maggiore formazione di 5hmC, un blocco nell'auto-rinnovamento aberrante delle HSPC umane o di topo e la soppressione della progressione della malattia in vivo [8]. La perdita combinata di varie forme degli enzimi TET ha reso le HSPC resistenti al trattamento con vitamina C e gravemente carenti nella loro capacità di generare 5hmC [8], suggerendo che una soglia di espressione di TET è necessaria affinché la vitamina C moduli l'auto-rinnovamento delle HSPC.

Vitamina C come agente ipometilante

Analogamente agli studi iniziali sulle cellule staminali embrionali umane (ESC) che hanno mostrato un'ipometilazione diffusa del DNA in seguito al trattamento con vitamina C [28], abbiamo anche dimostrato che questo processo dipende dagli enzimi TET nelle linee cellulari di leucemia umana [8]. L'ipermetilazione del DNA è un segno distintivo delle cellule staminali embrionali umane aberranti provenienti da pazienti con tumori del sangue con una mutazione TET2 [50,51]. Agenti ipometilanti del DNA come la 5-azacitidina (5-aza) e la 5-aza-2-deossicitidina (decitabina) provocano un tasso di risposta più elevato nei pazienti con mutazioni TET2 [52]. È stato dimostrato che la vitamina C agisce in sinergia con la decitabina in modo dipendente da TET2 per aumentare idrossi-metil citosina, migliorare l'ipometilazione del DNA e aumentare l'espressione dei geni retrovirali endogeni, innescando una risposta di mimetismo virale innata che promuove l'apoptosi di diverse linee cellulari tumorali umane [53]. Nell'ultimo studio, sono state utilizzate concentrazioni fisiologiche di vitamina C ottenibili tramite somministrazione orale, suggerendo che l'integrazione di vitamina C nella dieta potrebbe migliorare le risposte terapeutiche nei pazienti trattati con agenti ipometilanti del DNA.

Vitamina C ad alto dosaggio come agente antitumorale

Studi farmacocinetici sugli esseri umani hanno dimostrato che la somministrazione endovenosa (IV) di L-ascorbato di sodio può generare livelli plasmatici di picco fino a 30 mM, 100 volte superiori ai livelli prodotti dalla somministrazione orale ad alte dosi, con una tossicità minima [11,55,56]. I primi studi documentati che utilizzavano vitamina C IV ad alte dosi nella terapia del cancro sono stati pubblicati da Linus Pauling ed Ewan Cameron negli anni '70, con segnalazioni di una certa efficacia [57]. Recenti studi clinici e casi di studio hanno dimostrato l'efficacia della vitamina C come agente antitumorale quando somministrata per via endovenosa ad alte dosi che vanno da 0,4 a 1,5 g di ascorbato/kg di peso corporeo per trattare pazienti con una varietà di tumori solidi tra cui cancro al seno, alle ovaie, alla prostata, ai reni, ai polmoni e al fegato [11,55,56,60]. La capacità della vitamina C di sopprimere la progressione della leucemia migliorando l'attività enzimatica TET [7,8] suggerisce che la carenza di TET potrebbe essere un biomarcatore di risposta per la terapia con vitamina C. I futuri studi clinici potrebbero concentrarsi sulle malattie dove sono prevalenti anche le mutazioni con perdita di funzione di TET2 [36].

Vitamina C come adiuvante per la terapia del cancro

I pazienti con neoplasie ematopoietiche o altri tumori sono spesso marcatamente carenti di vitamina C [53,61,62] e il ripristino o il mantenimento di livelli fisiologici ha dimostrato di rallentare la crescita delle cellule maligne in molteplici contesti, tra cui la leucemia [7,53,63]. A basse dosi, la vitamina C agisce come antiossidante e mantiene livelli sufficienti di ferro nello stato ferroso per promuovere l'attività delle diossigenasi [1]. Tuttavia, a dosi più elevate la vitamina C può comportarsi come un pro-ossidante, causando stress ossidativo e deplezione del GSH che porta all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [64] (Box 4).

