

S.S. Mutagenesi Molecolare e Riparazione del DNA

Valutazione di nuovi agenti antineoplastici induttori di specifiche lesioni al DNA

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

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

Responsabile scientifico: Gilberto Fronza

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Menichini, Debora Russo, Paola Monti, Chiara Perfumo

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

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

Altri Enti coinvolti: Department of Pharmaceutical Sciences, University of Pittsburgh, U.S.A. (B. Gold); Georgia Tech Institute, Atlanta, USA (K. Lobachev)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: National Institute of Health (USA); Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

Il danno al DNA indotto da molti degli antineoplastici usati in clinica svolge un ruolo fondamentale sia per gli effetti terapeutici desiderati (citotossicità, apoptosi) nelle cellule tumorali, che per quelli indesiderati (mutagenicità). Questo problema è messo in rilievo da possibili tumori secondari attribuiti al trattamento con agenti antineoplastici del primo tumore. 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. Siccome il DNA rimane un ottimo target per agenti anticancerogeni, è però imperativo identificare ed eliminare la formazione di lesioni premutagene mantenendo nel tempo la formazione di quelle che inducono selettivamente citotossicità. In collaborazione con il Prof. Gold (Pittsburgh University, USA) che ha sintetizzato nuovi agenti alchilanti in grado di indurre quasi esclusivamente un solo tipo di lesione, stiamo studiando la metil-lexitropsina (Me-lex) uno specifico induttore di 3-metiladenina (3-MeA) in sequenze ricche in A/T. Negli anni precedenti, utilizzando preferibilmente un sistema modello in *S. cerevisiae*, ma più recentemente anche in linee cellulari di mammifero, abbiamo dimostrato come effettivamente Me-lex sia una sostanza poco mutagena ed altamente citotossica e che i suoi effetti biologici siano fortemente influenzati da specifiche competenze biologiche della cellula. In particolare, la citotossicità e la mutagenicità delle lesioni indotte da Me-lex sono fortemente influenzate dalle 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. È stato valutato che anche le DNA polimerasi coinvolte nel processo di fissazione delle mutazioni (Rev3, Rev1, Pol eta, codificate rispettivamente da REV3, REV1, RAD30) [nell'uomo la carenza di Pol eta porta ad una sindrome come Xeroderma Pigmentosum-Variant (XPV)] influenzano mutagenicità e citotossicità della molecola Me-lex. 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 nel 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. L'analisi molecolare dei mutanti HPRT- 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.

L'ipotesi quindi che è alla base di questo progetto è che la formazione selettiva ed esclusiva della 3-mA rappresenta un approccio nuovo per uccidere le cellule, minimizzando l'induzione di mutazioni che possono poi essere responsabili di tumori secondari. L'interesse per questo tipo di studi è sviluppare nuovi agenti alchilanti (metilanti) con un potenziale indice terapeutico migliore.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale: Utilizzare la Me-lex come prototipo di nuovi agenti alchilanti per capire quali sono i determinanti cellulari che condizionano la citotossicità e la mutagenicità di specifiche lesioni (e.g. 3-mA, siti AP). Lo scopo ultimo è quello di verificare in quali condizioni l'utilizzo di tali molecole può avere il più alto indice terapeutico - eventualmente nel paziente. Questo obiettivo passa attraverso diverse fasi. Da una parte continuare con l'utilizzo della Me-lex e la conseguente introduzione di lesioni distribuite in modo casuale su un target plasmidico, o nel genoma di linee cellulari (1); dall'altra parte, approfondire a livello molecolare gli effetti biologici di specifiche lesioni in un contesto

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

sperimentale ancor più definito utilizzando l'introduzione di lesioni specifiche (3mA, sito AP) in uno specifico sito (e.g. hotspot di mutazione nel cDNA di p53 precedentemente caratterizzato) (2). Gli specifici obiettivi sono:

- capire l'effetto del trattamento con Me-lex sul metabolismo del DNA, specificatamente se e come 3mA porti all'instabilità dell'informazione genetica (mutazioni), ed in particolare attraverso processi d'instabilità cromosomica (induzione di delezioni, riarrangiamenti, ecc.)
- determinare l'effetto di specifiche lesioni (sitoAP, e analoghi stabili della 3mA) e se questi effetti presentano un effetto dipendente dal contesto di sequenza.

Impatto assistenziale certo o potenziale

A medio/lungo termine: possibili ricadute sul disegno di nuovi agenti antineoplastici e sull'utilizzo degli stessi in condizioni di terapia personalizzata (ad es. in tumori ove specifici pathway di riparazione del DNA o di translesion synthesis sono inattivati, ci si aspetta un potenziale incremento dell'effetto citotossico)

Risultati e prodotti 2009

Abbiamo investigato la mutagenicità di Me-lex al locus HPRT in una linea cellulare ovarica di Hamster cinese (CHO). Il trattamento con Me-lex era citotossico ma debolmente mutagenico. Si è determinato la natura molecolare di 43 mutazioni all'Hprt indotte da Me-lex attraverso il sequenziamento del cDNA, oltre che all'analisi genomica del locus. Il 25% circa delle mutazioni indotte era costituito da sostituzioni di basi, prevalentemente AT targeted. Più della metà delle mutazioni osservate (51%) erano delezioni genomiche comprendenti perdita di uno (o più) esoni. Lo spettro di mutazioni Me-lex è risultato significativamente differente da quello spontaneo ($p < 0.012$). Sulla base di questi risultati ipotizziamo che la maggioranza di queste ultime mutazioni, derivino dal processamento di 3mA, il principale addotto di Me-lex, formatosi in sequenze A/T ricche in regioni non codificanti del gene HPRT. Il processamento da parte di queste lesioni da parte di DNA polimerasi può quindi risultare in eventi di ricombinazione e delezioni che sicuramente possono costituire una severa minaccia per il mantenimento dell'integrità genomica. (Russo D et al., *Mutat Res.* 671: 58/66, 2009)

In lievito abbiamo verificato che:

- la delezione del gene POL4, (che codifica per una DNA polimerasi omologa a Polbeta umana) non influenza la letalità della Me-lex se testata in un contesto -mag1- ove l'effetto potrebbe essere addirittura esacerbato vista l'assenza di riparazione della 3mA. Ne concludiamo che Pol4 non è coinvolta nel processamento delle lesioni indotte da Me-lex.
- Poleta ha un ruolo nel processamento delle lesioni Me-lex indotte. Mentre la delezione del gene RAD30 (Poleta) aumenta la tossicità di Me-lex, il suo impatto sulla mutagenicità varia a seconda della entità del danno e della capacità globale di TLS della cellula. Abbiamo determinato uno spettro di mutazione indotto da Me-lex in un ceppo deltarad30 e lo abbiamo confrontato con quello determinato in un contesto selvatico. L'effetto osservato sulla mutagenicità suggerisce un ruolo complesso di Poleta nel processamento di lesioni Me-lex indotte. Infatti, confrontando i risultati ottenuti nei background deltarad30 vs RAD30 si è osservato un significativo decremento 1) della mutagenicità e 2) di specifiche mutazioni AT>TA, ed un concomitante aumento di altre specifiche mutazioni AT>GC. I primi suggeriscono un ruolo error-prone, mentre il secondo suggerisce un ruolo error free di Poleta nel processamento di lesioni Me-lex. I risultati ottenuti in questo lavoro insieme a quelli precedentemente pubblicati indicano che il processo di translesion synthesis di fronte a lesioni indotte da Me-lex è controllato da tutte e tre le Polimerasi TLS di lievito (Polzeta, Rev1, Poleta) e che tale processo è massimamente efficiente quando tutte e tre le polimerasi sono presenti. (Monti et al, *Mutat. Res. Epub Oct 26, 2009*)

