

S.C. Nanobioteconologie

Studi strutturali di oncoproteine ed enzimi coinvolti nella progressione neoplastica

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: Camillo Rosano

Durata: 2006-2008

Parole chiave: struttura proteine; cristallografia a raggi X; drug design; modeling molecolare; bioinformatica strutturale

Altre strutture IST: S.S. Biopolimeri e Proteomica (M. Rocco)

Altri Enti coinvolti: Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Pavia (L.A. Stivara, C. Scotti); DISCAFF, Facoltà di Farmacia, Università del Piemonte Orientale (F. Condorelli); Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (A. Spallarossa); Dipartimento di Fisica, Università di Genova (U. Valbusa); Istituto G. Gaslini, Genova (M. Ponzoni, M. Pasino, M. Filocamo); Dipartimento Farmaco-biologico, Università della Calabria (M. Maggolini); Polish Academy of Sciences, Lodz, PL (C. Cierniewski, E. Stec)

Tipologia progetto: tecnologie abilitanti

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Background

In questi ultimi anni, anche grazie al progetto genoma, sono stati identificati numerosi geni responsabili di malattie genetiche e/o associati alla trasformazione neoplastica. La caratterizzazione strutturale dei prodotti genici corrispondenti, rappresenta l'ovvia fase scientifica successiva. In questo contesto, la biologia strutturale è una delle discipline più informative, unendo studi computazionali a tecnologie di analisi "a bassa risoluzione", a studi ad alta risoluzione che possono rivelare dettagli a livello atomico delle macromolecole biologiche. Una tale precisione è necessaria al fine di apprendere processi fondamentali quali la traduzione del segnale, l'attivazione di un cammino metabolico, l'azione di un inibitore o le conseguenze di una mutazione sul funzionamento di un enzima. La biologia strutturale è altresì cruciale per la caratterizzazione molecolare di molte malattie tra cui il cancro ed è in grado di offrire una base di partenza per lo studio di terapie mirate quali il disegno razionale di farmaci. Nell'ambito dell'attività proposta sono state studiate e caratterizzate diverse proteine (e loro mutanti patogeni) utilizzando tecniche quali la diffrazione di raggi X da cristalli proteici, lo scattering di raggi X a basso angolo, il dynamic light scattering ed il modelling molecolare. Le informazioni strutturali ottenute hanno consentito, in alcuni casi, il disegno razionale di inibitori utilizzando lo screening virtuale "in silico" di piccole molecole tramite simulazioni di docking e di dinamica molecolare, mentre, in altri casi, sono stati elucidati alcuni meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di stati patogeni.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il presente progetto di ricerca ha avuto come obiettivo primario lo studio e la determinazione delle strutture tridimensionali di alcune oncoproteine ed enzimi (mediante analisi dei dati di diffrazione di raggi X da cristalli e mediante modelling molecolare) al fine di rendere possibile un disegno razionale di inibitori con elevato grado di specificità e selettività. Obiettivi secondari sono stati la determinazione dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di alcune patologie e il disegno di alcune molecole (lead compounds) che hanno dimostrato potenziale capacità di interazione con alcuni target di interesse oncologico e che, in futuro, potrebbero essere ottimizzati per un eventuale uso farmacologico.

Beneficiari

La possibilità di realizzare nuovi composti antitumorali più selettivi ed efficaci di quelli oggi in commercio, costituirà un enorme beneficio per la popolazione. La conoscenza dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di alcune patologie, potrà essere utilizzata in fase di prevenzione e di diagnosi precoce. Le industrie chimico-farmaceutiche presenti sul territorio potranno avere giovamento dalla possibilità di sviluppare terapie personalizzate, poco interessanti per le grandi multinazionali, essenziali per la cura di alcuni tumori considerati "rari".

