

S.S. Mutagenesi Molecolare e Riparazione del DNA

Cooperazione trascrizionale tra p53 e recettore per l'estrogeno nell'espressione di VEGF-R1: meccanismi e conseguenze per il rischio oncogeno

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: a - Fattori di rischio esogeni ed endogeni e loro eventuali interazioni

Responsabile: Alberto Inga

Partecipanti: Gilberto Fronza, Paola Menichini

Durata: 2006-2008

Parole chiave: p53; estrogen receptor; FLT1; VEGF-R1; polimorfismi di singolo nucleotide (SNP); cooperatività trascrizionale; interazioni gene/ambiente

Altre strutture IST: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (L. Ottaggio); S.C. Nanobioteconologie (D. Bordo)

Altri Enti coinvolti: Abt. Toxikologie Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie Campus Benjamin Franklin Charité, Universitätsmedizin, Berlin (G. Schoenfelder); Chromosome Stability Section, Laboratory of Molecular Genetics National Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS, NIH Research Triangle Park, NC USA (M.A. Resnick). University of Cincinnati, OH, USA (Bruce Aronow, Anil Jegga).

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: AIRC

Background

Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare è un importante fattore angiogenetico che esercita i suoi effetti biologici, come la modulazione della proliferazione cellulare, differenziamento e apoptosi, prevalentemente attraverso due recettori ad alta affinità: FLT1 (VEGF-R1) e FLK1 (VEGF-R2). Il gene oncosoppressore p53 codifica per una fosfoproteina nucleare coinvolta in svariati processi biologici quali l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi; tale proteina svolge le proprie funzioni biologiche agendo come fattore di trascrizione tetrameric in grado di legarsi a sequenze specifiche di DNA. La sequenza consenso di legame è costituita da due copie di un motivo di 10 paia di basi, 5' RRRCCWWGGYYY3', dove R rappresenta una purina, Y una pirimidina e W Adenina o Timida. I recettori per gli estrogeni alfa e beta, appartengono alla grande famiglia dei recettori nucleari e possono funzionare come fattori di trascrizione ligando-dipendenti con importanti ruoli durante lo sviluppo, come pure in condizioni fisiologiche e patologiche di tessuti somatici. La sequenza consenso di legame per questo tipo di fattori di trascrizione è costituita da due copie di un motivo di 5 paia di basi, 5' GGTCA 3', dove le prime due G rappresentano la regione più importante del RE. In uno studio precedente abbiamo stabilito come il gene soppressore di tumore p53 possa stimolare la trascrizione del promotore prossimale del gene FLT1. La stimolazione è associata alla presenza di una particolare variante polimorfica del promotore (C/T SNP) che introduce un sito di legame dimerico per la p53 (half-site p53 RE) ed è presente in circa il 6% dei cromosomi nella popolazione umana. Avevamo inoltre osservato che oltre alla sequenza responsiva alla p53 un'altra sequenza regolatrice, corrispondente ad un sito di legame monomero per il recettore degli estrogeni (ER) era necessaria per la stimolazione di FLT-1 mediata dalla p53.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Approfondire i meccanismi e le conseguenze biologiche della cooperazione trascrizionale tra p53 ed ER al promotore del recettore di VEGF FLT1. Studiare l'effetto di specifici agenti ambientali e condizioni di stress cellulare che portano all'attivazione coordinata di p53 ed ER producendo cooperazione trascrizionale. Lo studio è stato articolato in tre fasi principali: 1) valutazione dell'impatto del polimorfismo appena scoperto sull'espressione di FLT1 e conseguenze per le risposte biologiche riconducibili a FLT1. 2) Meccanismi e proteine coinvolte nella cooperazione trascrizionale al promotore FLT-1. In questa fase, si è cercato di capire la generalità di questo fenomeno che potrebbe coinvolgere altri fattori di trascrizione, come ad esempio i membri della famiglia di fattori di trascrizione p53 (p63 e p73) ed altri recettori nucleari (ad es. ER beta), ed operare anche su altri geni bersaglio, che potrebbero essere mappati con un approccio bioinformatico. 3) Valutazione del polimorfismo come fattore di rischio individuale per lo sviluppo di neoplasie. Per questo studio abbiamo contribuito ad un'indagine epidemiologica, coordinata dal nostro collaboratore Dr. Resnick.

Beneficiari

La ricerca ha suscitato interesse per le sue implicazioni nella comprensione delle reti trascrizionali coordinate da fattori di trascrizione molto importanti nella cancerogenesi come il gene soppressore di tumore p53 e i recettori per gli estrogeni. L'aver trovato un legame tra p53 e ER nella modulazione di un importante modulatore dell'angiogenesi patologica potrà fornire strumenti anche applicativi per modulare questa interazione dato che il circuito di cooperazione trascrizionale identificato è dipendente dall'esposizione a molecole presenti nell'ambiente e/o utilizzate in terapie antitumorali nella frazione della popolazione umana che possiede il polimorfismo responsivo a p53.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Abbiamo esteso l'analisi della regolazione del promotore FLT1 da parte della famiglia di fattori di trascrizione p53 e dei recettori per gli estrogeni, utilizzando diversi modelli cellulari tumorali, derivanti da osteosarcoma, carcinoma del colon, carcinoma della mammella, neuroblastoma in cui sono stati eseguiti sia saggi reporter sia analisi quantitative dell'espressione del gene FLT1. Questi modelli sperimentali ci hanno permesso di valutare meglio il possibile contributo dei fattori di trascrizione p63 e p73 nella modulazione del promotore da soli o combinati con la p53. I saggi reporter hanno confermato che solo p53 è capace di transattivare il promotore prossimale di FLT1, solo quando è presente la variante polimorfica più rara (allele "T") dello SNP presente nella popolazione umana. Abbiamo anche potuto constatare come a differenza di un promotore bersaglio canonico per p53, l'espressione ectopica della p53 stessa non sia molto efficiente nello stimolare la trascrizione del reporter FLT1; il trattamento con doxorubicina concomitante all'espressione ectopica ha mostrato un effetto cooperativo, mentre il trattamento con 5-Fluoro-Uracile (5FU), sebbene capace di attivare la p53 non ha alcun effetto sulla regolazione di FLT1. Analisi western blot e immunoprecipitazione della cromatina hanno chiarito che il mancato effetto della 5FU non è dovuto ad un'inibizione dell'espressione dei recettori per gli estrogeni o alla mancata attivazione di p53. Si è però osservato come p53 non legni il promotore in cellule trattate con 5FU, a differenza di quanto avviene a seguito di trattamento con doxorubicina, e come questo mancato legame porti al mancato reclutamento anche dei recettori per gli estrogeni. Abbiamo anche esplorato l'effetto di diversi ligandi dei recettori per gli estrogeni, e di composti chimici ad attività estrogenica, notando come il promotore FLT1 (allele T) si differenzi da un canonico promotore per i recettori per gli estrogeni nell'impatto di specifici ligandi. La peculiarità della risposta trascrizionale cooperativa (di tipo "AND") pensiamo sia riconducibile alla natura non canonica delle sequenze responsive alla p53 e i recettori per gli estrogeni: si tratta infatti di siti di legame parziale (half-sites) che isolati dal contesto non sono funzionali. Questa osservazione ci ha spinto a valutare in modo sistematico il potenziale di transattivazione di p53 verso sequenze parziali, per capire meglio le regole di ingaggio di questo fattore di trascrizione con il DNA, attraverso saggi funzionali condotti in lievito e cellule umane accoppiati ad analisi quantitative in ChIP e di legame al DNA in soluzione (con tecnologia bioplex). I risultati hanno permesso di definire meglio quali elementi sequenza/struttura sono essenziali in sequenze responsive alla p53 e quale sia il contributo di porzioni ad attività regolatrice della proteina nel modulare la specificità di interazione al DNA. Questo studio rappresenta una base razionale di dati per lo sviluppo di algoritmi per la ricerca di geni bersaglio della p53 e il riconoscimento di polimorfismi in tali sequenze che abbiano, come nel caso di FLT1, valenza funzionale. Prendendo poi ad esempio il promotore FLT1, ci siamo anche chiesti se la cooperazione trascrizionale tra p53 ed i recettori per gli estrogeni fosse generalizzabile ad altri tipi di sequenze responsive di p53 o ad altri promotori. Per esplorare questo abbiamo costruito delle modificazioni del promotore FLT1, sostituendo la sequenza responsiva nativa con una serie di sequenze bersaglio per p53 di diversa qualità. Allo stesso tempo, utilizzando un algoritmo per pattern search abbiamo identificato geni umani che contengono nel loro promotore prossimale sia la sequenza half-site per ER sia la sequenza half-site per p53, separate da non più di 250 basi. Inoltre, sulla base dell'osservazione che la sequenza bersaglio p53 in FLT1 appare conservata dal punto di vista evolutivo solo nei genomi dei primati attualmente sequenziati abbiamo valutato la conservazione funzionale di 47 sequenze bersaglio p53 umane ben caratterizzate nelle regioni regolatrici omologhe in 13 specie. Questo studio ha messo in evidenza un elevato turnover evolutivo delle sequenze responsive in geni bersaglio di p53: accanto ad alcune sequenze altamente conservate, indipendentemente dal loro relativo potenziale di transattivazione, molte altre appaiono specifiche per i primati. In particolare, le sequenze responsive a p53 presenti nell'uomo in 6 geni bersaglio coinvolti nella riparazione del DNA non sono funzionalmente conservate nel genoma di topo o ratto. Infine, la genotipizzazione del polimorfismo in FLT1 in studi caso-controllo di tumore al colon e cardiomiopatia dilatativa non ha riscontrato associazioni significative dal punto di vista statistico.

