



## SOCE: EMERGE UN NUOVO TARGET TERAPEUTICO DAL “CALCIUM TOOLKIT” DELLA CELLULA

*Un meccanismo emerso di recente come parte del “calcium toolkit” della cellula è il SOCE, che consiste nell’ingresso di calcio dall’esterno a seguito dello svuotamento del reticolo endoplasmatico. La scoperta di small molecules che modulino questo evento cellulare e le proteine coinvolte è di importanza cruciale, sia per la miglior comprensione del ruolo fisiopatologico del SOCE, ancora poco conosciuto, sia per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche.*

### Il calcio, un trasduttore universale e versatile

Pur essendo un semplicissimo ione, il calcio è responsabile del corretto funzionamento di ogni cellula poiché, direttamente o indirettamente, tutti o quasi tutti i processi cellulari dipendono dal calcio. Nella cellula, infatti, il calcio funge da messaggero universale, tanto da essere protagonista della sua nascita, della sua crescita e, paradossalmente, della sua morte [1]. Per citare un esempio, nei mammiferi la fertilizzazione dell’uovo da parte dello spermatozoo scatena un’oscillazione di calcio che, persistendo per ore, media e trasmette tutti i segnali coinvolti nella divisione cellulare. Al tempo stesso, è un’alta concentrazione di calcio a indurre la morte cellulare, sia essa per necrosi o apoptosi. Ma il calcio non si limita ad essere un segnale di vita e di morte e controlla, a seconda della cellula, l’apprendimento, la memoria, la contrazione muscolare, il metabolismo e la trascrizione cellulare, il rilascio di neurotrasmettitori e tanto altro ancora.

Che cosa rende questo ione così universale e versatile da poter regolare così tanti e diversi processi cellulari? E perché è stato scelto proprio il calcio come trasduttore quando ad esempio il magnesio era di gran lunga più abbondante nel brodo primordia-

le? La risposta a queste domande risiede nella sua spiccata flessibilità. I segnali associati al calcio sono incredibilmente versatili in termini di spazio, tempo e ampiezza [2]. Per esempio, l’impulso può generare una risposta di micro o millisecondi, oppure può durare fino ad alcuni minuti, generando un’onda di calcio che si propaga ai diversi bersagli nella cellula. Questa versatilità nasce dal fatto che centinaia di proteine regolano questi segnali e che, all’interno di questo vasto repertorio, ogni tipo di cellula combina e assembla (*mix and match*) queste proteine, costruendosi il proprio *calcium toolkit* specifico per controllare quel determinato processo fisiologico (Fig. 1) [3]. In più, le sue proprietà chimico-fisiche (e.g. valenza,

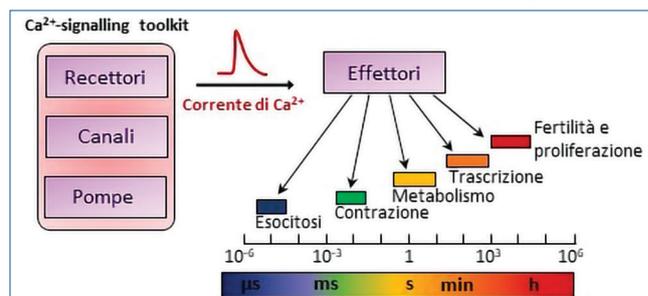


Fig. 1 - *Calcium toolkit* ed effetto mediato dal calcio alle diverse concentrazioni

raggio ionico, polarizzabilità, energia di solvatazione, raggio dello ione solvatato) gli conferiscono una chimica di coordinazione molto flessibile in termini di numero di siti (da 6 a 12), di lunghezza e di angoli di legame, e quindi adattabile anche a siti di legame con geometria irregolare, come quelli di molecole complesse come le proteine, i cosiddetti *EF-hand motif* [4].