Pubblicazioni

Monti P.-Traverso I.-Casolari L.-Menichini P.-Inga A.-Ottaggio L.-Russo D.-Iyer P.-Gold B.- Fronza G.
Mutagenicity of N3-methyladenine: A multi-translesion polymerase affair
Mutat. Res. Epub Oct 26, 2009

Russo D.-Fronza G.-Ottaggio L.-Monti P.-Inga A.-Iyer P.-Gold B.-Menichini P.
High frequency of genomic deletions induced by Me-lex, a sequence selective N3-adenine methylating agent, at the Hprt locus in Chinese hamster ovary cells
Mutat. Res. 671:58/66, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Alla luce dei risultati ottenuti in cellule di Hamster cinese (CHO) si valuterà la capacità ricombinogena di Me-lex utilizzando pannelli di linee cellulari di hamster deficienti in specifiche funzioni riparative (EMC11- xrcc1 ber deficient; XRC1, xrcc7 recombination deficient). In primis si completerà il lavoro sulla determinazione dello spettro di mutazione indotto da Me-lex in cellule ber- e si determinerà se effettivamente gli eventi molecolari ricollegabili a ricombinazione aumentano rispetto ad un contesto ber+. In seconda battuta, verrà determinata nello stesso pannello di linee cellulari, l'entità dei scambi dei cromatidi fratelli (SCE) e il test del micronucleo (MN).

In lievito si cercheranno le condizioni per effettuare un trattamento con Me-lex in vivo. Riuscire in questo permetterebbe di valutare in situazioni specifiche e con un approccio più diretto e meno laborioso (rispetto al trattamento in vitro di un plasmide con Me-lex seguito da trasfezione e crescita selettiva) quali geni sono più importanti per la citotossicità e la mutagenicità indotta da Me-lex.

Abbiamo in effetti un pannello di ceppi ottenuti da EUROSCARF isogenici tra loro tranne che per delezioni di specifici geni coinvolti in processi di ricombinazione, checkpoints, riparazione per dei mismatch etc. che vanno testati in vivo e che risponderrebbero a questa esigenza.

Al fine di valutare e caratterizzare dell'effetto genotossico di Me-lex in termini di induzione di grandi delezioni, riarrangiamenti intendiamo utilizzare un approccio in lievito utilizzando un sistema che ci verrà messo a disposizione da un collaboratore americano (Kirill Lobachev, Georgia Tech Institute di Atlanta, USA). Si determinerà l'influenza di

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

diversi background genetici su eventi di ricombinazione. Per far ciò, si utilizzerà un sistema di reversione dell'auxotrofia per la lisina.

Caratterizzazione metabolica e funzionale in linee cellulari normali, tumorali e da pazienti affetti da patologie con difetti nel metabolismo ossidativo

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

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

Responsabile scientifico: Paolo Degan

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Guido Frosina, Paola Menichini

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (S. Viaggi)

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: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Agenzia Spaziale Italiana; Fondazioni

Background

Lo stress ossidativo, e i danni che ad esso possono essere conseguenti, sono importanti segnali nella regolazione fisiopatologica cellulare, tissutale e degli organismi in toto.

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.

Perciò la definizione dello stato redox 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.

Difetti nella induzione e riparazione di un danno ossidativo possono essere indici di uno stato patologico. Tali alterazioni vengono rivelate, nel nostro laboratorio mediante dosaggi in HPLC/EC del marker 8-idrossi-guanosina (8-oxo-dG). Recentemente le analisi sullo stress ossidativo si avvalgono anche della caratterizzazione del difetto, oltre che a livello di DNA genomico, anche a livello di quello mitocondriale e a carico dell'RNA. La natura del difetto biochimico non è spesso correlabile a specifiche pathways. Allo scopo di meglio caratterizzare il difetto biochimico che è alla base di tali alterazioni cellule ed estratti proteici cellulari vengono studiati mediante caratterizzazione in western blot, citofluorimetria a flusso ed analisi dei contenuti di ATP e stabilità mitocondriale. La dissezione dei processi apoptotici e di quelli di equilibrio energetico sono, in tal senso, estremamente informativi.

Un recente sviluppo sulle tematiche dello stress ossidativo ha portato, in tempi recenti, ad un interesse nei confronti di nano particelle (NP). Le NP sono attualmente un campo di interesse in fase di grande espansione. NP vengono utilizzate in tutti i settori delle filiere industriali dalla preparazione di farmaci, anche in ambito di terapie oncologiche, alla industria alimentare. D'altra parte le NP pongono anche significative sfide come potenziali agenti tossici. Non ci sono ancora conoscenze specifiche su questo campo e mancano anche gli adeguati strumenti di regolamentazione per il loro utilizzo. Il nostro gruppo sta preparando programmi e strategie per la valutazione dei potenziali effetti tossici e genotossici potenzialmente correlati al loro utilizzo, con specifico interesse per quelle NP già utilizzate nell'ambito terapeutico.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Impatto assistenziale certo o potenziale

Per quanto riguarda la attività di studio del danno ossidativo nell'ambito di patologie correlate ad un potenziale sviluppo tumorale sono evidenti le possibili implicazioni assistenziali nella definizione di protocolli di trattamento (per esempio con antiossidanti o con terapie mirate all'aumento delle attività di protezione). Nell'ambito delle NP si ritiene che una definizione della potenziale tossicità e genotossicità di specifiche classi di NP possa essere utile per la definizione dei materiali adeguati specialmente nell'ambito del loro impiego nella formulazione di farmaci.

Risultati e prodotti 2009

L'inattivazione o la funzionalità alterata e parziale di attività deputate alla riparazione del DNA pare contribuire in maniera significativa alla eziologia di differenti patologie complesse inclusi i tumori.

La quantificazione, via HPLC/EC, di basi ossidate del DNA permette la caratterizzazione di tali attività difettive nei meccanismi di rimozione del danno.

L'attività svolta nel corso dell'anno ha permesso di:

1 - caratterizzare il deficit di riparazione di purine (8-OHdG) e di pirimidine (5-OHdG) ossidate in cellule da pazienti affetti dalla sindrome di Cockayne.