Elenco pubblicazioni:

Menendez D.-Inga A.-Jordan J.-Resnick M.

Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson.
Oncogene 26:2191/2201, 2007

Menendez D.-Inga A.-Snipe J.-Krysiak O.-Schonfelder G.-Resnick M.

A single nucleotide polymorphism in a half binding site creates p53 and estrogen receptor control of vascular endothelial growth factor receptor 1.
Mol. Cell. Biol. 27:2590/2600, 2007

Jegga A.-Inga A.-Menendez D.-Aronow B.-Resnick M.

Functional evolution of the p53 regulatory network through its target response elements.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:944/949, 2008

Jordan J.-Menendez D.-Inga A.-Nourredine M.-Bell D.-Resnick M.

Noncanonical DNA motifs as transactivation targets by wild type and mutant p53.
PLoS Genet. 7:e1000104;1/e1000104;18, 2008

Interazione funzionale tra fattori di trascrizione cardiaci e la risposta allo stress ossidativo nelle cardiomiopatie

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: a - Fattori di rischio esogeni ed endogeni e loro eventuali interazioni

Responsabile: Alberto Inga

Partecipanti: Paolo Degan

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Durata: 2006-2008

Parole chiave: cardiomiopatie; cardiotoxicità; farmaci antineoplastici; reti trascrizionali; saggi funzionali

Altri Enti coinvolti: Center of Pharmacology and Toxicology, Medical School of Hannover, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin, Hannover, Germany (J. Borlak). Consiglio Nazionale Ricerche, Ospedale G. Pasquinucci (Maria Grazia Andreassi).

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Background

Lo sviluppo del cuore è un processo molto complesso che richiede l'azione di diversi geni regolatori. Difetti nella sequenza di DNA di alcuni di questi geni, come NKX2-5, GATA4, TBX5 e HAND1 sono riconducibili allo sviluppo di malattie cardiache congenite (CHD). Le cardiopatie congenite costituiscono un gruppo di malformazioni che rappresentano la causa più importante di mortalità e morbidità nel mondo occidentale, con una prevalenza di circa 0.4%–0.8% in Europa e negli Stati Uniti. Per i geni NKX2-5 e GATA4 sta anche emergendo un ruolo importante nella modulazione delle risposte a stress in cardiomiociti adulti ed anche in altri tipi di tessuti. Ad esempio, NKX2-5 modula l'espressione di ANP, un ormone circolante di origine cardiaca che svolge un ruolo nella regolazione del volume sanguigno intravascolare ed ha funzioni anti fibrotiche ed anti-ipertrofiche sul muscolo cardiaco. Inoltre NKX2-5 regola l'espressione di un canale di membrana scambiatore sodio/iodio i cui livelli di espressione influenzano l'efficacia delle radioiodoterapie. Per le analisi funzionali di mutazioni sono stati sviluppati saggi nell'organismo modello *S. cerevisiae* ed in cellule di ratto. Analisi precedenti, anche dal nostro laboratorio, hanno dimostrato l'utilità del lievito per lo studio di fattori di trascrizione umani deputati al coordinamento dello sviluppo del muscolo cardiaco e delle loro mutazioni associate con patologie congenite. Le mutazioni che abbiamo esaminato sono state recentemente identificate direttamente su campioni di tessuto cardiaco malato, ma non erano riscontrabili in tessuto cardiaco sano degli stessi pazienti, suggerendo un'origine de novo/somatica. Per l'analisi meccanicistica della cardiotoxicità della doxorubicina si è partiti da un approccio di genomica funzionale in ratti trattati con varie dosi di questo importante chemioterapico cui sono seguite analisi computazionali e saggi funzionali in sistemi modello.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il progetto si è prefisso di studiare mutazioni in fattori di trascrizione cardiaci che sono state trovate in pazienti con CHD, in particolare ipoplasia del ventricolo sinistro e difetti nella formazione del setto interatriale ed interventricolare. Si sono anche eseguiti esperimenti per cercare di comprendere meglio i meccanismi di cardiotoxicità del farmaco chemioterapico doxorubicina.

Beneficiari

Lo studio ha permesso di identificare in ABL1 un possibile importante mediatore della risposta al trattamento con doxorubicina in tessuto cardiaco ed in hnRNP-k un modulatore dell'effetto di ABL1. Questo dato potrà portare alla valutazione di strategie di intervento sulla funzionalità di ABL1/hn-RNP-k in pazienti trattati con questo importante chemioterapico.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Abbiamo sviluppato un saggio funzionale per il fattore di trascrizione bHLH HAND1 nell'organismo eucariotico modello *S. cerevisiae* che è stato utilizzato per l'analisi di diverse forme mutanti di questo fattore di trascrizione trovate in associazione a particolari tipi di malformazione congenita del muscolo cardiaco. Inizialmente ci siamo soffermati all'analisi di una mutazione di tipo frameshift (A126fs) riscontrata in pazienti affetti da ipoplasia del ventricolo sinistro. La mutazione è stata clonata in vettori di espressione e si è potuto constatare la sua incapacità di reprimere l'attività intrinseca dei cofattori E12 ed E47 in geni reporter contenenti la sequenza responsiva E-box. La proteina mutante si è inoltre rivelata non funzionale nello stimolare la trascrizione in associazione con E12/E47 del reporter contenente una D-box. Sono state anche condotte analisi di espressione proteica e del messaggero, per verificare i livelli costitutivi di espressione della forma mutata rispetto alla forma selvatica di HAND1. Successivamente sono state studiate 10 mutazioni di tipo missense a carico del dominio bHLH di HAND1 e due delezioni aminoterminali. Mutazioni del primo gruppo sono state trovate a bassa frequenza in pazienti con difetti nella formazione del setto inter-atriale e/o interventricolare. Le delezioni amino terminali sono state costruite per verificare nel nostro saggio la possibilità di misurare la presenza di un dominio di repressione della trascrizione, osservazione di letteratura confermata dalla nostra analisi. I mutanti missenso, a differenza della mutazione frameshift, hanno tutti, seppur in maniera variabile, mostrato una certa capacità di inibire E12/E47 sulla E-box, mentre per quanto riguarda la transattivazione del reporter D-box, alcuni mutanti si sono rivelati "complete loss-of-function" mentre altri hanno mantenuto una funzione parziale sebbene tutti abbiamo mostrato un difetto funzionale rispetto a HAND1 wild type. Infine, allo scopo di studiare l'attività di HAND1 di agire da cofattore per il fattore di trascrizione MEF2C, recentemente dimostrata in letteratura, abbiamo costruito un vettore di espressione costitutivo per MEF2C selvatico e ceppi reporter contenenti sequenze responsive a MEF2C derivate dal promotore del gene ANF (Reamon-Buettner et al, submitted). Per quanto riguarda il fattore di trascrizione NKX2-5 sono state studiate due mutazioni germinali associate a difetti nella formazione del setto inter-atriale ed interventricolare, applicando il saggio funzionale sviluppato in precedenza (Inga et al HMG 2005). Abbiamo anche sviluppato un saggio reporter in cellule superiori per confermare le analisi eseguite nel sistema modello. Saggi funzionali in cellule superiori sono stati anche alla base della valutazione di ABL1, una proteina ad attività tirosin chinasi, di tipo non recettoriale, che ha anche capacità di legame al DNA, come mediatore delle risposte di cardiomiociti al trattamento con doxorubicina. Il trattamento di ratti con dosi farmacologiche di questo chemioterapico ha messo in evidenza un forte tossicità a carico di diversi organi, inclusi il fegato, la milza ed il cuore. Analisi con array di espressione condotte su tessuto cardiaco hanno identificato geni differenzialmente espressi in risposta al trattamento. Analisi bioinformatiche condotte sui promotori di questi geni differenzialmente modulati ha evidenziato un

Consuntivo progetti RC 2006-2008

arricchimento per presunti siti di legame per ABL1. Il potenziale di legame di ABL1 a questi siti è stato valutato con EMSA assays. La proteina hnRNP-k è stata trovata associata con ABL1 come parte di complessi proteici legati alle sequenze promotrici esaminate attraverso analisi di spettrometria di massa. Il potenziale ruolo di ABL1 e hnRNP-k nel modulare la risposta alla doxorubicina è stato valutato con una combinazione di saggi funzionali in lievito ed in cellule umane (MCF7 e SaOS2). In particolare abbiamo riscontrato interazione funzionale tra ABL1 e hnRNP-k nel promuovere la trascrizione p53- e p73-dipendente di specifici geni reporters (Zemlin, Ciribilli et al, A genome wide approach identifies molecular rules of doxorubicin-induced cardiomyopathy – submitted to PLoS Genetics).