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Sono stati condotti esperimenti di espressione, purificazione e cristallizzazione di diverse molecole ed analisi computazionali e di modelling di mutanti patogeni di proteine. In particolare sono state studiate:

- c-Fes: Il proto-oncogene *fes/fps* codifica per una tirosina chinasi non recettoriale (c-Fes) di caratteristiche strutturali uniche, condivise solo con l'altro membro proteico di questa famiglia di proteine chinasi (Fer). Fes rappresenta un potenziale bersaglio per la regolazione della trasduzione del segnale in processi che variano dall'infiammazione alla differenziazione cellulare, alla proliferazione tumorale. Strutturalmente Fes è una proteina di 92 kDa composta da diversi domini, due dei quali sono stati espressi, purificati e cristallizzati nel nostro laboratorio, in collaborazione con l'Università di Lodz (PL): il dominio N-terminale "FCH" ed il dominio C-terminale chinasi. La proteina in forma intera è stata recentemente clonata nei laboratori del DISCAFF di Novara dal Prof. F. Condorelli. I risultati ottenuti mediante le analisi cristallografiche sui domini FCH e chinasi verranno combinati con i risultati a bassa risoluzione degli

Consuntivo progetti RC 2006-2008

esperimenti SAXS/SANS effettuati sulla proteina intera, al fine di descrivere la struttura atomica della proteina, possibilmente nei diversi stati attivato/inattivato in modo tale da fornire indicazioni sulle variazioni conformazionali indotte sulla proteina dal legame con agenti endogeni ed esogeni. In parallelo, sono stati disegnati e sintetizzati alcuni potenziali inibitori del dominio chinasi, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Genova (Dott. A. Spallarossa). Le molecole più promettenti verranno valutate in vitro e tramite lo studio cristallografico del complesso da esse formato con la chinasi in oggetto.

- Inibizione della DNA-polimerasi beta da parte di analoghi del Resveratrolo: La riparazione del DNA è un processo biologico vitale per tutti gli organismi viventi. La polimerasi beta, oggetto dei nostri studi, è dedicata alla riparazione dei "gaps" formati nel DNA a seguito di fattori esterni. Il resveratrolo è un composto naturale presente in grandi quantità in alcuni vegetali e nel vino rosso. È dimostrato come questo composto giochi un ruolo importante nella prevenzione di molti processi patologici tra cui la cancerogenesi. Nell'ambito della ricerca sono stati studiati alcuni derivati del resveratrolo che presentano una migliore selettività e maggiore attività verso la polimerasi beta. Il disegno razionale di farmaci da noi effettuato, ha consentito la sintesi di alcune piccole molecole potenziali inibitori selettivi della proteina. L'analisi cristallografica dei complessi della proteina con i derivati sintetizzati, è in corso.

- Recettori di cellule "Natural Killer": B7H3 e DNAM-1 sono recettori specifici delle cellule Natural Killer, coinvolti nel riconoscimento e nella risposta citotossica verso cellule tumorali umane e di cellule infettate da virus. Al fine di studiare razionalmente l'interazione di questi recettori con i ligandi naturali, abbiamo intrapreso l'espressione e la purificazione del frammento extracellulare di questi recettori per successivi studi strutturali. La procedura di purificazione e la identificazione delle condizioni di cristallizzazione per entrambe le proteine, sono attività tuttora in corso.

- Modelling di proteine e simulazioni di dinamica molecolare: La cristallizzazione delle proteine rivela talvolta difficoltà proibitive o talvolta insormontabili. Nei casi in cui le coordinate atomiche di una proteina non siano note, informazioni attendibili possono comunque essere recuperate mediante la modellazione molecolare sulla base dell'omologia con strutture conosciute. In collaborazione con il Laboratorio di Diagnosi pre-postnatale e Malattie Metaboliche dell'Ospedale G. Gaslini (Prof.ssa. M. Filocamo), sono stati analizzati gli effetti di mutazioni singole di aminoacidi su numerose proteine. Le nostre analisi biocomputazionali hanno permesso di chiarire alcuni meccanismi molecolari che sono alla base dell'insorgenza di diverse malattie metaboliche. In collaborazione con la struttura Biopolimeri e Proteomica di questo Istituto (Dr. M. Rocco), abbiamo inoltre modellato le strutture atomiche di alcune macromolecole di cui erano noti parametri idrodinamici, strutture a bassa risoluzione e coordinate atomiche di frammenti ad alta risoluzione, al fine di ottenere informazioni strutturali dettagliate. La metodologia utilizzata (Hybrid method) costituisce un approccio alla risoluzione di problemi complessi, all'avanguardia negli studi strutturali di macromolecole biologiche.