Di recente, è stato dimostrato che la vitamina C ad alte dosi è selettivamente tossica per le cellule del cancro del colon-retto con determinate mutazioni [64]. In quello studio, l'aumento dell'assorbimento cellulare di vitamina C ossidata (DHA) tramite trasportatori GLUT sovraregolati

ha portato alla deplezione del GSH e a livelli letali di ROS [64]. La vitamina C ad alte dosi aumenta anche la sensibilità di molteplici neoplasie ematopoietiche al triossido di arsenico [10,62] e aumenta la chemiosensibilità e la radiosensibilità di varie cellule tumorali tra cui le cellule ovariche [9], pancreatiche [65], del glioblastoma e del carcinoma polmonare non a piccole cellule [66]. L'aumento del ferro labile e della deplezione del GSH sono effettori distintivi della ferroptosi, una forma di morte cellulare non apoptotica causata dalla perossidazione lipidica letale [67]. Dato che la vitamina C ad alte dosi può promuovere una maggiore mobilitazione del ferro redox-attivo e la deplezione del GSH [64,66], la capacità di indurre la ferroptosi potrebbe essere un meccanismo aggiuntivo attraverso il quale la vitamina C può esercitare la sua funzione di terapia antitumorale.

Osservazioni conclusive e direzioni future

La vitamina C è recentemente emersa come un importante regolatore della biologia delle cellule staminali e della progressione del cancro attraverso la sua capacità di modulare l'epigenoma. I livelli farmacologici di vitamina C che possono essere raggiunti per via parenterale, con una tossicità minima per i pazienti hanno un potenziale per un'ampia efficacia nel trattamento del cancro. Mantenere una dieta ricca di vitamina C potrebbe aiutare a prevenire o sopprimere la progressione del cancro e le dosi farmacologiche potrebbero agire in sinergia con le terapie ipometilanti o dannose per il DNA per migliorare i risultati nei pazienti oncologici. Non è chiaro se il meccanismo antitumorale primario dell'azione della vitamina C ad alte dosi sia attraverso il suo ruolo di pro-ossidante, dato che il contributo dell'attività diossigenasica potenziata nella sensibilizzazione alle terapie standard durante il trattamento con vitamina C non è stato ampiamente studiato. L'identificazione di biomarcatori di sensibilità sarà importante per stratificare i pazienti che potrebbero trarre i maggiori benefici dal trattamento con vitamina C. Inoltre, migliorare la biodisponibilità della vitamina C e comprendere la base strutturale con cui la vitamina C può agire come cofattore specifico per Fe^{2+}/α -KGDD può aiutare nello sviluppo di terapie mirate per trattare pazienti con carenze di regolatori epigenetici come le proteine TET (vedere Domande in sospeso). La perdita di funzione nei regolatori epigenetici è un segno distintivo del cancro e, nel caso della malignità ematopoietica, è un fattore determinante nella progressione della malattia. La potenzialità della vitamina C di modulare l'epigenoma come terapia epigenetica naturale e non tossica per la prevenzione e il trattamento del cancro ha ulteriormente ampliato il ruolo di questa vitamina essenziale nella biologia umana.

Glossario

L-Ascorbato (ASC): la forma ridotta di vitamina C che partecipa come donatore di elettroni e mantiene l'attività delle diossigenasi dipendendo da Fe^{2+} e α -chetoglutarato (KG) indicate con la sigla Fe^{2+}/α -KGDD.

Riparazione per escissione della base (BER): una modalità di riparazione del DNA coinvolta nella demetilazione attiva del DNA in risposta all'attività TET, per cui un nucleotide viene rimosso e sostituito da una nuova base attraverso un meccanismo che coinvolge glicosilasi del DNA, endonucleasi e ligasi.

L-Deidroascorbato (DHA): la forma ossidata di vitamina C che entra nelle cellule tramite trasportatori di glucosio e può essere ridotta di nuovo ad ascorbato.

Riprogrammazione epigenetica: la generazione e la rimozione di segni epigenetici, tra cui la metilazione del DNA e degli istoni, per rimodellare il panorama epigenetico di una cellula.

Trasportatori di glucosio (GLUT): facilitano il trasporto di DHA in competizione con il glucosio.

L-Gulono- γ -lattone ossidasi (GULO): un enzima che catalizza la fase finale della biosintesi della vitamina C nel fegato dei topi, ma non è funzionale negli esseri umani.

5-idrossimetilcitosina (5hmC): una modifica del DNA generata dall'attività dell'idrossilasi TET che protegge le cellule dall'ipermetilazione aberrante del DNA e regola l'espressione genica.

Demetilasi istoniche contenenti il dominio Jumonji C (JmjC) (JHDM/KDM): diossigenasi dipendenti da Fe^{2+}/α -chetoglutarato (Fe^{2+}/α -KGDD) dipendenti dalla vitamina C che catalizzano la demetilazione della lisina e regolano la riprogrammazione epigenetica dei fibroblasti in iPSC.