Elenco pubblicazioni:

Reamon Buettner S.-Ciribilli Y.-Inga A.-Borlak J.
A loss of function mutation in the binding domain of HAND1 predicts hypoplasia of the human hearts.
Hum. Mol. Genet. 17:1397/1405, 2008

Valutazione di nuovi agenti antineoplastici

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: a - Fattori di rischio esogeni ed endogeni e loro eventuali interazioni

Responsabile: Gilberto Fronza

Partecipanti: Paola Menichini, Alberto Inga

Durata: 2006-2008

Parole chiave: agenti antineoplastici/alchilanti; 3-metiladenina; letalità; mutagenicità; saggio in lievito

Altre strutture IST: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (L. Ottaggio)

Altri Enti coinvolti: Department of Pharmaceutical Sciences, University of Pittsburgh, U.S.A. (B. Gold)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: NIH

Background

Uno degli effetti indesiderati degli agenti alchilanti attualmente usati in terapia antineoplastica è l'induzione di neoplasie secondarie, molto probabilmente causate dall'azione mutagena di alcune lesioni al DNA indotte dagli stessi agenti. Gli agenti alchilanti in uso nella chemioterapia convenzionale sono in grado di indurre un elevato numero di diversi tipi di lesioni al DNA (e.g., O6-alchilguanina, N7-alchilguanina, N3-alchiladenina etc.). Questo complica non poco la comprensione del ruolo biologico di ogni singolo tipo di lesione al DNA. Allo scopo di modulare/condizionare l'induzione di specifiche lesioni al DNA, il Prof. Gold (Pittsburgh University, USA) ha sintetizzato nuovi agenti alchilanti che sono in grado di indurre quasi esclusivamente un solo tipo di lesione. Nell'ambito di questo progetto stiamo studiando uno specifico induttore di 3-metiladenina (3-MeA) in sequenze ricche in A/T, la Me-lex. Sembra che la 3-MeA sia una lesione potenzialmente letale e scarsamente premutagena. L'interesse per questo tipo di studi è lo sviluppo di nuovi agenti alchilanti, in questo caso un agente metilante, che induce quasi esclusivamente la 3-MeA. Questo progetto è attualmente sostenuto da finanziamenti dell'NIH. Siamo stati inseriti nella richiesta di rinnovo quinquennale (già presentato).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale: Utilizzare questi nuovi agenti alchilanti (il cui prototipo è la Me-lex) per capire quali sono i determinanti cellulari che condizionano la citotossicità e la mutagenicità di specifiche lesioni (e.g. 3-Metil-Adenina). Lo scopo ultimo è quello di verificare in che condizioni l'utilizzo di tali molecole può avere il più alto indice terapeutico: Questo obiettivo passa attraverso diverse fasi: (1) Valutare la mutagenicità e la letalità di nuovi agenti alchilanti, specifici induttori di particolari lesioni al DNA in sistemi sperimentali semplici (saggi in vitro, saggi in vivo in lievito e in linee cellulari). (2) Capire quali difetti nei sistemi di riparazione e/o di replicazione del DNA importanti per la fissazione delle mutazioni possano influire su questi end-points biologici.

Beneficiari

A medio/lungo termine: possibili ricadute sul disegno di nuovi agenti antineoplastici e sull'utilizzo degli stessi in condizioni di terapia personalizzata (e.g. in tumori ove specifici pathway di riparazione sono inattivati).

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Da studi svolti in collaborazione col il Prof. Gold, nell'ambito del progetto "DNA damage: roles in toxicity and mutagenicity" finanziato dall'NIH, si è evidenziato che gli effetti biologici della Me-lex, specifico induttore di 3-MeA in sequenze ricche in AT, possono essere ricondotti a due lesioni al DNA: la 3MeA, lesione preferenzialmente citotossica, e il sito Abasico (o sito AP) che è citotossico ma soprattutto mutagenico (derivato dalla stessa 3MeA per idrolisi spontanea fortemente accelerata -40X- quando la lesione è presente in un DNA a singolo filamento (come ad esempio una forca replicativa). La tossicità e la mutagenicità delle lesioni indotte da Me-lex sono fortemente influenzate dalle

Consuntivo progetti RC 2006-2008

capacità di riparazione del DNA: in assenza di capacità riparative specifiche coinvolte nel processo di riparazione della 3MeA (Base excision repair, 3-metiladenina-DNA-glicosilasi-codificato dal gene MAG1, AP-endonucleasi, codificate dai geni APN1, APN2) le lesioni indotte da Me-lex sono più citotossiche e più mutagene. Allo scopo di valutare il ruolo di alcune delle DNA polimerasi coinvolte nel processo di fissazione delle mutazioni abbiamo utilizzato un saggio in lievito avente come target il cDNA della p53 umana. E' stato valutato il coinvolgimento della polimerasi REV3 e REV1 nella mutagenicità e nella citotossicità della molecola Me-lex eliminando i geni corrispondenti in contesti genetici diversi [selvatico, base excision repair deficient, nucleotide excision repair deficient, rispettivamente WT vs delta rev3 (o delta rev1); deltamag1vs deltamag1rev3 (o deltamag1rev1), delta apn1apn2 vs delta apn1apn2rev3 (o delta apn1apn2rev1)]. Abbiamo osservato che la delezione di ognuno di questi geni induce una maggior citotossicità e una minor mutagenicità delle lesioni indotte da Me-lex in tutti i background studiati. L'entità dell'effetto osservato però suggeriva che il processo di fissazione delle mutazioni indotte da Me-lex sia ridondante e che altre polimerasi (oltre a polzeta e Rev1) possano essere coinvolte. A questo scopo abbiamo completato il lavoro studiando il ruolo di Pol eta, terza ed ultima polimerasi translesione in lievito [va ricordato che nell'uomo la carenza di Pol eta porta ad una sindrome come Xeroderma Pigmentosum-Variant (XPV)]. Si è verificato che anche Pol eta è coinvolta nel processamento di lesioni indotte da Me-lex ma, a differenza di Polzeta e Rev1, Pol eta, sembra essere coinvolta nel loro bypass error prone. Questi studi, effettuati in vivo, in un sistema modello vanno in parallelo con studi effettuati dal Prof Gold in vitro (vedi sotto).

Per studiare la potenzialità mutagena e citotossica della Me-Lex in cellule eucariotiche superiori, abbiamo applicato il test di mutazione al locus HPRT in fibroblasti di hamster cinese (CHO), proficienti e deficienti nei pathways di riparazione del DNA. I risultati ottenuti indicano che le cellule CHO proficienti nella riparazione del DNA presentano una scarsa mutabilità anche se sottoposte ad alte dosi di Me-Lex. Questi dati sono in accordo con i dati di mutagenicità ottenuti in lievito. Per effettuare l'analisi molecolare delle mutazioni abbiamo isolato e caratterizzato, attraverso l'isolamento dell'mRNA, e il sequenziamento dei cDNA corrispondenti, 30 cloni HPRT⁻ indotti da Me-lex e numerosi altri cloni cloni HPRT⁻ insorti spontaneamente al fine di confrontare lo spettro di mutazione indotto da Me-Lex con quello spontaneo. L'analisi molecolare dei mutanti ha evidenziato che: a) la maggioranza delle mutazioni indotte da Me-lex è rappresentata da grosse delezioni (un tipo di mutazione, poco apprezzabile nel saggio di lievito precedentemente utilizzato); b) le mutazioni puntiformi indotte (singole sostituzioni di basi) coinvolgono prevalentemente coppie AT, in sequenze AT ricche, caratteristiche queste perfettamente compatibili con le caratteristiche chimiche di questo nuovo agente antineoplastico (Russo et al., Manuscript in preparation). E' in corso di definizione lo spettro di mutazione indotto da Me-Lex al locus HPRT in una linea cellulare di hamster cinese, EMC-11, mancante del gene xrcc1 e quindi incapace di effettuare correttamente il "Base Excision Repair" (ovvero la rimozione delle lesioni indotte da Me-Lex). I risultati preliminari suggeriscono che questa linea cellulare è più sensibile della linea parentale, ma la sua mutabilità in seguito al trattamento con Me-lex è paragonabile a quella della linea proficiente nella riparazione. Tuttavia gli spettri di mutazione delle due linee differiscono in modo significativo, suggerendo un ruolo della proteina xrcc1 nel processamento delle lesioni indotte da Me-lex.