2 - caratterizzare il contributo della inattivazione dei geni MUTYH e MSH2 in cellule MEF e in animali transgenici dove l'inattivazione di questi geni porta a differenti fenotipi di espressione e dove le mutazioni a carico di questi geni sono correlate allo sviluppo di linfomi linfoblastici delle cellule B e sono implicati nella instabilità genica.

3 - studiare, specificamente, mutazioni a carico del gene MUTYH associate a poliposi adenomatosa (MAP) responsabili di sindromi colonrettali. Per tale scopo sono stati selezionati pazienti MAP caratterizzati da mutazioni a carico del gene MUTYH. Il contributo delle singole mutazioni di MUTYH è stato caratterizzato nei confronti della capacità ripartiva di 8-OHdG evidenziando il ruolo di una alterata abilità nella riparazione di 8-OHdG in questa patologia.

4 - caratterizzare la risposta di linee cellulari affette da anemia di Fanconi (FA) all'esposizione a gravità simulata. La caratterizzazione del difetto biochimico responsabile delle manifestazioni patologiche in pazienti FA non è ancora noto. D'altra parte le caratteristiche biochimiche suggeriscono come tale difetto debba essere localizzato a livello dei pathways di controllo del metabolismo dell'ATP e dell'apoptosi coinvolgendo sia la via intrinseca che quella estrinseca. Utilizzando l'esposizione allo stress fisico "microgravità" abbiamo studiato le possibili differenze nella induzione apoptotica di varie linee cellulari. I risultati ottenuti suggeriscono come le linee FA siano estremamente resistenti al trattamento e come il loro comportamento sia associabile a quello di linee cellulari trasformate quali Jurkat e 1310.

Pubblicazioni

Foresta M.-Ropolo M.-Degan P.-Pettinati I.-Kow YW.- Damonte G.-Poggi A.-Frosina G.

Defective repair of 5-hydroxy-2'-deoxycytidine in Cockayne syndrome cells and its complementation by Escherichia coli formamidopyrimidine DNA glycosylase and endonuclease III.

Free Radic Biol Med. Epub Dec 21, 2009

Molatore S.-Russo MT.-D'Agostino VG.-Barone F.-Matsumoto Y.-Albertini AM.-Minoprio A.-Degan P.-Mazzei F.-Bignami M.-Ranzani GN.

MUTYH mutations associated with familial adenomatous polyposis: functional characterization by a mammalian cell-based assay.

Hum. Mutat. Epub Dec 1, 2009

Russo MT.-De Luca G.-Casorelli I.- Degan P.-Molatore S.-Barone F.-Mazzei F.-Pannellini T.-Musiani P.- Bignami M.

Role of MUTYH and MSH2 in the control of oxidative DNA damage, genetic instability, and tumorigenesis.

Cancer Res. 69:4372/4379, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel corso dell'anno verranno proseguiti gli studi di collaborazione relativi ai punti 1, 2 e 3 sopra riportati.

Dal punto di vista sperimentale stiamo adottando nuove metodologie di studio, la citofluorimetria a flusso e gli array blot, in associazione con quelle già in uso.

La citofluorimetria è una potente tecnica di analisi in grado di ottenere risposte dello stato fisiologico di una cellula in condizioni in cui il danno al DNA non è rilevabile. Stiamo utilizzando questa tecnica di analisi per la caratterizzazione della attività mitocondriale, dello stato red-ox e nella apoptosi di linee cellulari normali e trasformate sia in condizioni normali che a seguito del trattamento con differenti molecole che ne alterino specifici pathway. Recentemente ci siamo focalizzati nello studio di inibitori di glutatione come possibile modulatore del metabolismo cellulare in grado di differenziare il fenotipo e il comportamento di cellule normali e trasformate. In tali studi vengono anche impiegate linee cellulari FA.

Stiamo inoltre valutando l'utilizzo di membrane di array blot, solo recentemente disponibili, per la quantificazione della espressione di un set di 43 proteine della pathway apoptotica. Tale tecnologia è estremamente competitiva rispetto al tradizionale western blot perché permette la quantificazione in un singolo esperimento di un gran numero di proteine appartenenti alla stessa pathway con la possibilità di creare mappe di attività biochimica analoghe a quelle ottenibili per analisi di tipo genomico e proteomico.

Nell'ambito dello studio delle nanoparticelle (NP) sono allo studio numerose iniziative per la partecipazione a progetti sia in ambito nazionale che europeo e per la formazione di aggregazioni di laboratori in collaborazione su queste tematiche. Inoltre è in corso la messa a punto di differenti protocolli sperimentali per la valutazione di: a) tipo di esposizione del materiale biologico in condizioni statiche o dinamiche quale simulazione della esposizione naturale di differenti tessuti alle NP; b) tipo di NP utilizzate: si pensa di impiegare sia NP modello quali ZnO e TiO₂ che NP utilizzate come carrier di farmaci o in analisi di immagine, quali QD; c) cellule utilizzate per gli esperimenti: cellule delle linee linfocitarie e cellule di epiteli per la sperimentazione dei differenti tipi di possibile interazione tra NP e organismi; d) selezione tempi e dosi sperimentali; e) selezione dei target di analisi.

Caratterizzazione funzionale delle proteine p53 mutanti: il loro ruolo nella cancerogenesi e strategie terapeutiche

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico: Gilberto Fronza

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Menichini, Debora Russo, Paola Monti, Chiara Perfumo

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: proteine p53 mutate; caratterizzazione funzionale; saggio in lievito; polimorfismi

Altre strutture IST partecipanti: 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, D. Umbah); Università di Genova (G. Bianchi-Scarrà); Istituto G. Gaslini, Genova (ML. Garré, V. Capra, R. Haupt)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