Elenco pubblicazioni:

Bicocchi M.-Pasino M.-Rosano C.-Molinari A.-Della Valle E.-Lanza T.-Bottini F.-Acquila M.

Insight into molecular changes of the FIX protein in a series of Italian patients with haemophilia B.
Haemophilia 12:263/270, 2006

Corazza A.-Rosano C.-Pagano K.-Alverdi V.-Esposito G.-Capanni C.-Bemporad F.-Plakoutsi G.-Stefani M.-Chiti F.-Zuccotti S.-Bolognesi M.-Viglino P.

Structure, conformational stability, and enzymatic properties of acylphosphatase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*.

Proteins 62:64/79, 2006

Rosano C.-Zuccotti S.-Sturla L.-Fruscione F.-Tonetti M.-Bolognesi M.

Quaternary assembly and crystal structure of GDP/D/mannose 4,6 dehydratase from *Paramecium bursaria* Chlorella virus.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 339:191/195, 2006

Donnarumma M.-Regis S.-Tappino B.-Rosano C.-Assereto S.-Corsolini F.-Di Rocco M.-Filocamo M.

Molecular analysis and characterization of nine novel CTSK mutations in twelve patients affected by pycnodysostosis.
Hum. Mutat. 28:524;1/524;10, 2007

Gnemmi I.-Scotti C.-Cappelletti D.-Canonica P.-Condorelli F.-Rosano C.

Expression, purification and preliminary crystallographic studies on the catalytic region of the nonreceptor tyrosine kinase Fes.

Acta Crystallogr. F 63:18/20, 2007

Cesarini S.-Spallarossa A.-Ranise A.-Schenone S.-Rosano C.-La Colla P.-Sanna G.-Busonera B.-Loddo R.

N/acylated and N,N'/diacylated imidazolidine/2/thione derivatives and N,N'/diacylated tetrahydropyrimidine/2(1H)/thione analogues: synthesis and antiproliferative activity.

Eur. J. Med. Chem. Epub Jun 24, 2008

Grossi S.-Regis S.-Rosano C.-Corsolini F.-Uziel G.-Sessa M.-Di Rocco M.-Parenti G.-Deodato F.-Leuzzi V.-Biancheri R.-Filocamo M.

Molecular analysis of ARSA and PSAP genes in twenty one Italian patients with metachromatic leukodystrophy: identification and functional characterization of 11 novel ARSA alleles.

Hum. Mutat. 29:E220/E230, 2008

Pierotti M.-Lombardo C.-Rosano C.

Nanotechnology: going small for a giant leap in cancer diagnostics and therapeutics.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Tumori 94:191/196, 2008

Pittis M.-Donnarumma M.-Montalvo A.-Dominissini S.-Kroos M.-Rosano C.-Stroppiano M.-Bianco M.-Donati M.-Parenti G.-D'Amico A.-Ciana G.-Di Rocco M.-Reuser A.-Bembi B.-Filocamo M.
Molecular and functional characterization of eight novel GAA mutations in Italian infants with Pompe disease.
Hum. Mutat. 29:E27/E36, 2008

Rocco M.-Rosano C.-Weisel J.-Horita D.-Hantgan R.
Integrin conformational regulation: uncoupling extension/tail separation from changes in the head region by a multiresolution approach.
Structure 16:954/964, 2008

Fancello, T.-Dardis, A.-Rosano, C.-Tarugi, P.-Zampieri, S.-Tappino, B.-Pinotti, E.-Corsolini, F.-Fecarotta, S.-D'Amico, A.-Di Rocco, M.-Uziel, G.-Calandra, S.-Bembi, B.-Filocamo, M.
Molecular Analysis of NPC1 and NPC2 Gene in Thirty-Four Niemann-Pick C Italian Patients: Identification and Structural Modelling of novel mutations.
Neurogenetics, in press