Elenco pubblicazioni:

Boffa L.-Menichini P.-Bolognesi C.-Cutrona G.-Roncella S.-Damonte G.-Millo E.-Mariani M.-Matis S.-Russo D.-Ciliutti P.-Ferrarini M.

Lack of mutagenicity and clastogenicity of PNAEmu/NLS targeted to a regulatory sequence of the translocated c/myc oncogene in Burkitt's Lymphoma.

Mutat. Res. Gen. Tox. En. 628:129/137, 2007

Monti P.-Ciribilli Y.-Russo D.-Bisio A.-Perfumo C.-Andreotti V.-Menichini P.-Inga A.-Huang X.-Gold B.-Fronza G.

Rev1 and Polzeta influence toxicity and mutagenicity of Me/lex, a sequence selective N3/adenine methylating agent. DNA Repair (Amst) 7:431/438, 2008

Settles S.-Ganguly M.-Wang R.W.-Fronza G.-Marky L.-Gold B.

Effect of N3-Methyladenine and Related Stable Analogues on DNA Polymerization Submitted

Monti P.-Traverso I.-Menichini P.-Inga A.-Ottaggio L.-Russo D.-Gold B.-Fronza G.

Poleta influences toxicity and mutagenicity of Me-lex, a sequence selective N3-adenine methylating agent. In preparation

Russo D.-Menichini P.-Monti P.-Ottaggio L.-Inga A.-Gold B.-Fronza G.

Molecular analysis of Me-lex induced *hprt* mutations in a Chinese Hamster Ovary cell line CHO9. In preparation

Caratterizzazione metabolica, funzionale e strutturale in linee cellulari normali, tumorali e da pazienti affetti da patologie con difetti nel metabolismo redox, costitutivi o indotti

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: b - Biomarcatori biologici e molecolari di esposizione, di danno al DNA e di rischio di cancro

Responsabile: Paolo Degan

Partecipanti: Laura Ottaggio, Guido Frosina, Silvia Viaggi

Durata: 2006-2008

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Parole chiave: stress ossidativi; cancerogenesi; malattie congenite; metabolismo energetico; microgravità; invecchiamento; malattie neurodegenerative

Altre strutture IST: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica

Altri Enti coinvolti: ISS, Roma (M. Bignami, J. Dogliotti); CNR, Pavia (M. Stefanini); AIRFA, Associazione Italiana Ricerca Anemia di Fanconi, Napoli (G. Pagano); Università di Sassari (P. Pippia); Università di Udine (S. Ambesi); Università La Sapienza, Roma (E. Piccolella); ENEA, La Casaccia, Roma (R. Amendola); Università di Genova (M. Miele);

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Agenzia Spaziale Italiana (ASI)

Background

Stress e danno ossidativo sono concetti utilizzati come generalizzazioni nella definizione di stati sintomatici ed eziologici in molti processi patologici al punto tale che è difficile associarne rilevanza e definizione molecolare. D'altra parte le crescenti conoscenze nell'ambito della regolazione molecolare e biochimica dei processi fisiologici hanno recentemente permesso di associare specifici marker e alterazioni fisiologiche ad eventi molecolari alla base di specifiche alterazioni del metabolismo ossidativo. Sebbene stress ossidativo e danno cellulare, tissutale e sistemico ad esso conseguenti siano osservati in una grande varietà di processi patologici, ed anche, perseguano analoghi percorsi di alterazione fisiologica, lo sbilancio redox è associabile ad una alterazione specifica nella cascata di eventi che controllano una determinata funzione. Tale associazione può essere importante nella definizione della patologia in atto. A questo punto la definizione dello stato red-ox può essere utile nella definizione di uno stato patologico e di aiuto nella definizione diagnostica e prognostica in molte patologie come anche nella definizione di specifici trattamenti terapeutici.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'equilibrio redox intracellulare è un importante meccanismo di regolazione. Nel nostro laboratorio ci occupiamo delle conseguenze biochimiche di uno stress ossidativo sia nella induzione di danni a carico del DNA che per le alterazioni indotte al metabolismo energetico e cellulare. In esperimenti in vitro le cellule in coltura vengono soggette a differenti stress di natura chimica, fisica. Recentemente abbiamo introdotto la microgravità come strumento di studio di specifici processi degenerativi correlati all'invecchiamento ed alla deplezione energetica. L'intero processo di manipolazione di un danno al DNA (induzione, fissazione e rimozione) può concorrere nella formazione di fenotipi e genotipi cellulari alterati ed il nostro laboratorio è coinvolto nello studio di difetti a tutti i livelli in questo processo. In questi studi stiamo utilizzando come sistemi modello linee cellulari normali e derivanti da patologie caratterizzate da specifiche disfunzioni metaboliche e linee di derivazione tumorale. Attraverso le numerose collaborazioni attive in questa linea di ricerca vengono eseguite analisi da campioni e biopsie da animali di laboratorio e pazienti affetti da specifiche patologie.

Beneficiari

Enti di ricerca, Università, laboratori interessati nella definizione di un rischio di metabolismo red-ox alterato, agenzie di controllo ambientale, industrie farmaceutiche.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Nel corso del 2008 sono stati portati a termine sezioni specifiche di questo progetto rintracciabili in lavori editi nel corso dell'anno. Specificamente si vogliono riassumere i seguenti punti: 1 – si è resa evidente la possibilità di scrivere un lavoro di review dedicato alla analisi dei risultati conseguiti nel corso degli ultimi cinque anni di attività sul tema dello studio del bilancio redox campioni da sangue di pazienti affetti da patologie genetiche associabili a processi cancerogeni e degenerativi, incluso l'invecchiamento. Le patologie esaminate sono la Atassia Telangiectasia, la anemia di Fanconi, la sindrome di Bloom, quella di Down e quella di Werner e lo Xeroderma Pigmentoso. 2 – sono stati portati a conclusione studi che definiscono una relazione specifica nella degenerazione neurologica a carico del tessuto striato nella malattia di Huntington con un aumento di 8-OHdG nel DNA. Inoltre, in un sistema di topo transgenico modello associato a questo studio è stato reso evidente come la overespressione di MTH, enzima responsabile di attività 8-OHdGTPasica, sia protettivo nelle condizione di uno stato patologico indotto da trattamento con acido 3-nitropropionico e da paraquat. 3 – un altro studio, in ratti, ha portato alla definizione di una relazione significativa tra esposizione a fumo di sigaretta e danni specifici a cuore e aorta. 4 – nel contesto di sistemi modello in colture cellulari è stata dimostrata, nell'ambito della instabilità genomica, come modello di de regolazione pro-cancerogenica, la sovra espressione di hNOX1, in cellule Hela e MEF, associabile ad un aumento di 8-OHdG nel DNA estratto dalle cellule in coltura. Uno stress ossidativo cronico ottenuto mediante over-espressione delle attività correlate a NOX1 in un fenotipo mancante della espressione del gene msh2 contribuisce alla saturazione di attività di riparazione del DNA, in contesti difettivi di mismatch repair, contribuendo ad una elevata instabilità genomica.

Elenco pubblicazioni:

Bestoso F.-Ottaggio L.-Armirotti A.-Balbi A.-Damonte G.-Degan P.-Mazzei M.-Cavalli F.-Ledda B.-Miele M.
In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes.
BMC Biotechnol. 6:45;1/45;11, 2006

Blasi M.-Ventura I.-Aquilina G.-Degan P.-Bertario L.-Bassi C.-Radice P.-Bignami M.
A human cell based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene.
Cancer Res. 66:9036/9044, 2006

Consuntivo progetti RC 2006-2008

D'errico M.-Parlanti E.-Teson M.-De Jesus B.-Degan P.-Calcagnile A.-Jaruga P.-Bjoras M.-Crescenzi M.-Pedrini A.-Egly J.-Zambruno G.-Stefanini M.-Dizdaroglu M.-Dogliotti E.
New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage.
EMBO J. 25:4305/4315, 2006

Pallardo' F.-Degan P.-D'ischia M.-Kelly F.-Zatterale A.-Calzone R.-Castello G.-Fernandez R.-Dunster C.-Lloret A.-Manini P.-Pisanti M.-Vuttariello E.-Pagano G.
Multiple evidence for an early age pro oxidant state in Down syndrome patients.
Biogerontology 7:211/220, 2006

Ropolo M.-Geroldi A.-Degan P.-Andreotti V.-Zupo S.-Poggi A.-Reed A.-Kelley M.-Frosina G.
Accelerated repair and reduced mutagenicity of oxidative DNA damage in human bladder cells expressing the E. coli FPG protein.
Int. J. Cancer 118:1628/1634, 2006