Il gene soppressore di tumore TP53 (OMIM # 191170) codifica per una proteina coinvolta in molte vie cellulari che controllano le risposte a vari segnali di stress. La proteina p53 è un fattore di trascrizione sequenza specifico espressa nella maggior parte dei tipi di cellule ed attivato dopo stress genotossico o a seguito di segnali iperproliferativi, capace di transattivare geni effettori sotto il controllo di elementi p53 responsivi (p53 REs). Il legame specifico al DNA da parte della p53 selvatica è essenziale per il suo ruolo di soppressore tumorale. L'inattivazione del pathway di p53 è presente in quasi tutti i tipi di tumore, specialmente attraverso mutazioni del gene TP53 stesso. A differenza di altri geni soppressori tumorali, mutazioni di TP53 sono molto frequentemente di tipo missenso, colpiscono un allele, mentre il secondo allele viene perso durante la progressione del tumore. L'elevato numero di mutazioni somatiche nel dominio di legame del DNA in tumori, e il conseguente elevato numero di singole sostituzioni aminoacidiche che si producono (circa 1300) suggeriscono che la funzione di p53 è estremamente sensibile ai cambiamenti e che nei tumori vi è la selezione di cellule esprimenti una proteina mutante con una specifica funzionalità. Quest'ultima possibilità potrebbe riflettere un effetto dominante negativo della proteina mutante su quella selvatica o l'acquisizione di nuove e specifiche proprietà funzionali. Una frazione non trascurabile di mutazioni p53 in tumori non presentano una completa perdita di funzione. Anzi, vi è una notevole eterogeneità sia strutturale che funzionale di singole proteine mutanti, tant'è che alcune possono avere perso qualche funzione della proteina selvatica pur mantenendone (o acquisendone specificatamente) altre.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo di questo progetto è quello di determinare come questa eterogeneità funzionale impatti sulla eterogeneità clinica (a) nei portatori di mutazioni p53 germinali, (b) in tumori di origine somatica e (c) sull'applicabilità di un nuovo approccio terapeutico personalizzato basato sullo status di p53. Per quanto riguarda le mutazioni germinali p53, abbiamo recentemente correlato i dati clinici dei pazienti presenti in una prima versione della banca dati dello IARC con una classificazione funzionale dei singoli mutanti p53 in base alle residue proprietà trascrizionali (parzialmente difettivi, con limitata capacità transattivante presente ma parziale, o gravemente difettivi, senza più capacità transattivante). Utilizzando esclusivamente dati in letteratura abbiamo osservato che i soggetti con alleli gravemente difettivi sono stati associati a una più grave storia familiare di cancro, un più elevato numero di tumori, ed una età di diagnosi più precoce. Queste scoperte interessanti, che possono aiutare nella gestione di soggetti che hanno ereditato mutazioni p53, hanno bisogno di un'ulteriore valutazione, attraverso la determinazione indipendente di dati funzionali per ogni p53 allele presente nella versione aggiornata della banca dati dello IARC, comprendenti anche altri endpoint (ad esempio la funzionalità dei mutanti rispetto agli elementi p53 responsivi di importanti geni effettori scoperti recentemente, il potenziale dominante dei mutanti p53 e la capacità degli stessi di interferire con i membri della famiglia p53). Sia il fatto che la riattivazione farmacologica di mutanti p53 è esplorata come una nuova possibilità terapeutica (vedi progetto P. Menichini), sia il fatto che polimorfismi del pathway di p53 potrebbero essere considerati come fattori di suscettibilità, sembrano puntare verso collegamento tra funzionalità di p53 e potenziali applicazioni cliniche. Recentemente, ad aumentare le nuove complessità nella regolazione della rete trascrizionale di p53 è emersa l'identificazione di microRNAs come target trascrizionali di p53, l'importanza delle diverse isoforme di p53, e l'intricato crosstalk tra i membri della famiglia p53.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I risultati ottenuti porteranno ad una descrizione più dettagliata dal punto di vista trascrizionale della funzionalità residua di mutanti p53 (capacità trascrizionale su geni responsivi, potere dominante, potere interferente). Questa informazione funzionale può essere in primis utilizzata per confermare o no l'esistenza di una correlazione tra proprietà trascrizionali dell'allele e caratteristiche cliniche nei soggetti carrier a livello germinale della mutazione. A medio e

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

lungo termine vi è 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.

Risultati e prodotti 2009

- Sono stati costruiti, attraverso un approccio di mutagenesi sito-specifica, 103 alleli presenti nella banca dati dello IARC – mutazioni p53 germinali.
- Sono stati costruiti una serie di ceppi reporter di lievito con nuovi elementi responsivi (e.g. mir34a) che controllano l'espressione del gene reporter (Luciferasi).
- E' stata completata l'analisi di transattivazione degli alleli nei ceppi reporter con un approccio quantitativo (Luciferasi) e semiquantitativo (ADE2). E' stato poi verificato, con i dati prodotti che gli alleli germinali possono essere classificati in alleli Partial Deficient (PD) e Severe Deficient (SD). Si è poi confermato che gli alleli SD sono associati con sindromi con mutazioni germinali più severe (LFS), con un maggior numero di soggetti con tumori multipli ed un'età di insorgenza del primo tumore più precoce.
- E' stato anche valutato se il genotipo del polimorfismo MDM2 SNP309 influenza la sopravvivenza in pazienti affetti da Neuroblastoma (NB). E' noto che MDM2 è un regolatore negativo della funzione di p53 ed è regolato da MYCN in cellule di NB. Lo SNP309, una sostituzione da T-a-G nel promotore di MDM2, sembra essere associato con una più elevata espressione genica, con conseguente possibile maggior attenuazione del pathway di p53 in NB dove mutazioni p53 sono notoriamente rare. Si è osservato che pazienti e controlli hanno mostrato una distribuzione simile dei genotipi allo SNP309. Se da una parte non si sono viste associazioni significative tra polimorfismo e caratteristiche cliniche dei pazienti con malattia localizzata, in quelli con NB 4° stadio overall survival (OS), event free survival (EFS) e survival after relapse (SAR) sono state trovate significativamente peggiori per i pazienti con almeno un allele G (TG/GG) rispetto a quelli con soli alleli T (TT) (P = 0.008; P = 0.013; P = 0.046, rispettivamente). Abbiamo concluso che lo status del polimorfismo SNP309 di MDM2 non influenza il rischio di sviluppare NB, né l'esito della malattia in pazienti affetti da NB localizzato, mentre esso correla significativamente con la sopravvivenza in pazienti con NB 4° stadio.

Pubblicazioni

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.
Pediatr. Blood Cancer 52:303/304, 2009

Perfumo C.-Parodi S.-Mazzocco K.-Defferrari R.-Inga A.-Scarrà GB, Ghiorzo P.-Haupt R.-Tonini GP.-Fronza G.
MDM2 SNP309 genotype influences survival of metastatic but not of localized neuroblastoma.
Pediatr. Blood Cancer. 53:576/583, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

L'attività per il 2010 prevede:

- caratterizzazione funzionale di mutanti p53 mediante una serie di saggi funzionali nel lievito *S. Cerevisiae*; in particolare la determinazione dell'abilità dei mutanti di abrogare le funzioni della proteina selvatica (dominanza)
- verifica se la caratterizzazione funzionale dei mutanti di p53 (di origine germinale) permette di predire l'outcome clinico dei pazienti -con particolare attenzione alla casistica dei portatori di mutazioni germinali di p53 in letteratura (IARC database) ed in Liguria (collaborazione con L. Varesco, V. Capra, e ML Garrè)
- sulla base della funzionalità superiore rispetto al WT di alcuni mutanti p53 (noti come SuperTransattivanti), costruzione dei corrispondenti alleli mutanti negli altri partner della famiglia di p53 (p63/p73) e loro caratterizzazione funzionale (transattivazione)
- valutazione se varianti polimorfiche di geni appartenenti al pathway di p53 (e.g. SNP309 MDM2) siano associate con altri biomarcatori serici (e.g. Ferritina, LDH) in pazienti affetti da Neuroblastoma.