La concentrazione di calcio è molto alta nell'ambiente extracellulare e negli organelli (in particolar modo nel reticolo endoplasmatico), mentre è estremamente bassa nel citosol. Questa scelta, oltre a garantire il *calcium signalling*, è stata, agli albori, una necessità evolutiva dettata dalla concomitante identificazione del fosfato come fonte energetica principale della cellula. I sali di calcio fosfato, a differenza di quelli del magnesio, hanno una ridotta solubilità nell'ambiente cellulare e, tendendo a precipitare, renderebbero impossibile l'utilizzo del fosfato come fonte energetica [4]. Le cellule sono quindi state costrette a mantenere livelli citosolici nanomolari di calcio e il *calcium signalling* altro non è che impercettibili oscillazioni della concentrazione di questo ione, che proviene o dall'esterno - attraverso i canali della membrana cellulare - o dall'interno - ovvero dal reticolo endoplasmatico (ER). Mentre nelle cellule eccitabili, come i neuroni o le cellule muscolari, il principale meccanismo di ingresso è rappresentato dai canali voltaggio-dipendenti, nelle cellule non eccitabili esiste un meccanismo, ancora poco conosciuto, ma che si sta consolidando in questi anni come un promettente target terapeutico. È il SOCE, acronimo che sta per *Store-Operated Calcium Entry*, ovvero quell'ingresso di calcio attraverso la membrana cellulare conseguente allo svuotamento del reticolo endoplasmatico.

## Il SOCE nel *calcium signalling*: da corrente a meccanismo molecolare

Come spesso succede quando si tratta di *calcium signalling*, il SOCE è stato prima osservato e caratterizzato sotto forma di una corrente chiamata ICRA (CRAC: *Calcium Release-Activated Calcium*), ma solo decine di anni dopo è stato identificato il complesso meccanismo molecolare che si nasconde dietro questo semplice fenomeno. La corrente di calcio legata a questo meccanismo fu osservata già

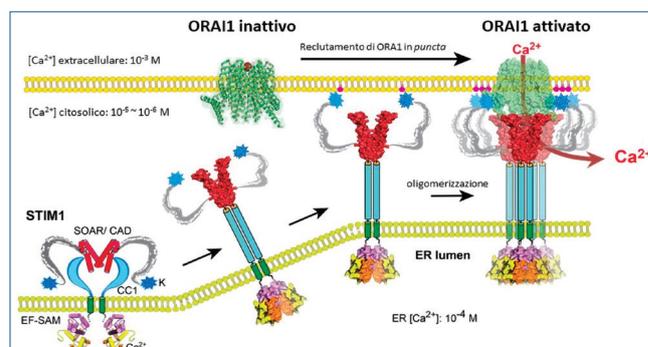


Fig. 2 - Meccanismo di attivazione dello *Store-Operated Calcium Entry*, da G. Ma, M. Wei, L. He et al., *Nat. Commun.*, 2015, 6, 7826

nel 1986 da Jim Putney, un pioniere del *cross-talk* tra reticolo endoplasmatico e membrana cellulare, ma solo recentemente - tra il 2005 e il 2006 - sono state descritte le proteine chiave di questo evento cellulare. Orai è un canale ionico presente sulla membrana cellulare, selettivo per il calcio, di cui esistono tre omologhi, Orai1, Orai2 e Orai3, che prendono il nome da *Orae*, le tre divinità della mitologia greca che custodiscono il paradiso.

STIM, con i suoi omologhi STIM1 e STIM2, è invece un sensore a livello del reticolo endoplasmatico che per l'appunto STIMola l'ingresso di calcio: quando i livelli di calcio si abbassano nel reticolo endoplasmatico, lo ione si dissocia dall'*EF hand*, STIM trasloca alle giunzioni ER-membrana cellulare e, stabilendo un'interazione proteina-proteina, induce l'assemblamento di più Orai a dare un canale ionico funzionale, chiamato canale CRAC, che si apre e permette l'ingresso di calcio (Fig. 2). La riduzione dello ione nel reticolo, che attiva STIM, porta alla co-localizzazione con Orai e, nel preciso momento in cui vi è l'interazione tra i due, si formano dei complessi definiti *puncta*. Grazie all'utilizzo della taspigargina che induce lo svuotamento del reticolo endoplasmatico e all'utilizzo di anticorpi legati a diversi fluorofori, in Fig. 3 si può vedere come STIM, marcato in verde, si associ con Orai, in rosso, a formare i *puncta*, che risultano quindi gialli e localizzati a livello della membrana plasmatica, mentre il nucleo della cellula è colorato in blu. È sorprendente sapere che questa sequenza coreografica di eventi avviene in meno di un minuto! I canali CRAC si caratterizzano per una bassa conduttanza, potendo quindi funzionare a lungo senza sommergere le cellule di calcio, e per essere