Bianchi M.-Bellini A.-Cervelli M.-Degan P.-Mancocci L.-Martini F.-Scatteia M.-Mariottini P.-Amendola R.
Chronic sub lethal oxidative stress by spermine oxidase overactivity induces continuous DNA repair and hypersensitivity to radiation exposure.
Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1773:774/783, 2007

Degan P.-D'ischia M.-Pallardo' F.-Zatterale A.-Brusco A.-Calzone R.-Cavalieri S.-Kavakli K.-Lloret A.-Manini P.-Pisanti M.-Vuttariello E.-Pagano G.
Glutathione levels in blood from ataxia telangiectasia patients suggest in vivo adaptive mechanisms to oxidative stress.
Clin. Biochem. 40:666/670, 2007

D'errico M.-Parlanti E.-Teson M.-Degan P.-Lemma T.-Calcagnile A.-Iavarone I.-Jaruga P.-Ropolo M.-Pedrini A.-Orioli D.-Frosina G.-Zambruno G.-Dizdaroglu M.-Stefanini M.-Dogliotti E.
The role of CSA in the response to oxidative DNA damage in human cells.
Oncogene 26:4336/4343, 2007

Monticone M.-Tonachini L.-Tavella S.-Degan P.-Biticchi R.-Palombi F.-Puglisi R.-Boitani C.-Cancedda R.-Castagnola P.
Impaired expression of genes coding for reactive oxygen species scavenging enzymes in testes of Mtr1/Chppr deficient mice.
Reproduction 134:483/492, 2007

Narciso L.-Fortini P.-Pajalunga D.-Franchitto A.-Liu P.-Degan P.-Frechet M.-Demple B.-Crescenzi M.-Dogliotti E.
Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:17010/17015, 2007

Ropolo M.-Degan P.-Foresta M.-D'errico M.-Lasiglie' D.-Dogliotti E.-Casartelli G.-Zupo S.-Poggi A.-Frosina G.
Complementation of the oxidatively damaged DNA repair defect in Cockayne syndrome A and B cells by Escherichia coli formamidopyrimidine DNA glycosylase.
Free Radic. Biol. Med. 42:1807/1817, 2007

Russo M.-De Luca G.-Degan P.-Bignami M.
Different DNA repair strategies to combat the threat from 8/oxoguanine.
Mutat. Res. Fund. Mol. M. 614:69/76, 2007

Zatterale A.-Kelly F.-Degan P.-D'ischia M.-Pallardo' F.-Calzone R.-Dunster C.-Lloret A.-Manini P.-Cogulu O.-Kavakli K.-Pagano G.
Oxidative stress biomarkers in four Bloom syndrome (BS) patient and in their parents suggest in vivo redox abnormalities in BS phenotype.
Clin. Biochem. 40:1100/1103, 2007

De Luca G.-Russo MT.-Degan P.-Tiveron C.-Zijno A.-Mattei E.-Nakabeppu Y.-Crescenzi M.-Pèzzola A.-Popoli P.-Bignami M.
A role for oxidized DNA precursors in Huntington disease-like striatal neurodegeneration.
PloSGenetics 4:e1000226, 2008

Izzotti A.-D'agostini F.-Balansky R.-Degan P.-Pennisi T.-Steele V.-De Flora S.
Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA alterations in heart and aorta.
Mutat. Res. Fund. Mol. M. 644:38/42, 2008

Chiera F.-Meccia E.-Degan P.-Aquilina G.-Pietraforte D.-Minetti M.-Lambeth D.-Bignami M.
Overexpression of human NOX1 complex induces genome instability in mammalian cells.
Free Radic. Biol. Med. 44:332/342, 2008

Lloret A.-Calzone R.-Dunster C.-Manini P.-D'ischia M.-Degan P.-Kelly F.-Pallardo' F.-Zatterale A.-Pagano G.
Different patterns of in vivo pro oxidant states in a set of cancer or aging related genetic diseases.
Free Radic. Biol. Med. 44:495/503, 2008

Capitoli di libro:

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Pagano G.-Degan P.-Castello G.
Ataxia Telangiectasia: An Oxidative Stress-Related Disease.
In Molecular Mechanisms of Ataxia Telangiectasia, edited by Shamim I.
Ahmad. Landes Bioscience, 2008

Caratterizzazione delle proprietà funzionali di mutanti o di varianti polimorfiche della proteina p53

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica (proto-oncogeni, geni oncosoppressori, meccanismi di instabilità genomica, virus oncogeni)

Responsabile: Gilberto Fronza

Partecipanti: Paola Menichini, Alberto Inga

Durata: 2006-2008

Parole chiave: proteine p53 mutate; caratterizzazione funzionale; saggio in lievito; immuno-precipitazione della cromatina; polimorfismi

Altre strutture IST: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (L. Ottaggio); S.S. Prevenzione Secondaria e Screening (L. Bonelli); S.S. Centro Tumori Ereditari (L. Varesco); S.S. Oncologia Traslazionale Pediatrica (G.P. Tonini)

Altri Enti coinvolti: National Institute of Environmental Health Sciences, RTP, NC, USA (M.A. Resnick); IARC, Lyon, France (P. Hainaut), Istituto G. Gaslini (V. Capra, M.L. Garrè)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: AIRC; MIUR FIRB; Alleanza contro il Cancro

Background

Il controllo della stabilità genomica operato dalla proteina p53 richiede la regolazione trascrizionale di un elevato numero di geni effettori. L'inattivazione di tale controllo, principalmente mediante mutazioni missenso, è fortemente selezionato nella maggioranza dei tumori di ogni tipo e grado. p53 è principalmente un fattore di trascrizione inducibile da stress di origine diversa (lesioni al DNA, ipossia, segnali iperproliferativi). Essa interagisce con specifici elementi p53 responsivi presenti nelle zone regolatrici di geni pro-apoptotici (bax, PIG3, p53AIP1), geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare in seguito al danno al DNA (p21, Gadd45), o coinvolti nella stabilizzazione/degradazione di p53 (Mdm2). La sequenza consenso di tali elementi responsivi è altamente degenerata (5'-RRRCWWGYYY-3'). Recentemente è stato osservato come mutanti p53 siano strutturalmente e funzionalmente eterogenei. Alcuni di essi mostrano la perdita selettiva della capacità di transattivare alcuni geni effettori ma non altri. Alcune proteine p53 mutanti possono addirittura attivare particolari geni non attivati dalla proteina selvatica, legarsi a sequenze di DNA non riconosciute dalla proteina selvatica, interagire con proteine cellulari a cui la proteina selvatica non si lega. Pensiamo che sapere quali funzioni siano compromesse e quali mantenute in mutanti p53 sia di fondamentale importanza per capire il loro ruolo nello specifico processo cancerogenetico e porre le basi per una terapia personalizzata che tenga conto dello status di p53 nel tumore di un paziente.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Gli obiettivi della ricerca sono stati:

- La caratterizzazione funzionale di mutanti p53 mediante una serie di saggi funzionali nel lievito *S. Cerevisiae* (determinazione della capacità transattivante su diversi ceppi reporter aventi il gene ADE2 sotto il controllo di elementi p53 responsivi presenti nelle regioni regolatrici di geni effettori di p53; analisi delle capacità trascrizionali in funzione della temperatura; determinazione dell'abilità dei mutanti di abrogare le funzioni della proteina selvatica, es. dominanza).
- Lo studio dell'attività transattivante dei mutanti p53 e l'induzione dei processi apoptotici in linee cellulari tumorali umane (esprimenti p53 endogene, o esprimenti p53 ectopicamente). Questa analisi ha permesso di chiarire il ruolo di diversi alleli mutati della p53 nell'attivazione di geni effettori importanti per la risposta ad agenti chemioterapici.
- Verificare se la caratterizzazione funzionale dei mutanti di p53 (di origine germinale o somatica) permette di predire l'out-come clinico dei pazienti.
- Verificare se varianti polimorfiche di geni appartenenti al pathway di p53 sono importanti per la suscettibilità allo sviluppo di tumori.