Riparazione del DNA

Linea di ricerca: 1 – Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico: Guido Frosina

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paolo Degan

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: tumori cerebrali; cellule staminali tumorali; gliomi; danno ossidativo; proflassi; sindrome di Cockayne

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Embriogenesi e Tumorigenesi su Modelli Animali (O. Barbieri); S.C. Trasferimento Genico (G. Corte, A. Daga); S.C. Epidemiologia, Biostatistica e Clinical Trials (D.F. Merlo); S.C. Immunologia (S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (A. Zunino)

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Altri Enti coinvolti: U.O. Neurochirurgia, Istituto G. Gaslini, Genova (A. Cama, V. Capra); Dipartimento di Emato-Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova (E. Cappelli); Laboratorio Epidemiologia Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma (E. Dogliotti); Department of Radiation Oncology, Emory University School of Medicine, Clifton Road NE, Atlanta, GA, USA (Y.W. Kow); S.C. di Anatomia ed Istologia Patologica, A.O.U. San Martino, Genova (J.L. Ravetti); U.O. Neurochirurgia, E.O. Ospedali Galliera, (P. Severi); Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica, Università di Genova, (R. Spaziante; G. Zona); Istituto Genetica Molecolare, Consiglio Nazionale Ricerche, Pavia (E. Botta; M. Stefanini); Università della Tuscia, Viterbo (L. Proietti Desantis)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Istituto Superiore Sanità; Compagnia di San Paolo

Background

La Riparazione del DNA è bifronte: da un lato provoca resistenza all'azione antineoplastica di vari agenti chemioterapici, rimuovendo le lesioni citotossiche e causando perdita di efficacia terapeutica; dall'altro, la Riparazione del DNA protegge le cellule normali 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 antimutagenica e anticancerogena. La nostra ricerca verterà sui seguenti due aspetti:

1. Riparazione del DNA e resistenza di cellule staminali di glioma alla radio- e chemioterapia.

I gliomi sono la forma più comune di tumore cerebrale primario (per una recente rassegna v. Wen and Kesari, N. Engl. J. Med. 359 (2008) 492-507). Nonostante siano 10 volte meno frequenti (circa 6 ogni 100,000 persone per anno nei paesi occidentali) di grandi "killers" come i tumori del polmone o della mammella, essi rappresentano un grave problema per le famiglie e più in generale per il sistema sanitario nazionale, essendo quasi sempre incurabili ed affliggendo il paziente sia dal punto di vista somatico che psichico. Nonostante qualche limitato miglioramento nelle tecniche chirurgiche e radio/chemio-terapiche, la prognosi per i pazienti con glioma rimane infausta, con una mediana di sopravvivenza di 24-60 mesi per i pazienti affetti da astrocitoma anaplastico (grado III) e di 12-15 mesi per quelli affetti da glioblastoma multiforme (grado IV). La difficoltà di cura è legata al carattere infiltrante di questi tumori ed alla loro tendenza a recidivare dopo asportazione chirurgica. I tumori del sistema nervoso centrale sono anche il tipo di tumore solido più comune nei bambini ed una causa importante di malattia e morte (Abdullah et al, Ann N Y Acad Sci. 2008 Sep;1138:22-31). Alcuni miglioramenti terapeutici sono stati di recente ottenuti per alcune forme pediatriche (in particolare il medulloblastoma) mentre per i gliomi di alto grado non vi è stato alcun progresso. Pertanto, nonostante la ricerca in questo campo sia per quanto possibile attiva, non vi è al momento alcun trattamento terapeutico efficace per i gliomi di alto grado sia nell'adulto che nel bambino e la maggior parte dei pazienti muore in breve tempo. C'è urgenza di mettere a punto nuovi farmaci che prendano di mira alcune caratteristiche specifiche che possono rappresentare il "tallone d'Achille" dei gliomi di alto grado.

2. Protezione di cellule umane dal danno ossidativo tramite espressione di proteine di riparazione del DNA

Le cellule umane riparano il danno ossidativo con efficienza minore rispetto ad organismi meno evoluti. Per es. l'enzima umano 8-oxoguanina DNA glicosilasi (OGG1) ripara la base ossidata mutagenica 8-oxoguanina (8-oxoG) 80 volte più lentamente del suo corrispondente batterico formamidopirimidina DNA glicosilasi (FPG). Durante il triennio 2006-2008 abbiamo osservato che l'espressione della proteina FPG rende le cellule umane resistenti all'azione di molteplici agenti mutageni (Ropolo M et al. Int. J. Cancer 2006, 118:1628-1634). L'espressione della proteina FPG o di altre proteine eterologhe della Riparazione del DNA potrebbe quindi avere stabile effetto antimutageno su tessuti normali di individui a rischio. Parte di questi studi hanno interessato cellule prelevate da pazienti affetti da sindrome di Cockayne (CS) (Ropolo M et al. Free Rad. Biol. Med. 2007, 42:1807-1817). CS è una rara malattia autosomica recessiva caratterizzata da alterazioni nello sviluppo pre o post-natale, che determinano la comparsa di nanismo cachettico, e da progressiva disfunzione neurologica. Non vi è aumentata incidenza di tumori in questa malattia e questo paradossalmente è di interesse per gli oncologi. La sindrome di Cockayne rappresenta infatti un'eccezione tra le sindromi con difetti nella Riparazione del DNA (Xeroderma Pigmentoso, Human Non Polyposis Colorectal Cancer, Anemia di Fanconi, Sindrome di Bloom, Ataxia Telangiectasia ed altre) le quali tutte hanno aumentata incidenza di cancro. La sindrome di Cockayne ci indica perciò che, per avere sviluppo di tumori, oltre a difetti nella Riparazione del DNA, ci vuole qualcos'altro. Gli studi tesi a caratterizzare e correggere il difetto molecolare alla base della sindrome di Cockayne potrebbero dare indicazioni su fattori determinanti per lo sviluppo tumorale.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Gli obiettivi generali della nostra ricerca sono :

1. Sensibilizzare i tumori cerebrali alla radio- e chemioterapia per evitare il rischio di recidiva. Tramite studi in vitro ed in vivo, indagheremo se in presenza di inibitori delle checkpoint chinasi Chk1 e Chk2 le cellule staminali di glioma divengano sensibili alla radiazione ionizzante e al temozolomide.
2. 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 intermedi.