Lappano R.-Rosano C.-Plastina P.L.-Bartolo G.-Albanito L.-Madedo A.-Forti L.-Stivala L.A.-Iacopetta D.-Dolce V.-Pezzi V.-Maggiolini M.
Structure-activity relationships for binding of resveratrol and four analogues to estrogen receptor alpha in breast cancer cells.
Molecular Nutrition and Food Research, in press

Persichetti E.-Chuzhanova N.A.-Dardis A.-Tappino B.-Pohl S.-Thomas N.S.T.-Rosano C.-Balducci C.-Paciotti S.-Dominissini S.-Montalvo A.L.-Sibilio M.-Parini R.-Rigoldi M.-Di Rocco M.-Parenti G.-Orlacchio A.-Bembi B.-Cooper D.N.-Filocamo M.-Beccari T.
Identification and molecular characterization of six novel mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTG) gene in patients with mucopolysaccharidosis III gamma.
Human Mutation, in press

Lanciotti M.-Caridi G.-Rosano C.-Pigullo S.-Lanza T.-Dufour C.
Severe congenital neutropenia: a very severe phenotype related to the negative synergistic effect of multiple mutations of ELA2 gene.
Haematologica, submitted

Bioinformatica clinica e strutturale applicata alla diagnosi e cura di patologie neoplastiche

Linea di ricerca: 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: b - Valutazione dell'efficacia di nuovi approcci terapeutici: studio di nuovi farmaci, di nuove associazioni, di nuove tecniche, tecnologie o strategie terapeutiche.

Responsabile: Domenico Bordo

Durata: 2006-2008

Parole chiave: bioinformatica strutturale; drug design; protein modeling; single nucleotide polymorphism; bioinformatica clinica; systems biology

Altre strutture IST: S.C. Oncologia Medica A (F. Grossi); S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer); S.C. Clinical Trials e Bioetica (L. Boni); S.S. Mutagenesi Molecolare e Riparazione del DNA (A. Inga, G. Fronza)

Altri Enti coinvolti: IRCSS Ospedale G. Gaslini, Genova (R. Ravazzolo, L. Varesio); European Laboratory of Molecular Biology, Heidelberg (Peer Bork); Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Wayne State University School of Medicine, Detroit Michigan, USA (R. Mukhopadhyay); DISMA, Università di Milano (S. Pagani); Genetica Medica, IRCSS Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano (D. Coviello); Università di Genova, Dipartimento di Fisica (U. Valbusa); Gruppo Multimedia, Milano (A. Albini)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute

Background

Negli ultimi due anni sono state sviluppate tecnologie di modellazione per omologia di strutture proteiche tridimensionali che garantiscono una elevata affidabilità. Inoltre, la delucidazione della struttura tridimensionale di oltre 50.000 proteine distinte, ottenuta principalmente mediante cristallografia a raggi X, consente di ottenere un modello tridimensionale attendibile di enzimi e più in generale di proteine associate a patologie specifiche. Nei casi in cui mutazioni della sequenza aminoacidica (o SNPs a livello di sequenza genomica) siano state identificate, è possibile

Consuntivo progetti RC 2006-2008

localizzare sulla struttura terziaria della proteina il sito di mutazione e studiare gli effetti sulla struttura e sulla funzione della proteina mutata.

In questo contesto è stata avviata una fattiva collaborazione con ricercatori del Laboratorio Europeo di Biologia Molecolare, focalizzata allo studio dell'interazione proteina-farmaco.

La bioinformatica è stata utilizzata anche per l'analisi di dati derivanti da esperimenti di DNA microarrays. In quest'ambito è iniziata una collaborazione nell'ambito di un progetto ordinario di ricerca oncologica coordinato dal dr. Varesio del Gaslini.

Inoltre, nella seconda metà del 2008 è iniziata una fattiva collaborazione con il prof. Ugo Valbusa, focalizzata allo studio della presenza di microtubuli nella crescita di linee cellulari, sul modello delle cellule HUVEC (staminali ottenute da cordone ombelicale). L'interpretazione dei risultati degli esperimenti, condotti in collaborazione con la dr. Adriana Albini di Milano, è in corso di svolgimento. L'interpretazione e l'analisi dei risultati è condotta utilizzando le mappe di Voronj.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Analisi strutturale di proteine ed analisi di dati derivanti da esperimenti di DNA microarrays.