Beneficiari

A medio e lungo termine la possibilità di ricadute sulla terapia personalizzata. Pensiamo infatti che sapere quali funzioni siano compromesse e quali mantenute in mutanti p53 sia di fondamentale importanza per capire il loro ruolo nello specifico processo cancerogenetico e porre le basi per una terapia personalizzata che tenga conto dello status di p53 nel tumore di un paziente.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

- La funzionalità trascrizionale dei mutanti p53 germinali influenza il fenotipo clinico in LFS. Mutazioni Germinali di TP53 risultano in una elevata suscettibilità allo sviluppo di tumori ma le espressioni cliniche sono molto eterogenee. Gli alleli p53 mutanti sono stati classificati in parzialmente deficienti (PD) o severamente deficienti (SD) a seconda della loro capacità trascrizionale misurata con saggi funzionali in lievito. Abbiamo trovato che gli alleli PD sono associati con a) storie cliniche familiari più blande ($p=0.007$), b) un numero inferiore di pazienti con tumori multipli ($p=0.007$) e un ritardato esordio di tumori (31yrs vs 15yrs, $p=0.007$), fatto quest'ultimo che potrebbe essere in relazione con il diverso spettro di tumori osservato nelle due classi funzionali di alleli. Questi risultati hanno stabilito correlazioni significative tra attività funzionali di mutanti P53 e parametri clinici di pazienti che hanno ereditato alleli specifici e sviluppato tumori. Interessante sottolineare che nell'ambito di uno studio condotto in collaborazione con l'Istituto Gaslini di Genova, i dati funzionali che abbiamo ottenuto su un allele germinale e le caratteristiche cliniche di individui appartenenti ad una vasta famiglia LFS dalla quale è stato isolato sono consistenti con quanto sopra descritto.

- L'attività transattivante di proteine p53 mutanti espresse a livello endogeno in linee cellulari tumorali è stata determinata attraverso la tecnica della ChIP-PCR e RT-PCR. Abbiamo confermato che in alcune linee cellulari di NSCLC la proteina p53 mutata è incapace di legare i promotori di alcuni geni bersaglio importanti nei processi apoptotici. Tuttavia, la loro capacità apoptotica in seguito a trattamento con adrimicina e UV, non è completamente abrogata. Utilizzando diversi marcatori di apoptosi ("cleavage" di PARP, % di cellule in fase sub-G1 e DNA-laddering) abbiamo osservato che, mentre la linea A549 (p53 WT) è in grado di andare in apoptosi, le due linee cellulari che esprimono una p53 mutata, la LX1 (R273H) e la SKMes1 (R280K), differiscono nella loro capacità apoptotica. Infatti, nonostante entrambe le proteine p53 non siano in grado di legarsi alle sequenze responsive dei geni target pro-apoptotici (e.g. bax, puma e aip1) la linea LX1 presenta segnali di apoptosi in seguito a stress genotossici, completamente assenti nella linea SKMes1.

- Polimorfismi nei geni del pathway di p53 e suscettibilità allo sviluppare diversi tipi di tumori

a) Abbiamo voluto valutare due polimorfismi funzionali di p53 (Arg72Pro and PIN3) come alleli di suscettibilità sia per lo sviluppo di tumori del colon retto che degli adenomi. A questo scopo l'aplotipo PIN3-Arg72Pro è stato determinato in 184 pazienti e 188 controlli. Si è osservato un significativo rischio di sviluppare adenomi in pazienti portatori dell'aplotipo PIN3 A2-Pro72 ($p=0.01$). In contrasto i portatori dell'aplotipo PIN3 A1-Pro72 ($p=0.006$) mostravano un aumentato rischio di sviluppare adenocarcinomi coloretali. Questa osservazione suggerisce che gli aplotipi possano influenzare funzioni di p53 in differenti percorsi della cancerogenesi coloretale.

b) Visto che nel neuroblastoma (NB) l'incidenza di mutazioni p53 è bassissima, ci siamo chiesti se il polimorfismo SNP309 (T->G) presente nel promotore di MDM2 (principale regolatore negativo di p53) associato con maggior espressione di MDM2, potesse influenzare l'evoluzione/risposta nei NB di stadio 4. A tal fine abbiamo genotipizzato il DNA proveniente da 142 pazienti con NB di stadio 4. Abbiamo osservato come i pazienti con genotipo GG presentassero una peggior sopravvivenza sia in termini globali che dopo recidiva. La mancata associazione tra SNP309 e status di MYCN potrebbe indicare che questo polimorfismo potrebbe essere un nuovo fattore prognostico indipendente per gli NB di stadio 4.

- Proprietà trascrizionali della p53 di gatto e dei suoi mutanti tumore associati.

I gatti potrebbero essere dei buoni animali sentinella per l'esposizione ad agenti cancerogeni ambientali. Nell'ambito di una collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico si è sviluppato un saggio funzionale in lievito in grado di misurare l'attività trascrizionale della p53 felina (WT o mutata). Si è osservato che l'attività trascrizionale della proteina felina è molto simile a quella umana e che il suo cDNA è ugualmente suscettibile a mutazioni inattivanti.

Elenco pubblicazioni:

Perfumo C.-Bonelli L.-Menichini P.-Inga A.-Gismondi V.-Ciferri E.-Percivale P.L.-Bianchi G.-Nasti S.-Fronza G.-Varesco L.

Increased risk of colorectal adenomas in italian subjects carrying the p53 PIN3 A2/Pro72 haplotype. *Digestion* 74:228/235, 2006

Cardellino U.-Ciribilli Y.-Andreotti V.-Modesto P.-Menichini P.-Fronza G.-Pellegrino C.-Inga A.

Transcriptional properties of feline p53 and its tumour associated mutants: a yeast based approach. *Mutagenesis* 22:417/423, 2007

Magrini R.-Russo D.-Fronza G.-Inga A.-Menichini P.

The kinetics of p53 binding and histone acetylation at target promoters do not strictly correlate with gene expression after UV damage.

J. Cell. Biochem. 100:1276/1287, 2007

Monti P.-Ciribilli Y.-Jordan J.-Menichini P.-Umbach D.-Resnick M.-Luzzatto L.-Inga A.-Fronza G.

Transcriptional functionality of Germ line p53 mutants influences cancer phenotype. *Clin. Cancer Res.* 13:3789/3795, 2007

Capra V.-Consales A.-Nozza P.-Monti P.-Inga A.-Fronza G.

Identification of a novel TP53 germline mutation in a large italian Li Fraumeni syndrome family. *Letter. Pediatr. Blood Cancer Epub* Oct 20, 2008

Perfumo C.-Parodi St.-Mazzocco K.-Defferrari R.-Inga A.-Haupt R.-Fronza G.-Tonini G.P.

Impact of MDM2 SNP309 genotype on progression and survival of stage 4 neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* 44:2634/2639, 2008

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Riparazione del DNA

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica (proto-oncogeni, geni oncosoppressori, meccanismi di instabilità genomica, virus oncogeni)

Responsabile: Guido Frosina

Partecipanti: Gianluigi Casartelli, Paolo Degan

Durata: 2006-2008

Parole chiave: danno ossidativo; profilassi; antimutagenesi; sindrome di Cockayne; cellule staminali tumorali

Altre strutture IST: S.C. Immunologia (A. Poggi); S.S. Malattie Linfoproliferative (S. Zupo); S.C. Trasferimento Genico (A. Daga, G. Corte)

Altri Enti coinvolti: Indiana University Medical School, Dept. of Pediatrics and Biochemistry and Molecular Biology, Indianapolis, IN, USA (M.R. Kelley); Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio Epidemiologia Molecolare, Roma (E. Dogliotti)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Compagnia San Paolo; MIUR FIRB; Istituto Superiore di Sanità

Background

La Riparazione del DNA è bifronte: da un lato protegge le cellule dal danno al DNA sia di origine interna (ad es. danno ossidativo) che esterna (danno da inquinanti ambientali o radiazioni), avendo quindi un'importante funzione antimutagena e anticancerogena. Vi sono sindromi umane (Xeroderma Pigmentosum, Sindrome di Lynch, Sindrome di Cockayne, Tricotiodistrofia) dovute proprio a difetto in quest'azione protettiva, caratterizzate da aumentata incidenza di cancro o sviluppo rallentato. Dall'altro la Riparazione del DNA provoca resistenza all'azione antineoplastica di vari agenti chemioterapici, rimuovendo le lesioni citotossiche e causando perdita di efficacia terapeutica. Nel triennio 2006-2008, abbiamo definito procedure per aumentare l'efficienza della riparazione del DNA (in particolare del danno ossidativo) in cellule umane normali e di pazienti affetti da Sindrome di Cockayne. Abbiamo anche iniziato studi sul ruolo della Riparazione del DNA nella resistenza di cellule staminali di glioblastoma multiforme alla radio e chemioterapia.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale:

Proteggere le cellule umane di individui normali o con specifiche patologie (es. Sindrome di Cockayne; pazienti a rischio di tumore polmonare) dal danno ossidativo.

Obiettivi secondari:

- Identificare attività riparative eterologhe (di altri organismi) la cui espressione acceleri e renda più efficace la riparazione del danno ossidativo al DNA in cellule umane normali e le protegga dalla mutagenesi ossidativa.
- Caratterizzare il deficit riparativo nella Sindrome di Cockayne.
- Identificare attività riparative eterologhe che correggano tali difetti.