- Isolamento di nuove linee cellulari da glioma con fenotipo staminale.
- Analisi di ciclo cellulare, velocità di crescita e fenomeni apoptotici in cellule staminali di glioma.
- Analisi dell'attivazione delle checkpoint chinasi in cellule staminali di glioma.
- Analisi della sensibilità ai farmaci ed alla radiazione ionizzante di cellule staminali di glioma in presenza o assenza degli inibitori delle checkpoint chinasi.
- Identificare proteine di riparazione eterologhe la cui espressione combinata possa conferire protezione completa alle cellule umane dai diversi tipi di lesione ossidativa al DNA.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

- Chiarire il ruolo delle proteine CSA e CSB nella riparazione del danno ossidativo al DNA.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Il basso grado di proliferazione delle cellule staminali di glioma potrebbe essere un importante meccanismo di resistenza in queste cellule, conferendo ad esse tempo a disposizione per rimuovere le lesioni citotossiche prima dell'arrivo della forca replicativa. Queste caratteristiche potrebbero essere comuni ad altri tumori come le leucemie (Viale et al Nature 2009, 457, 51-56). Le terapie miranti alla reversione del blocco del ciclo cellulare nelle cellule staminali di glioma potrebbero produrre una completa eradicazione del tumore cerebrale. In particolare gli inibitori delle chinasi ATM, Chk1 e Chk2 potrebbero effettivamente sensibilizzare le cellule staminali di glioma a radiazione ionizzante e ad agenti alchilanti permettendo di superare i checkpoint attivati costitutivamente. In conclusione, l'uso di inibitori dei checkpoint del ciclo cellulare potrebbe migliorare significativamente l'efficacia dei trattamenti chemio- e radioterapici dei gliomi.

La proteina FPG ripara principalmente purine ossidate come la 8-oxoG. Lesioni diverse come le pirimidine ossidate (es. 5-idrossi citosina) o rotture del DNA a singolo e doppio filamento possono contribuire grandemente alla mutagenesi da danno ossidativo. Verranno identificate proteine di riparazione eterologhe, che da sole o in combinazione con FPG, possano conferire una protezione completa alle cellule umane dai diversi tipi di lesione ossidativa al DNA e rendere disponibile quindi un efficace e stabile strumento di protezione dei tessuti umani .

Risultati e prodotti 2009

I gliomi di alto grado (grado WHO III e IV) sono caratterizzati da grande eterogeneità. Alcune popolazioni sono particolarmente maligne ed in grado di fare progredire il tumore e resistere alla chemio- e radio-terapia. Queste cellule sono state denominate "cellule staminali tumorali" per la loro capacità differenziativa e possibile (ma non ancora dimostrata) origine da cellule staminali normali. Abbiamo esaminato il grado di proliferazione, l'efficienza della riparazione del DNA e l'attivazione dei checkpoint del ciclo cellulare in 5 linee cellulari staminali di glioma (Ropolo et al, Mol. Cancer Res. 2009, 7, 383-92). Il tempo di raddoppiamento della popolazione cellulare era significativamente aumentato nelle cellule staminali paragonato a quelle non staminali. Inoltre si osservava l'attivazione costitutiva delle chinasi Chk1 e Chk2 in cellule non trattate CD133(+) paragonate a cellule CD133(-). Né la riparazione per escissione di basi né quella delle rotture della singola elica, né la risoluzione di foci nucleari p53 erano aumentati in cellule di glioma CD133(+) paragonate a cellule CD133(-). Quindi la ridotta proliferazione cellulare potrebbe essere un importante meccanismo coinvolto nella resistenza di cellule staminali di glioma al trattamento indotto dalla chemio-radioterapia mentre l'aumento della efficienza di riparazione del DNA (per unità di tempo) non sembra essere importante. Abbiamo proposto che le cellule staminali di glioma possano essere selettivamente sensibilizzate ad agenti che danneggiano il DNA mediante l'uso di inibitori dei checkpoint provocando una reversione del blocco del ciclo cellulare ed una accelerazione del grado di proliferazione (Frosina, Curr. Med.Chem.16:854/866, 2009. Frosina G. Mol. Cancer Res. 7: 989/999, 2009).

Abbiamo anche analizzato alcuni fattori di prognosi per la sopravvivenza dei pazienti con glioma (Casartelli et al. Cancer Biol. Ther. 8: 1719/1721, 2009). Sebbene la prognosi di questo tipo di tumore normalmente sia infausta, raramente si trovano pazienti con sopravvivenze eccezionalmente lunghe. Per scoprire quali fattori possono così influenzare la sopravvivenza, abbiamo analizzato una coorte di 196 pazienti con glioma di terzo o quarto grado per la possibile associazione tra: 1. sopravvivenza ed età alla diagnosi; 2. sopravvivenza e frequenza di micronuclei nel tessuto tumorale; 3. sopravvivenza e sesso; 4. frequenza di micronuclei nel tessuto tumorale ed età alla diagnosi. Il risultato è stato che i pazienti diagnosticati in età avanzata (> 64 anni) presentavano un rischio di morte significativamente più alto di quelli diagnosticati in età più giovane (< 64 anni), indicando che i pazienti più anziani sopravvivono meno. Nessuna associazione è stata osservata tra sopravvivenza e frequenza di micronuclei o tra frequenza di micronuclei e sesso. Pertanto l'età alla diagnosi può in parte predire il decorso di un paziente con glioma di alto grado.

Pubblicazioni

Casartelli G.L.-Dorcaratto A.-Ravetti J.L.-Sola S.-Vitali A.-Merlo F.-Frosina G.
Survival of high grade glioma patients depends on their age at diagnosis.
Cancer Biol. Ther. 8: 1719/1721, 2009

Frosina G.
DNA repair and resistance of gliomas to chemo/radiotherapy.
Mol. Cancer Res. 7: 989/999, 2009

Frosina G.
DNA repair in normal and cancer stem cells with special reference to the central nervous system. Curr. Med. Chem.16:854/866, 2009

Ropolo M.-Daga A.-Griffero F.-Foresta M.-Casartelli G.-Zunino A.-Poggi A.-Cappelli E.-Zona G.-Spaziante R.-Corte G.-Frosina G.
Comparative analysis of DNA repair in stem and non-stem glioma cell cultures.
Mol. Cancer Res. 7: 383/392, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel 2010 studieremo gli effetti di inibitori di checkpoint del ciclo cellulare sulla sensibilità delle cellule staminali di glioma alla radiazione ionizzante e al temozolomide. Passeremo inoltre in rassegna la letteratura per fare il punto sulle nuove terapie che mirano a migliorare la sopravvivenza dei pazienti con glioma, prendendo a bersaglio le cellule staminali tumorali.

Studi verranno inoltre condotti sulla possibilità di proteggere i tessuti umani dal danno ossidativo tramite espressione di proteine eterologhe. A questo proposito verrà utilizzato il modello patologico offerto dalla Sindrome di Cockayne (CS).