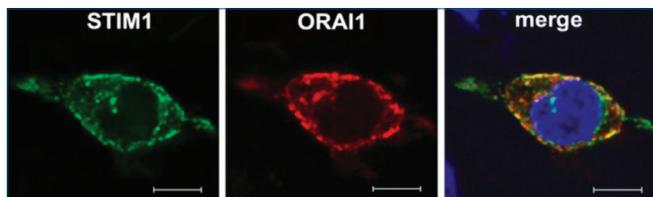
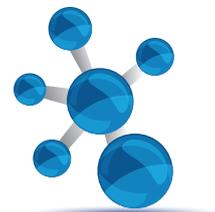


Fig. 3 - Formazione dei *puncta*, da M.E. Klejman, J. Gruszczynska-Biegala et al., *Neurochem. Int.*, 2009, 54(1), 49

eccezionalmente selettivi per questo specifico ione, riuscendo a discriminare tra i diversi cationi bivalenti.

### Il SOCE gioca un ruolo fondamentale nel corretto funzionamento dell'organismo

In molti distretti questo meccanismo è ridondante rispetto ad altri meccanismi di ingresso di calcio, ma in alcuni tessuti e organi il SOCE gioca un ruolo fondamentale. Sin dagli anni Novanta è stato evidente come il suo ruolo fosse importante per il buon funzionamento del sistema immunitario, dal momento che il canale CRAC rappresenta la principale via di ingresso di calcio durante l'attivazione dei linfociti T. Si calcola infatti che esistano almeno 10.000 canali CRAC su un singolo linfocita T, tanto che, complessivamente, la corrente del SOCE diventa significativa. Successivi studi in topi knock-out in cui l'espressione di Orai1 o STIM1 è stata soppressa hanno confermato come il SOCE sia importante non solo per le difese immunitarie, ma anche a livello del muscolo scheletrico e delle piastrine. Si è poi potuto vedere che un alterato funzionamento del SOCE è riconducibile a molti stati patologici: immunodeficienze e disordini autoimmuni, allergie, asma, sindrome del colon irritabile sono solo alcuni di questi [5]. Oltre ad una alterata espressione, le proteine Orai e STIM possono andare incontro a mutazioni genetiche. Le mutazioni *loss-of-function* portano ad una sindrome simile alla SCID (*Severe Combined Immune Deficiency*), dove il paziente va incontro a ripetute infezioni, letali a meno che non riceva un trapianto di cellule staminali. Al contrario, le mutazioni *gain-of-function* sono responsabili di una malattia genetica rara, la miopatia ad aggregati tubulari (TAM), che colpisce il muscolo provocando frequenti contrazioni dolorose e affaticamento fino ad una progressiva degenerazione muscolare e alla compromissione della capacità di movimento. Inoltre, è recentemente emerso che anche nel tumore la

sovraespressione di Orai e/o STIM o la loro attivazione costitutiva stimola non solo la tumorigenesi, ma anche la migrazione e l'invasione, favorendo la metastatizzazione. Questo meccanismo è stato dimostrato per il tumore della mammella, dove si è visto che l'inibizione del SOCE attraverso modulatori negativi è in grado di ridurre significativamente la capacità delle cellule di carcinoma mammario di formare tumori maligni secondari [6].