Beneficiari

Pazienti a rischio di tumore polmonare. Pazienti con sindrome di Cockayne.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Trovandosi sulla superficie di scambio dell'ossigeno, gli epitelii polmonari sono particolarmente esposti alla mutagenesi da danno ossidativo. Nei fumatori poi, l'infiammazione di questi epitelii dovuta al fumo, libera una gran quantità di specie reattive dell'ossigeno, che provocano mutazioni e moltiplicano gli effetti cancerogeni del tabacco. Anti-ossidanti orali come la Vitamina C possono tamponare temporaneamente l'ossidazione dei tessuti, ma hanno effetto limitato nel tempo e necessitano di somministrazione continua. La Riparazione del DNA gioca un ruolo importante nel ridurre gli effetti dannosi del danno ossidativo. Diversi studi hanno dimostrato una maggiore incidenza di tumore polmonare in presenza di alterazioni del gene della 8-oxoguanina DNA glicosilasi (OGG1) che ripara la base ossidata mutagena 8-oxoguanina (8-oxoG). Inoltre questo enzima, anche in condizioni normali, funziona molto lentamente, avendo capacità di catalisi ridotta. Quindi, già in condizioni normali, le cellule umane riparano inefficacemente le basi ossidate come la 8-oxoG. Nell'uomo probabilmente la difesa dalle mutazioni da danno ossidativo è stata affidata dall'evoluzione più all'apoptosi che alla Riparazione del DNA. I batteri invece hanno meccanismi di riparazione del danno ossidativo molto efficaci. L'enzima batterico formamidopirimidina DNA glicosilasi (FPG) è 80 volte più veloce del suo corrispondente umano OGG1 nel riparare le purine ossidate. Abbiamo espresso la proteina FPG fusa alla proteina fluorescente EGFP in cellule umane di vescica per migliorarne la capacità riparativa. La riparazione delle purine ossidate è risultata accelerata in cellule umane che esprimono EGFP-FPG. Queste cellule sono resistenti all'azione mutagena di farmaci ossidanti. Pertanto, l'espressione di FPG può proteggere stabilmente le cellule umane dalla mutagenesi ossidativa. La sindrome di Cockayne è una rara malattia ereditaria multisistemica caratterizzata da ritardo nello sviluppo fisico e mentale e invecchiamento precoce. Questa malattia è causata da mutazioni in due geni denominati CS-A e CS-B.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Ambedue regolano la riparazione del danno al DNA indotto dalla luce ultravioletta ma recenti esperimenti mostrano che essi sarebbero anche coinvolti nella riparazione del danno al DNA da ossidazione e nella trascrizione. L'alterazione di queste funzioni sarebbe alla base del deficit neurologico che affligge gravemente i pazienti con CS. Per approfondire la nostra conoscenza delle cause di questa malattia e studiare nuove possibilità di cura, abbiamo analizzato il difetto di questi pazienti a livello molecolare. Cellule di ambedue i gruppi CS-A e CS-B sono risultate difettose nella riparazione della base ossidata 8-oxoguanina. Questo difetto di riparazione è stato corretto tramite espressione della proteina di fusione EGFP-FPG che ripara efficacemente la 8-oxoguanina. L'espressione della proteina EGFP-FPG all'interno delle cellule CS ne ha corretto completamente il difetto riparativo per l' 8-oxoguanina. Sono stati anche iniziati studi sulla capacità riparativa di cellule staminali di glioma, per capire se la Riparazione del DNA sia un fattore importante di resistenza di queste cellule alla chemio- e radioterapia.

Elenco pubblicazioni:

Frosina G.

Prophylaxis of oxidative DNA damage by formamidopyrimidine DNA glycosylase.
Int. J. Cancer 119:1/7, 2006

Ropolo M.-Geroldi A.-Degan P.-Andreotti V.-Zupo S.-Poggi A.-Reed A.-Kelley M.-Frosina G.

Accelerated repair and reduced mutagenicity of oxidative DNA damage in human bladder cells expressing the E. coli FPG protein.
Int. J. Cancer 118:1628/1634, 2006

D'errico M.-Parlanti E.-Teson M.-Degan P.-Lemma T.-Calcagnile A.-Iavarone I.-Jaruga P.-Ropolo M.-Pedrini A.-Orioli D.-Frosina G.- Zambruno G.-Dizdaroglu M.-Stefanini M.-Dogliotti E.

The role of CSA in the response to oxidative DNA damage in human cells.
Oncogene 26:4336/4343, 2007

Frosina G.

Gene prophylaxis by a DNA repair function.
Mol. Aspects Med. 28:323/344, 2007

Frosina G.

Preface.
Mol. Aspects Med. 28:255/257, 2007

Frosina G.

The current evidence for defective repair of oxidatively damaged DNA in Cockayne syndrome.
Free Radic. Biol. Med. 43:165/177, 2007

Frosina G.

Tumor suppression by DNA base excision repair.
Mini Rev. Med. Chem. 7:727/743, 2007

Ropolo M.-Degan P.-Foresta M.-D'errico M.-Lasiglie' D.-Dogliotti E.-Casartelli G.-Zupo S.-Poggi A.-Frosina G.

Complementation of the oxidatively damaged DNA repair defect in Cockayne syndrome A and B cells by Escherichia coli formamidopyrimidine DNA glycosylase.
Free Radic. Biol. Med. 42:1807/1817, 2007

Frosina G.

Oxidatively damaged DNA repair defect in Cockayne syndrome and its complementation by heterologous repair proteins.
Curr. Med. Chem. 15:940/953, 2008

Capitoli di libro:

Frosina G.

Gene prophylaxis of endogenous DNA damage.
In: New Research on DNA Repair, Landseer B.R. Editor, 115/166
Nova Science Publishers, 2007

Presentazione a convegni:

Ropolo M.-Degan P.-Foresta M.-D'errico M.R.-Lasigliè D.-Dogliotti E.-Casartelli G.-Zupo S.-Poggi A.-Frosina G.

Complementation of the oxidative damage DNA repair defect in Cockayne Syndrome A and B cells by *E.coli* FPG protein.
VIII Congresso Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 28 settembre - 1 ottobre 2006

Frosina G.

Prophylaxis of oxidative DNA damage by expression of DNA repair proteins.
International Free Radical Summer School 2006: Biomarkers of oxidative stress and responses, Spetses Island (Gr), 30 settembre - 6 ottobre 2006

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Ropolo M.-Degan P.-Foresta M.-D'Errico M.R.-Lasigliè D.-Dogliotti E.-Casartelli G.-Zupo S.-Poggi A.-Frosina G.
Oxidatively damaged DNA repair defect in Cockayne syndrome and its complementation by heterologous repair proteins.
International Conference Rare Diseases and Orphan Drugs, Roma, 5-8 novembre 2007

Frosina G.-Foresta M.-Degan P.-Pettinati I.-Ropolo M.
La sindrome di Cockayne e i nuovi tentativi di terapia.
Convegno "1ª giornata di sensibilizzazione per le malattie rare", Roma, 29 febbraio 2008

Frosina G.-Dogliotti E.-Botta E.-Calcagnile A.-Casartelli G.-Degan P.-D'Errico M.-Foresta M.-Lemma T.-Narciso L.-Nardo T.-Oneda R.-Orioli D.-Pettinati I.-Ropolo M.-Stefanini M.
Genetic, molecular and functional characterization of Cockayne syndrome, a rare transcription/repair defective hereditary disease.
ISTISAN Congressi, 08/C10, p. 63-64, 2008

Studi per l'utilizzo di nuove molecole in grado di modulare l'attività di fattori di trascrizione cruciali nel processo cancerogenetico ed infiammatorio (p53 e NFkB)

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica (proto-oncogeni, geni oncosoppressori, meccanismi di instabilità genomica, virus oncogeni)

Responsabile: Paola Menichini

Partecipanti: Gilberto Fronza, Alberto Inga

Durata: 2006-2008

Parole chiave: proteine p53 mutate; apoptosi; PRIMA-1; NFkB; saggi funzionali

Altre strutture IST: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (L. Ottaggio)

Altri Enti coinvolti: Karolinska Institute, Stockholm, Sweden (G. Selivanova); National Institute of Environmental Health Sciences, RTP, NC, USA (M.A. Resnick)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: AIRC; Alleanza contro il Cancro; NIEHS