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Cercheremo di chiarire il ruolo delle proteine CS-A e CS-B nella riparazione delle basi ossidate del DNA. Abbiamo osservato in passato una difettosa riparazione delle purine ossidate in cellule CS. Passeremo ora ad analizzare le pirimidine ossidate. Questo studio verrà eseguito tramite saggi in vitro ed in vivo ed utilizzando fibroblasti derivati da pazienti CS e relativi controlli. Verranno utilizzati due agenti ossidanti modello: uno chimico (il potassio bromato) ed uno fisico (radiazioni ionizzanti). La risposta di CS al danno ossidativo verrà studiata analizzando: 1. la induzione e riparazione di pirimidine ossidate (5-OHdC) in cellule integre tramite HPLC/ED; 2. l'efficienza di riparazione in cellule lisate incubate con substrati oligonucleotidici contenenti una singola lesione 5-OH-dC. Cercheremo poi di identificare proteine di riparazione eterologhe la cui espressione possa correggere il difetto di riparazione del danno ossidativo in CS. Abbiamo mostrato nel 2007 che la proteina FPG di E.coli corregge completamente il difetto di riparazione delle purine ossidate (8-oxodG) in ambedue i gruppi di complementazione di CS. La FPG ha come substrati ottimali le purine ossidate. Le pirimidine ossidate sono invece riparate principalmente in E.coli dall'enzima endonucleasi III (NTH). Verranno sviluppati vettori di espressione per NTH. Studi di riparazione in vivo ed in vitro permetteranno di comprendere il contributo relativo delle pirimidine ossidate al fenotipo CS. Potremo anche osservare se l'espressione di NTH e/o FPG possa correggere la sensibilità delle cellule CS agli agenti ossidanti. L'espressione di una o più proteine di riparazione eterologhe potrebbe correggere completamente il difetto di riparazione del danno ossidativo in CS e dare utili indicazioni su come proteggere tessuti umani a rischio di degenerazione dall'accumulo di danno ossidativo al DNA.

Studio dell'attività citotossica p53-dipendente di piccole molecole di nuova sintesi: attivazione di pathways di morte cellulare in cellule tumorali umane

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico: Paola Menichini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Gilberto Fronza, Debora Russo, Paolo Degan

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: proteine p53 mutate; PRIMA-1; azacianine; nuovi agenti antineoplastici; citotossicità

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

Altri Enti coinvolti: Karolinska Institute, Stockholm, Sweden (G. Selivanova); Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA (K. Lobachev, N. Hud); Università di Pisa, Scuola Medica (M. Masini)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

Lo sviluppo di nuove terapie antineoplastiche che siano in grado di colpire selettivamente le cellule cancerose rappresenta senza dubbio una delle aree più attive della ricerca pre-clinica.

-Un ruolo chiave nella risposta ai vari trattamenti antitumorali è quello svolto dal prodotto del gene oncosoppressore TP53. La mancata funzionalità della proteina p53 e la deregolazione dei pathways da essa controllati sono ampiamente dimostrate nei tumori. Cellule tumorali che esprimono una proteina p53 mutata sono generalmente incapaci di arrestare la progressione del ciclo cellulare e/o di andare in apoptosi e ciò può determinare una significativa resistenza alla chemioterapia. Per queste ragioni la riattivazione di proteine p53 mutate rappresenta una strategia promettente per sviluppare nuove terapie antitumorali. Nel nostro laboratorio abbiamo intrapreso lo studio dell'attività di PRIMA-1 (P53-Reactivation and Induction of Massive Apoptosis), una piccola molecola che è in grado di inibire selettivamente la crescita di cellule tumorali che esprimono una p53 mutata, attraverso l'induzione di una forte risposta apoptotica. Nonostante la capacità di PRIMA-1 di indurre apoptosi sia ben documentata, i nostri dati ottenuti in cellule derivate da tumori polmonari e particolarmente resistenti all'induzione di apoptosi, suggeriscono che la citotossicità di PRIMA-1 può derivare dall'attivazione di pathways alternativi all'apoptosi e non ancora studiati in cellule trattate con questa molecola (come ad es. autofagia, necrosi o senescenza). Inoltre, come riportato in letteratura e osservato anche nei nostri esperimenti, PRIMA-1 induce una redistribuzione della p53 mutata nel nucleolo e ciò potrebbe rappresentare una via alternativa di regolazione dell'attività della p53 stessa. Da queste evidenze si evince che il meccanismo di azione di PRIMA-1 può non essere univoco, ma dipendere dalle caratteristiche del tessuto o dal tipo cellulare utilizzato. PRIMA-1 si dimostra quindi una molecola interessante per studiare vie di morte alternative all'apoptosi in cellule tumorali molto resistenti a trattamenti chemioterapici convenzionali.

-Un'altra tipologia di molecole da studiare per sviluppare nuove terapie è quella in grado di bloccare la replicazione del DNA, generalmente molto attiva nelle cellule tumorali. In questo caso, i bersagli possono essere svariati. Uno di questi è rappresentato da sequenze di DNA che possono adottare conformazioni alternative alla forma B di Watson-Crick (i.e. triplex, G-quadruplex). Sequenze ripetute capaci di adottare strutture non canoniche sono molto frequenti nel genoma umano. Tali strutture secondarie possono essere stabilizzate e rappresentare un forte blocco alla progressione della forca replicativa, inducendo rotture nel DNA e quindi fragilità cromosomica. Piccole molecole con alta affinità e

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

selettività per questo tipo di strutture stanno quindi cominciando ad essere considerate per lo sviluppo di nuovi farmaci antineoplastici. Il gruppo del Prof. Hud (School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, USA) ha recentemente sviluppato nuove molecole, basate sulla struttura delle azacianine, in grado di legare in maniera altamente specifica strutture G-quadruplex basate sulla sequenza telomerica umana. Dati preliminari ottenuti nel laboratorio del Prof. Lobachev (School of Biology, Georgia Institute of Technology) indicano che queste molecole promuovono la rottura di regioni genomiche a sequenza ripetuta GAA/TTC capaci di formare una struttura triplex. Il trattamento di cellule eucariotiche di lievito con queste molecole inibisce la proliferazione cellulare e induce arresto in G2/M. Dal momento che molti processi biologici sono conservati dal lievito all'uomo e che ci sono circa 1000 loci GAA/TTC nel genoma umano, lo studio dell'attività citotossica di queste molecole in cellule umane e, in particolare, in cellule tumorali, potrebbe fornire conoscenze utili per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo di questa ricerca è quello di utilizzare nuove molecole, somministrate da sole o in combinazione, per inibire la proliferazione di cellule tumorali attraverso l'induzione di diversi pathways di morte cellulare. Saranno prese in esame due diverse tipologie di molecole aventi principalmente due bersagli cellulari: i) le proteine p53 mutate e ii) la replicazione del DNA.

Come molecola diretta verso la proteina p53 mutata studieremo PRIMA-1 (p53 Reactivating and Induction of Massive Apoptosis 1), una molecola capace di riattivare le funzioni transattivanti di p53 e indurre apoptosi. Sulla base dei dati sperimentali ottenuti fino ad oggi nel nostro laboratorio, intendiamo approfondire i seguenti aspetti:

- attivazione di pathways di morte cellulare, alternativi all'apoptosi, in linee tumorali ad opera di PRIMA-1;
- effetto sinergico tra PRIMA-1 e altri farmaci antineoplastici convenzionali;
- effetto di PRIMA-1 sulla funzionalità e sulla localizzazione cellulare di p53.