### Small molecules che modulano il SOCE

Dato il ruolo cruciale che il SOCE gioca nell'organismo, è diventato fondamentale avere a disposizione piccole molecole capaci di modularlo, sia positivamente che negativamente. La difficoltà principale risiede nel fatto che le informazioni bioinformatiche e cristallografiche a disposizione sono ancora scarse, rendendo difficile la progettazione razionale di molecole capaci di interagire con questo evento cellulare. Ad esempio, nel 2012 è stato riportato il cristallo di Orai di *Drosophila melanogaster*, ma la risoluzione è piuttosto bassa (3,35 Å) e mancano alcune porzioni di proteina [7, 8], così come di Orai umana sono riportati solo piccoli frammenti (Fig. 4). È questo il motivo per cui, se da un lato sono stati descritti molti modulatori del SOCE, è ancora poco compreso il loro profilo farmacologico, così come il loro esatto sito d'azione. Altra sfida ancora aperta è quella di ottenere composti che siano selettivi per il SOCE, e che non interferiscano con altri canali permeabili al calcio.

L'effetto delle *small molecules* sul SOCE viene principalmente studiato attraverso *calcium imaging*, dove si monitora il movimento di calcio attraverso la membrana cellulare usando indicatori fluorescenti come il Fura-2, oppure attraverso tecniche di *patch clamp*, a volte automatizzate, dove il flusso di ioni calcio attraverso la membrana è misurato sotto forma di corrente elettrica.

Fino al 2018 gli unici modulatori positivi del SOCE noti erano composti a base di boro, come il 2-APB e il MDEB. Recentemente sono stati invece riportati i primi modulatori positivi che non contengono questo elemento, di cui un esempio è rappresentato dal 2T in Fig. 5 [9].

Tra i modulatori negativi invece, oltre ai lantanidi ( $\text{La}^{3+}$  e  $\text{Gd}^{3+}$ ) storicamente usati come bloccanti del poro del canale, sono state riportate diverse *small mole-*

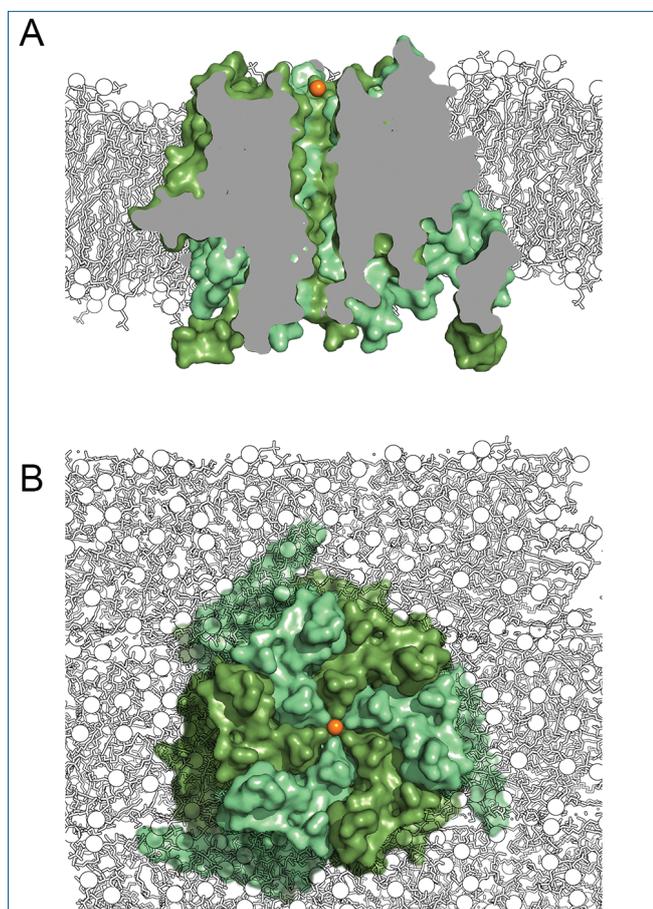


Fig. 4 - Nella sezione del canale Orai1 (A) è visibile il calcio all'ingresso del poro, la struttura esadimerica (B) è conservata sia in *Drosophila* che nell'omologo umano

*cules* sviluppate a partire da un progenitore comune chiamato BTP2, un pirazolo scoperto dalla Abbott nel 2000 [10]. Gli analoghi del BTP2, conosciuti anche come Pyrs, sono tutti accomunati dalla presenza dell'anello pirazolico e da una sottostruttura arilammidica. Recentemente, sfruttando un approccio di *click chemistry*, è stata identificata una nuova classe di composti, distinta da quella dei Pyrs, dove l'ammide è sostituita da un triazolo, di cui il composto Pyrtriazolo 39 è un esempio [9, 10]. Inoltre, sono riportati alcuni modulatori dove la sottostruttura arilica è sostituita da un eteroarile, come nel caso del CM-4620.