Studio della correlazione struttura-funzione di proteine associate a patologie specifiche. Studio dell'interazione proteina - farmaco.

Beneficiari

Le analisi svolte hanno ruolo eminentemente traslazionale. Beneficiari sono ricercatori del settore clinico, nonché altri ricercatori coinvolti in ricerche traslazionali le cui competenze si integrano con quelle relative a questa linea di ricerca (genetisti, patologi clinici).

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Nel corso del 2008 l'attività di bioinformatica strutturale si è arricchita di un nuovo studio condotto con il dr. Peer Bork, Direttore del Dipartimento di Structural and Computational Biology dell'European Molecular Biology Laboratory (EMBL) di Heidelberg, Germania. Il gruppo del dr. Bork sta conducendo uno studio "in silico" sugli effetti collaterali di circa 700 farmaci approvati dalla FDA americana (vedi ad es. Campillos et al., Science, 231, 263-266, 2008), di cui esiste una descrizione dettagliata e di cui sono note le molecole bersaglio. I risultati preliminari sono molto promettenti, e potrebbero consentire di individuare terapie farmacologiche alternative a quelle standard in alcune patologie neoplastiche. L'attività prevista consiste nello studio e nell'analisi, condotta con i metodi della bioinformatica strutturale, delle interazioni proteina-farmaco. La collaborazione tra IST ed EMBL è attualmente regolamentata da un "Secrecy Agreement" che consente l'accesso e la condivisione di informazioni di potenziale rilevante interesse da parte di industrie farmaceutiche. Tale agreement permette inoltre la condivisione da parte dell'Istituto di eventuali diritti o royalties derivanti dai risultati ottenuti. Il progetto è attualmente in corso e si prevedono risultati significativi dal 2009. L'approccio bioinformatico-strutturale ha consentito di fornire informazioni rilevanti in studi coinvolgenti due patologie, la Colestasi Intraepatica Progressiva Familiare (collaborazione con D. Coviello) e la Fibrodiplosia Ossificante Progressiva (collaborazione con R. Ravazzolo), in cui i geni e le proteine coinvolte sono stati recentemente individuati. In ambito più prettamente strutturale è stato concluso lo studio della struttura dell'arsenato/antimonato reductasi LmACR2, coinvolta nella detossificazione da arsenico. L'esposizione ad arsenico, sia esso in forma organica o inorganica, è causa di numerose forme di neoplasia (pelle, polmoni e vescica).

Elenco pubblicazioni:

Bisacchi D.-Zhou Y.-Rosen B.P.-Mukhopadhyay R.-Bordo D.

Crystallization and preliminary crystallographic characterization of LmACR2, an arsenate/antimonate reductase from Leishmania major.

Acta Crystallogr. Sec. F 62, 976-979, 2006

Gangemi R.-Daga A.-Muzio L.-Marubbi D.-Cocozza S.-Perera M.-Verardo S.-Bordo D.-Griffero F.-Capra M.-Mallamaci A.-Corte G.

Effects of Emx2 inactivation on the gene expression profile of neural precursors.

Eur. J. Neurosci. 23: 325/334, 2006

Degiorgio D.-Colombo C.-Seia M.-Porcaro L.-Costantino L.-Zazzeron L.-Bordo D.-Coviello D.

Molecular characterization and structural implications of 25 new ABCB4 mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3).

Eur. J. Hum. Genet. 15: 1230/1238, 2007

Bocciardi R.-Bordo D.-Di Duca M.-Di Rocco M.-Ravazzolo R.

Mutational analysis of the ACVR1 gene in Italian patients affected with fibrodiplosia ossificante progressiva: confirmations and advancements.

Eur. J. Hum. Genet. Epub Oct 1, 2008

Mukhopadhyay R.-Bisacchi D.-Zhou Y.-Armirotti A.-Bordo D.

Structural characterization of the As/Sb reductase LmACR2 from Leishmania major.

J. Mol. Biol. Epub Jul 29, 2008