Diossigenasi dipendenti da Fe^{2+} e α -chetoglutarato (Fe^{2+}/α -KGDD): una famiglia eterogenea di enzimi che sono sia dipendenti dal chetoglutarato (KG) che da ferro e che utilizzano la vitamina C come cofattore.

5-metilcitosina (5mC): citosina metilata. La metilazione è una modifica della base citosina generata dall'attività degli enzimi DNA metiltransferasi per regolare l'espressione genica e il silenziamento genico.

Trasportatori di vitamina C sodio-dipendenti (SVCT): una delle due molecole (SVCT1/2) che utilizzano un gradiente di sodio per trasportare attivamente ASC, generando elevate concentrazioni intracellulari di vitamina C.

Famiglia di traslocazione dieci-undici (TET): Fe^{2+}/α -KGDD dipendenti dalla vitamina C che catalizzano l'ossidazione di 5mC nel genoma per regolare la metilazione del DNA, la riprogrammazione, la pluripotenza delle cellule staminali e agiscono come soppressori tumorali della malignità emopoietica.

Box 1. Forme biologicamente attive di vitamina C

A pH fisiologico, la vitamina C esiste prevalentemente nella sua forma ionizzata come L-ascorbato (ASC) [13]. L'ASC subisce l'ossidazione di un elettrone per formare un radicale ascorbico che è relativamente stabile e può essere riciclato enzimaticamente in ASC. Tuttavia, due radicali ascorbici possono anche dismutarsi in una molecola di ASC e una di deidroascorbato (DHA). Il DHA, che è strutturalmente instabile, con un'emivita di diversi minuti, si degrada irreversibilmente se non viene rapidamente ridotto in ASC da reazioni enzimatiche e non enzimatiche dipendenti dal glutatone (GSH) e dal NADP [71]. Pertanto, in condizioni fisiologiche, > 95% della vitamina C è nella forma ridotta di ASC nei fluidi corporei sia intracellulari che extracellulari [1].

Box 2. Diossigenasi regolate dalla vitamina C

La capacità della vitamina C di modulare il ferro redox attivo le consente di partecipare a numerosi processi biologici influenzando un'ampia varietà di diossigenasi dipendenti da Fe^{2+} e α -chetoglutarato (KG) (Fe^{2+}/α -KGDD) tra cui prolil idrossilasi, istone demetilasi, omologhi ALKB e proteine TET (Figura 1).

Prolil-idrossilasi, ormoni peptidici e biosintesi lipidica

Senza vitamina C, la prolil-4-idrossilasi del collagene (C-P4H) non può catalizzare l'idrossilazione della prolina nel collagene, portando a una produzione difettosa di collagene e alla rottura sistemica dei tessuti caratteristica dello scorbuto [13]. La vitamina C è inoltre necessaria per l'idrossilazione prolifica del fattore inducibile dall'ipossia (HIF) [72, 73]. La vitamina C è inoltre necessaria per la conversione della dopamina in noradrenalina e per potenziare l'attività degli enzimi coinvolti nell'ammidazione di numerosi pro-ormoni e nella biosintesi della L-carnitina [2].

Demetilazione degli istoni

La vitamina C è necessaria per l'attività ottimale e la capacità di demetilazione di diverse demetilasi istoniche contenenti il dominio Jumonji C (JHDM) [74], che includono oltre 20 proteine negli esseri umani che idrossilano e rimuovono mono-, di- o trimetil-lisine negli istoni [75]. La demetilazione dell'istone è catalizzata dal dominio JmjC per produrre una specie ossoferrilica altamente reattiva che idrossila il substrato metilato, consentendo la perdita spontanea del gruppo metilico come formaldeide [76]. Questi processi di demetilazione degli istoni servono per regolare lo stato della cromatina e l'espressione genica [75].

Riparazione di DNA e RNA

Gli ALKBH dei mammiferi sono una famiglia di nove diossigenasi (ALKBH1 – 8 e 9 (FTO)) che ossidano i gruppi alchilici sulle basi di acidi nucleici danneggiate dall'alchilazione, agendo come enzimi di riparazione di DNA/RNA o demetilasi dirette che rimuovono la 1-metiladenina citotossica (1-meA), la 3-metilcitosina (3-meC) e l'eteno-adenina (ϵ A) [77]. Sia FTO (ALKBH9 o proteina associata a massa grassa e obesità) che ALKBH5 riparano la N6-metil-adenina (m6A) nell'RNA [77].