Background

La proteina p53 gioca un ruolo chiave nel controllo della stabilità genomica attraverso la regolazione trascrizionale di un elevato numero di geni effettori. Il network di p53 modula la progressione del ciclo cellulare, l'apoptosi, la riparazione del DNA, l'angiogenesi ed è inattivato nella maggior parte dei tumori, frequentemente in seguito a mutazioni dello stesso gene p53. Negli ultimi anni si sta sempre più affermando l'interesse per lo studio e lo sviluppo di nuovi farmaci che abbiano p53 come target di elezione, sia allo scopo di riattivare le funzioni abrogate nelle proteine p53 mutate, che di modularne l'attività trascrizionale verso specifici gruppi di geni effettori (es. geni pro-apoptotici). L'apoptosi p53-dipendente ha un ruolo importante per l'efficacia della chemioterapia e tumori con p53 mutata sono spesso resistenti alla chemioterapia. Le cellule tumorali possono essere sensibili alla riattivazione della p53 in quanto esprimono alti livelli di p53 mutata e la riattivazione farmacologica di tali proteine potrebbe indurre una forte risposta apoptotica. Negli ultimi anni sono state identificate e testate diverse molecole a basso peso molecolare, quali PRIMA-1, PRIMA-1Met, MIRA-1, RITA-1, capaci di ripristinare parzialmente le funzioni selvatiche in proteine p53 mutate. Tuttavia, per molte di queste molecole, i meccanismi molecolari che determinano la risposta della cellula tumorale non sono ancora chiari. Una migliore comprensione del meccanismo d'azione di tali molecole potrebbe essere ottenuta attraverso la definizione del network di geni che possono essere modulati farmacologicamente da fattori di trascrizione cruciali nel processo cancerogenetico e infiammatorio come la p53 e l' NFkB. Questi studi potrebbero permettere di generare molecole antitumorali più specifiche.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Gli obiettivi della ricerca sono stati:

- La valutazione dell'attività pro-apoptotica e citotossica di piccole molecole di nuova sintesi (es. PRIMA-1) in linee cellulari tumorali che esprimono specifiche proteine p53 mutate. In particolare si vuole definire meglio la correlazione tra morte cellulare indotta da PRIMA-1 e riattivazione di proteine p53 mutate. Lo scopo finale è quello di contribuire allo sviluppo di molecole che siano in grado di uccidere in maniera più selettiva le cellule tumorali, esprimenti una proteina p53 mutata, rispetto alle cellule normali con p53 selvatica.
- Lo sviluppo di un saggio funzionale in lievito per studiare la modulazione da parte di farmaci antitumorali (classici o di nuova sintesi) dell'attività di alcuni fattori di trascrizione cruciali nel processo cancerogenetico e infiammatorio, quali p53 e NFkB.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Beneficiari

A medio e lungo termine possibilità di ricadute sulla terapia personalizzata (es. in tumori esprimenti forme mutate della p53 e che si mostrano particolarmente resistenti al trattamento). Possibili ricadute sul disegno di nuovi agenti antineoplastici e sull'utilizzo degli stessi in combinazione con chemoterapici classici.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

- In linee cellulari umane di Non Small Cell Lung Cancer esprimenti una proteina p53 selvatica o mutata (A549:p53wt, LX1:p53R273H, SKMes1:p53R280K) abbiamo caratterizzato la risposta apoptotica indotta da PRIMA-1. Attraverso l'utilizzo di diversi end-points (il "cleavage" di PARP, la determinazione al FACS della percentuale di cellule in sub-G1, l'analisi della frammentazione del DNA e la quantificazione di nuclei apoptotici mediante analisi morfologica di cellule trattate e colorate con DAPI) abbiamo osservato che PRIMA-1 da solo, pur essendo citotossica, non è in grado di indurre apoptosi. Un aspetto interessante di PRIMA-1 è l'effetto sinergico che essa esplica con l'adriamicina, un classico chemioterapico. Infatti un trattamento combinato con adriamicina e PRIMA-1 innesca una risposta apoptotica, specialmente in linee che esprimono p53 mutata (LX1 e SKMes1) e risulta più citotossico del trattamento con adriamicina da sola. Questo effetto è particolarmente interessante nelle SKMes1 dove non si era osservata induzione di apoptosi in seguito ad altri stimoli pro-apoptotici. Abbiamo anche effettuato saggi di ChIP-PCR per studiare la capacità di PRIMA-1 (da sola o in combinazione con altre) di riattivare l'attività transattivante della p53 mutata verso geni target come p21, mdm2, puma, bax. I dati ottenuti mostrano che PRIMA-1 in queste cellule non è in grado di promuovere la trascrizione di questi geni ad opera di p53.

Un meccanismo alternativo per regolare l'attività di p53 potrebbe basarsi su una re-distribuzione della p53 in determinati compartimenti cellulari. Alcune evidenze suggeriscono che un possibile meccanismo di riattivazione della p53 in seguito a trattamenti con PRIMA-1 potrebbe essere rappresentato dalla traslocazione della proteina p53 mutata nel nucleolo e dalla sua interazione con alcune proteine come Hsp70 e Hsp90. Abbiamo osservato che in seguito a trattamento con PRIMA-1, ma non dopo trattamento con adriamicina, la p53 mutata si sposta dal nucleo al nucleolo. Dal momento che la localizzazione della p53 è ben regolata e può rappresentare un meccanismo di modulazione della sua attività, i nostri dati suggeriscono che PRIMA-1 può agire sull'attività di p53 attraverso la regolazione della sua localizzazione.

In sintesi i risultati ottenuti fino ad oggi indicano che: i) l'attività di PRIMA-1 sulla p53 mutata può essere tessuto/linea cellulare dipendente e, nelle linee cellulari da noi utilizzate, può non passare attraverso l'attivazione trascrizionale, p53-dipendente, di geni pro-apoptotici; ii) PRIMA-1 può indurre altri meccanismi di morte cellulare alternativi all'apoptosi; i nostri dati preliminari suggeriscono un possibile coinvolgimento dell'autofagia; iii) trattamenti combinati di PRIMA-1 e altri chemoterapici potrebbero permettere di superare la resistenza all'apoptosi riscontrata in molte tipi di cellule tumorali e di diminuire le dosi di chemoterapico utilizzato con una conseguente diminuzione degli effetti collaterali indesiderati.

- In lievito. Un saggio funzionale dual-luciferase è stato utilizzato in cellule aploidi delete per il gene PDR5 che codifica per una glicoproteina di membrana e per il gene PDR1, un regolatore del complesso degli ABC-transporters. In questi ceppi modificati per aumentare l'up-take di piccole molecole, il gene Firefly è stato posto sotto controllo trascrizionale della p53 umana, mentre l'espressione del reporter Renilla viene controllata da fattori di trascrizione della famiglia NFkB. Tali fattori di trascrizione possono essere espressi nelle cellule da vettori centromerici contenenti un promotore inducibile, finemente regolabile. Con questo sistema sperimentale sono state studiate alcune molecole ritenute capaci di modulare p53 (PRIMA-1; RITA; Nutlin) o p65/NFkB1 (parthenolide; 2-ethyl-pyruvate). Nel caso di Nutlina 3B e Rita si è anche proceduto alla co-espressione di p53 con il suo modulatore negativo MDM2 o la proteina 53BP1. Abbiamo confermato che il saggio funzionale in lievito può misurare l'effetto inibitorio di mdm2 su p53 e che il trattamento con nutlin3B riduce quest'inibizione. Rita non ha mostrato attività nei confronti dell'interazione funzionale tra mdm2 e p53, ma sembrerebbe efficace nel modulare quella tra p53 e 53BP1. Questi risultati hanno anche verificato la possibilità di adattare il saggio funzionale allo screening high-throughput di librerie di molecole chimiche allo scopo di valutare la loro attività di modulazione del potenziale di transattivazione di p53 o NFkB o la loro capacità di modificare interazioni funzionali tra tali fattori di trascrizione e loro cofattori.

Elenco pubblicazioni:

Catassi A.-Cesario A.-Arzani D.-Menichini P.-Alama A.-Bruzzi C.-Imperatori A.-Rotolo N.-Granone P.-Russo P.
Characterization of apoptosis induced by marine natural products in non small cell lung cancer A549 cells.
Cell. Mol. Life Sci. 63:2377/2386, 2006

Ottaggio L.-Campomenosi P.-Fronza G.-Menichini P.-Miele M.-Moro F.-Viaggi S.-Zunino A.-Abbondandolo A.
Stable formation of mutated p53 multimers in a chinese hamster cell line causes defective p53 nuclear localization and abrogates its residual function.
J. Cell. Biochem. 98:1689/1700, 2006

Magrini R.-Russo D.-Fronza G.-Inga A.-Menichini P.
The kinetics of p53 binding and histone acetylation at target promoters do not strictly correlate with gene expression after UV damage.
J. Cell. Biochem. 100:1276/1287, 2007

Magrini R.-Russo D.-Ottaggio L.-Fronza G.-Inga A.-Menichini P.
PRIMA/1 synergizes with adriamycin to induce cell death in non small cell lung cancer cells.
J. Cell. Biochem. 104:2363/2373, 2008

Russo D.-Ottaggio L.-Fronza G.-Inga A.-Penna I.-Menichini P.
PRIMA-1 induces p53 nucleolar accumulation and p53 degradation in Non-Small Cell Lung Cancer cell lines carrying mutant p53.
Manuscript in preparation