Interessante è stata la scoperta dell'AnCoA4, un composto la cui sottostruttura benzochinonica lo differenzia dagli altri modulatori noti. Questo composto interferisce con il *binding* STIM1/Orai1 e la sua identificazione è avvenuta attraverso uno screening che ha fatto uso di frammenti peptidici di

Orai1 e/o STIM1 immobilizzati in *microarray* [11]. La sottostruttura arilammidica sembra essere davvero importante nella modulazione del SOCE tanto che lo *screening* di una *library* di farmaci approvati dall'FDA ha permesso di scoprire che sia la leflunomide che il suo metabolita attivo teriflunomide, entrambi recanti sottostruttura arilammidica, agiscono come modulatori negativi del SOCE. La leflunomide è tradizionalmente usata nella sclerosi multipla in quanto è un debole inibitore di diidroorotato deidrogenasi. In realtà ci si chiede oggi se la sua efficacia nel trattamento della sclerosi non sia da ricondurre alla modulazione del SOCE, aprendo quindi nuove prospettive nel trattamento di questa patologia [12].

### I modulatori del SOCE arrivano in clinica

Se i modulatori del SOCE sono stati inizialmente concepiti come tool per studiare il ruolo fisiologico del SOCE, ad oggi vengono progettati e sviluppati dalle aziende farmaceutiche in programmi di R&D, con l'obiettivo di sviluppare farmaci per trattare quelle condizioni patologiche in cui il SOCE gioca un ruolo importante [13].

Di tutti i composti che sono stati sviluppati, quattro sono attualmente in clinica, come descritto in Tab. 1. Il candidato più avanzato è il CM-4620, attualmente in fase II per il trattamento della pancreatite acuta, patologia dove è stato ampiamente dimostrato come un eccesso di calcio all'interno delle cellule acinari attivi e liberi i proenzimi digestivi, inducendo necrosi e infiammazione [14]. RP3128 in modelli preclinici è in grado di inibire l'infiammazione di tipo

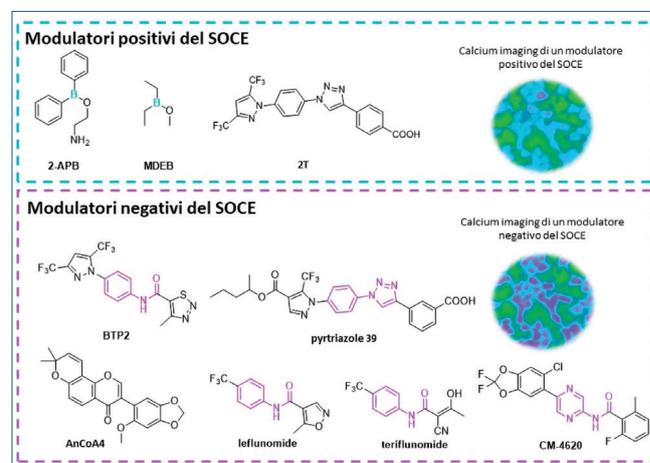
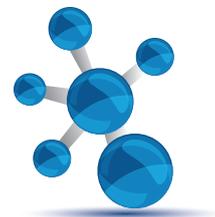


Fig. 5 - Strutture di alcuni modulatori positivi e negativi dello *Store-Operated Calcium Entry*



Nome	Indicazione terapeutica	Identificativo (anno)	Fase clinica	Stato
CM-4620	Pancreatite acuta	NCT03401190 (2018)	II	In reclutamento
		NCT03709342 (2019)	II	In reclutamento
RP3128	Asma	NCT02958982 (2016)	I/IIa	Terminato
RP4010	Linfoma non-Hodgkin	NCT03119467 (2017)	I/IIb	In reclutamento
PRCL-02	Placche psoriasiche	NCT03062618 (2017)	I	Completato
		NCT03614078 (2018)	IIa	Attivo, non in reclutamento