Idrossimetilazione del DNA

Le proteine TET (TET1 – 3) catalizzano l'idrossilazione dei residui di 5-metilcitosina (5mC) nel DNA in 5-idrossimetilcitosina (5hmC), che può essere ulteriormente ossidata in 5-formilcitosina (5fC) e 5-carbossilcitosina (5caC). I prodotti di 5mC catalizzati dalle proteine TET possono essere cationi modificatori stabili o transitori che forniscono un innesco per la demetilazione del DNA [80 – 82]. La vitamina C aumenta l'attività catalitica dei TET portando a una maggiore formazione di 5hmC, 5fC e 5caC e a concentrazioni fisiologiche di Fe^{2+} (10 μM) il trattamento con vitamina C (50 – 500 μM) aumenta l'attività dei TET in modo dose-dipendente e accelera la loro velocità di reazione fino a otto volte [6].

Box 3. Regolazione dell'assorbimento del ferro e dell'omeostasi da parte della vitamina C

La vitamina C potrebbe svolgere un ruolo indiretto nel mantenimento dell'attività delle diossigenasi Fe^{2+} e α -chetoglutarato dipendenti, regolando l'omeostasi del ferro. La capacità della vitamina C di ridurre il ferro ferrico (Fe^{3+}) in ferro ferroso (Fe^{2+}) è il meccanismo con cui aumenta l'assorbimento di Fe^{3+} non eme dalla dieta e aumenta l'assorbimento cellulare di Fe^{3+} legato alla transferrina trasportato nel plasma [19]. La riduzione di Fe^{3+} a Fe^{2+} gli consente di entrare nelle cellule attraverso un trasportatore di ioni metallici bivalenti, che può aumentare il pool di ferro labile attivo redox intracellulare (Figura 1). Inoltre, la vitamina C può stimolare la sintesi della proteina di riserva del ferro cellulare, la ferritina, inibire la degradazione della ferritina lisosomiale e l'efflusso di ferro cellulare e indurre l'assorbimento di ferro da complessi ferro-citrato a basso peso molecolare [19].

Box 4. Ruolo pro-ossidante della vitamina C ad alto dosaggio

La vitamina C, a basse concentrazioni, funziona come un agente riducente e antiossidante, proteggendo le cellule dallo stress ossidativo [1]. A concentrazioni più elevate, tuttavia, può agire come pro-ossidante, aumentando lo stress ossidativo per promuovere la morte cellulare [64,83], che può essere sfruttato per colpire le cellule tumorali (Figura 1). Ad alte dosi, la vitamina C viene ossidata nel fluido extracellulare in un radicale ascorbato (AscH^\cdot), causando la riduzione del ferro nella forma ferrosa ($\text{AscH}^\cdot + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{AscH} + \text{H}^+$). Il ferro ferroso può reagire con l'ossigeno per produrre un anione superossido (O_2^-), tramite la cosiddetta reazione di Fenton, per formare livelli tossici di H_2O_2 [83]. L'enzima catalasi, in condizioni fisiologiche, può metabolizzare H_2O_2 in ossigeno e acqua [84]. Tuttavia, livelli basali elevati di ROS, carenza di attività della catalasi o aumento dell'assorbimento di vitamina C da parte delle cellule tumorali potrebbero renderle selettivamente vulnerabili all'effetto pro-ossidante di alte dosi di vitamina C, e questo è un campo di ricerca in corso.

Domande in sospeso

Qual è il ruolo della vitamina C nella modulazione dell'attività di altri Fe^{2+}/α -KGDD nelle HSC e nel cancro?

La vitamina C influenza l'attività dei Fe^{2+}/α -KGDD regolando l'omeostasi del ferro

sistemico/cellulare?

Qual è il miglior biomarcatore predittivo della sensibilità al trattamento con vitamina C?

Esiste una dipendenza strutturale intrinseca ai $\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$ mediante la quale la vitamina C può modulare direttamente l'attività catalitica?

Ci sono mutazioni patogene nelle proteine TET o in altri $\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$ che alterano la capacità della vitamina C di agire come cofattore?

Le mutazioni o i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nei geni coinvolti nel trasporto e nel riciclaggio della vitamina C influenzano la biodisponibilità della vitamina C nelle malattie umane?

Quali sono le terapie combinate più efficaci che agiscono in sinergia con la vitamina C?