Per quanto riguarda lo studio di molecole in grado di bloccare la replicazione del DNA, valuteremo l'attività delle azacianine, piccole molecole che legano selettivamente strutture G-quadruplex nel DNA ma che, per la loro conformazione, non sono in grado di legare la struttura B del DNA. Per queste molecole valuteremo diversi end-points (induzione di apoptosi e/o necrosi e effetti sulla proliferazione cellulare) in relazione allo status funzionale della p53 e alla capacità riparativa delle cellule.

Mentre gli studi dell'attività di PRIMA-1 rappresentano la continuazione di un progetto in corso che ha già prodotto numerosi risultati (pubblicati e in corso di pubblicazione/stesura), gli studi sulle azacianine sono in una fase preliminare e si avvalgono di una proficua collaborazione con il gruppo americano che ha sviluppato queste molecole (Profs. Hud e Lobachev, Georgia Institute of Technology, USA). I risultati che otterremo con lo svolgimento delle diverse fasi di questo progetto potranno contribuire a comprendere meglio i meccanismi molecolari che stanno alla base dell'azione di queste nuove molecole. Dal momento che queste molecole agiscono su bersagli cellulari diversi, la loro combinazione potrebbe risultare molto efficace e permettere l'utilizzo di dosaggi inferiori di farmaco.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I risultati ottenuti porteranno ad una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base dell'attività citotossica di piccole molecole di nuova sintesi da utilizzare per lo sviluppo di nuovi percorsi terapeutici, anche in combinazione con farmaci chemoterapici convenzionali. Dal momento che la tossicità di queste molecole può dipendere dallo stato funzionale della p53, si prevede la possibilità di ricadute, a medio e lungo termine, sulla terapia personalizzata (es. in tumori esprimenti forme mutate della p53 e che si mostrano particolarmente resistenti al trattamento).

Risultati e prodotti 2009

- Studio dell'effetto di PRIMA-1 sulla funzionalità e sulla localizzazione di p53.

Attraverso esperimenti di immunocitochimica abbiamo studiato la localizzazione della proteina p53 mutata (p53R280K) nel nostro pannello di linee cellulari in seguito a trattamenti con PRIMA-1. Abbiamo documentato una localizzazione nucleolare della p53R280K in cellule SKMes1 in seguito a trattamenti con PRIMA-1 ma non dopo trattamento con adriamicina. Nelle stesse cellule abbiamo anche valutato l'influenza di alcune modificazioni post-traduzionali della p53 come la fosforilazione a siti specifici della proteina, mediante l'utilizzo di anticorpi specifici, sia in western blot che in immunocitochimica. Esperimenti di RNA interference sono stati condotti per studiare più in dettaglio la correlazione tra status di p53 e sensibilità a PRIMA-1. Linee cellulari che esprimono bassi livelli di proteina p53R280K sono più sensibili rispetto alla linea parentale in cui la stessa proteina è fortemente stabilizzata (manoscritto in preparazione).

- Studio dell'attivazione di pathways di morte cellulare, alternativi all'apoptosi, ad opera di PRIMA-1 in linee cellulari derivate da tumori polmonari.

Abbiamo dimostrato che il trattamento con PRIMA-1 è in grado di indurre autofagia quale meccanismo alternativo di morte cellulare. L'autofagia è stata valutata quantificando la formazione di vescicole acide dopo colorazione vitale con arancio di acridina e con analisi al microscopio elettronico (Dott.ssa M.Masini, Scuola Medica, Università di Pisa). Inoltre sono stati studiati i livelli di proteine coinvolte nell'autofagia come la Beclina e la MAP LC3-II. (manoscritto in preparazione).

- Studio della citotossicità indotta dalle azacianine (Aza3, Aza4, Aza5)

Abbiamo condotto esperimenti di citotossicità (MTT e colony forming ability) e genotossicità (SCE e micronuclei) in diverse linee cellulari umane e di hamster caratterizzate da deficit in diversi pathways della riparazione del DNA. L'incapacità di riparare le rotture del DNA non sembra giocare un ruolo nella sensibilità alle azacianine in cellule di hamster. I risultati ottenuti dimostrano che le diverse molecole hanno una diversa capacità di ridurre la proliferazione cellulare e indurre citotossicità a seconda del contesto cellulare. L'Aza5 invece mostra effetti clastogeni in tutte le linee cellulari (manoscritto in preparazione).

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2010

- Studio dell'attivazione di pathways di morte cellulare, alternativi all'apoptosi, ad opera di PRIMA-1 in linee cellulari derivate da tumori polmonari.

Nel prossimo anno approfondiremo gli studi sulla localizzazione nucleolare di p53R280K e sulla sua degradazione in seguito al trattamento con PRIMA-1. Utilizzando diversi inibitori studieremo anche il ruolo di alcuni chaperon (come hsp90, hsp70) nella stabilizzazione della p53 mutata. L'induzione di autofagia ad opera di PRIMA-1 sarà valutata anche nelle cellule che esprimono livelli molto bassi di proteina mutata p53R280K. Inoltre, continueremo gli studi sull'attivazione di altri pathways di morte cellulare come la senescenza. A questo scopo sarà utilizzato il saggio per la SA-beta-gal e un saggio quantitativo con la fluorescein di-beta-D-galactopyranoside (FDG) o con 4-methylumbelliferyl-beta-D-galactopyranoside (MUG). Un aspetto interessante, emerso recentemente, è la capacità di PRIMA-1 di aumentare i livelli di ROS intracellulari e di formare addotti con i gruppi tiolici della p53 mutata. Tale attività sembra essere alla base della capacità di questa molecola di riattivare le funzioni selvatiche perdute dalla p53 mutata. In collaborazione con P. Degan intendiamo studiare l'induzione di stress ossidativo in seguito a trattamenti con PRIMA-1 in linee cellulari che esprimono p53 mutate. Inoltre valuteremo l'impatto della capacità riparativa del DNA sulla sensibilità di diverse linee cellulari tumorali a questa nuova molecola.

- Studio dell'effetto sinergico tra PRIMA-1 e altri farmaci antineoplastici.

Abbiamo osservato che in cellule particolarmente refrattarie all'induzione di apoptosi, la somministrazione combinata di adriamicina e PRIMA-1 innesca una risposta apoptotica evidenziabile con un forte cleavage di PARP. Oltre all'adriamicina, altri farmaci (cisplatino, agenti alchilanti di nuova sintesi) verranno usati con PRIMA-1 per trovare condizioni di trattamento sinergiche nell'indurre citotossicità e inibizione della proliferazione cellulare.

- Studio della citotossicità indotta dalle azacianine.

Gli esperimenti effettuati fino ad oggi ci hanno permesso di caratterizzare prevalentemente gli effetti a breve termine delle varie molecole di azacianine. Continueremo lo studio della tossicità di queste molecole utilizzando altri saggi a lungo termine (colony forming ability) e saggi per valutare l'induzione di apoptosi, necrosi e autofagia già messi a punto nel nostro laboratorio.