Tab. 1 - Modulatori del SOCE e rispettivi studi clinici

allergico ed è quindi entrato in fase I/IIa per l'asma [15]. RP4010 è in fase I/IIb per il linfoma non-Hodgkin del quale l'inibizione del SOCE ha dimostrato di ridurre in maniera significativa la progressione [16]. Infine, PRCL-02, interferendo con i canali CRAC e attenuando la risposta del sistema immunitario, è in fase II per la psoriasi [17].

Accanto a queste *small molecules*, sono stati sviluppati anche anticorpi monoclonali umani contro Orai1, con l'obiettivo di trovare una nuova terapia immunosoppressiva, anche se i tentativi di traslare questi sistemi *in vivo* hanno per ora fallito.

### In conclusione

Lo studio del SOCE, nato in un'era prettamente fisiologica, con la caratterizzazione di ICRAC attraverso il *calcium imaging* e l'elettrofisiologia, ha attraversato un'era molecolare, con gli studi di *knock-out* e *small interfering RNA* che hanno permesso la comprensione della sua coreografia, ed è appena entrato in un'era strutturale, con la cristallografia e la microscopia crioelettronica a fornire nuove informazioni sulle proteine coinvolte. Molto resta ancora da scoprire, ma la *chemical biology*, con lo sviluppo di *small molecules* che siano capaci di modulare efficacemente e selettivamente il SOCE, offre l'opportunità di muoversi su questi tre fronti e integrare tutte queste informazioni, offrendo da un lato strumenti efficaci per elucidare quegli aspetti del SOCE ancora poco conosciuti, dall'altro una speranza terapeutica per situazioni patologiche legate ad un *calcium overload* e per le quali ancora non è stato individuato un trattamento efficace.

### Legenda

CRAC: Calcium released-activated calcium

ER: Endoplasmic Reticulum

FDA: Food and Drug Administration  
SCID: Severe Combined Immune Deficiency  
SOCE: Store-Operated Calcium Entry  
STIM: STromal Interaction Molecule  
TAM: Tubular Aggregate Myopathy

### BIBLIOGRAFIA

- [1] M.J. Berridge, M.D. Bootman, P. Lipp, *Nature*, 1998, **395**, 645.
- [2] M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, **1**(1), 11.
- [3] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, **4**(7), 517.
- [4] E. Carafoli, J. Krebs, *J. Biol. Chem.*, 2016, **291**(40), 20849.
- [5] A.B. Parekh, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, **9**(5), 399.
- [6] S. Yang, J.J. Zhang, X.Y. Huang, *Cancer Cell*, 2009, **15**(2), 124.
- [7] PDB: <https://www.rcsb.org/3d-view/4hkr>
- [8] X. Hou, L. Pedi, M.M. Diver, S.B. Long, *Science*, 2012, **338**(6112), 1308.
- [9] B. Riva, A. Griglio, M. Serafini *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2018, **61**(21), 9756.
- [10] S.W. Djuric, N.Y. BaMaung *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**(16), 2975.
- [11] A.M. Sadaghiani, S.M. Lee *et al.*, *Chem. & Biol.* 2014, **21**(10), 1278.
- [12] S. Rahman, T. Rahman, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 12881.
- [13] K.A. Stauderman, *Cell Calcium*, 2018, **74**, 147.
- [14] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03709342>
- [15] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02958982>
- [16] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03119467>
- [17] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03614078>

### A Novel Therapeutic Target Emerges from the Cellular "Calcium Toolkit"

Recently, a new mechanism has emerged from the cellular "calcium toolkit". It is called SOCE and consists in the calcium entry across the plasma membrane triggered by its depletion in the endoplasmic reticulum. The discovery of small molecules able to modulate this cellular event and the proteins involved is of pivotal importance for the better comprehension of its physio-pathological role, still unclear, and for the development of novel effective therapies.