

S.S. Mutagenesi Molecolare e Riparazione del DNA

Circuiti trascrizionali e post-trascrizionali di risposta a stress cellulare e loro alterazioni nel cancro

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

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

Responsabile scientifico: Alberto Inga

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Gilberto Fronza, Paola Menichini, Yari Ciribilli, Alessandra Bisio, Paola Monti, Virginia Andreotti

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: p53; recettori degli estrogeni; microRNA; SNP; p16/INK4a; 5'UTR

Altri Enti coinvolti: Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA (A. Jegga); National Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS, NC, USA (D. Menendez, M.A. Resnick); Fraunhofer Institute of Toxicology and Experimental Medicine, Hannover, Germany (J. Borlak); Centre for Integrative Biology, Università di Trento (A. Provenzani, M. Denti); Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica, Università di Genova (G. Bianchi-Scarrà)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; National Institute Of Environmental Health Sciences, USA; Università di Trento; Università di Genova

Background

Le risposte cellulari a cambiamenti del loro microambiente spesso coinvolgono la modulazione di vaste reti trascrizionali, che si ottiene attraverso l'attivazione di molteplici cascate di segnalazione che regolano l'attività di specifici fattori di trascrizione sequenza-specifici. Alterazioni a livello di varie componenti di questi processi di regolazione genica sono associate e contribuiscono alla genesi dei tumori. Da studi recenti appare evidente l'alto livello di interazione funzionale esistente fra diverse famiglie di fattori di trascrizione, che influenza gli specifici programmi trascrizionali indotti in risposta a particolari situazioni di stress. Inoltre, è stato evidenziato come fattori di trascrizione sequenza-specifici regolino la trascrizione genica a più livelli, fra loro correlati, dalla stimolazione dell'inizio della trascrizione, alla regolazione della fase di elongazione dei trascritti, alla maturazione del trascritto e regolazione della sua stabilità e potenziale di traduzione. A questi livelli di controllo contribuiscono le molteplici interazioni proteina-proteina dei fattori di trascrizione, segnali epigenetici indirettamente coordinati dal fattore di trascrizione attraverso cofattori che vengono reclutati ai promotori bersaglio, ma anche la modulazione di microRNA, la cui trascrizione è direttamente o indirettamente influenzata dal fattore di trascrizione e che contribuiscono all'instaurarsi di circuiti di regolazione fine, trascrizionale e post-trascrizionale. Da un lato questi risultati stimolano ad ampliare la nostra conoscenza dei meccanismi fondamentali alla base di questi processi, ma al tempo stesso indicano che alterazioni nella regolazione delle risposte cellulari a stress possano avere come causa genetica mutazioni o polimorfismi presenti anche nelle porzioni non codificanti dei geni del cancro, come il 5' e 3'UTR o le sequenze promotrici.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il progetto che presentiamo si prefigge di perseguire alcuni obiettivi specifici che rappresentano l'estensione naturale di attività di ricerca in corso nella nostra unità e che si avvalgono di una ottima rete di collaborazioni che raccoglie competenze diverse e complementari. In particolare, ci prefiggiamo di approfondire lo studio dell'interazione funzionale tra la famiglia di fattori di trascrizione p53 ed i recettori per gli estrogeni, mediata da sequenze responsive in-cis presenti in particolari promotori bersaglio. Ci prefiggiamo inoltre di studiare la regolazione p53-dipendente di un gruppo di microRNA e di valutare il ruolo di questo gruppo di microRNA nella regolazione di RNA messaggeri bersaglio che codificano per proteine che possono a loro volta influenzare negativamente o positivamente le funzioni della p53 stessa. Intimamente correlato a questo secondo obiettivo intendiamo studiare l'impatto funzionale e biologico di SNPs presenti a livello del sito di interazione del p53-miR con il suo target mRNA, in prospettiva dell'eventuale disegno di studi caso-controllo volti a valutare il ruolo di questi SNPs sul rischio di sviluppare neoplasie. Infine, ci prefiggiamo di sviluppare saggi funzionali per chiarire il significato clinico di mutazioni nel 5'UTR di p16/INK4a, trovate in associazione al melanoma familiare.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Questo progetto porterà all'identificazione di geni codificanti e microRNA la cui trascrizione è modulata direttamente dalla p53 o in maniera concertata da p53 ed i recettori per gli estrogeni, due famiglie di fattori di trascrizione che svolgono un ruolo chiave nei tumori. Inoltre verranno identificati circuiti di regolazione trascrizionale e post-trascrizionale che contribuiscono alla regolazione di p53 nell'ambito delle risposte a stress cellulari, compresa la valutazione dell'impatto di variazioni inter-individuali (SNPs) nei moduli di regolazione di questi circuiti. Queste conoscenze si tradurranno nell'identificazione di nuovi geni del cancro, nella comprensione dell'impatto funzionale di mutazioni in porzioni non codificanti di geni associate a tumori, fornendo indicazioni rilevanti per lo sviluppo di terapie personalizzate.

Programmazione 2009-2001

Descrizione delle attività 2009-2011, con dettaglio delle attività e dei risultati attesi nel primo anno.

Nel primo anno di attività perseguiremo i seguenti obiettivi specifici:

- 1) Cooperazione trascrizionale tra p53 e recettori degli estrogeni (ER): ruolo delle specifiche sequenze in cis nella cooperazione ed effetto di diverse combinazioni di trattamenti che attivano sia p53 sia gli ER; analisi con microarray per identificare geni che rispondono in modo selettivo all'attivazione concertata di p53 e ER.
- 2) Sviluppo di plasmidi reporter in linee cellulari derivate da melanoma per valutare il possibile effetto trascrizionale e post-trascrizionale di mutazioni nel 5'UTR di p16/INK4a, combinando misure di attività enzimatica con quantificazione relativa del messaggero, analisi con reporter bicistronici per la valutazione di regolazioni della traduzione cap-indipendente, e utilizzo di polisomal profiling come surrogato dell'analisi quantitativa dell'effetto delle mutazioni 5'UTR sui livelli proteici partendo da cellule di pazienti eterozigoti per le mutazioni stesse o da condizioni sperimentali che mimino la condizione di eterozigosi osservata nei pazienti.
- 3) Valutazione del controllo trascrizionale diretto da parte della famiglia p53 di un gruppo di 13 microRNA, predetti in silico come bersaglio per la presenza di sequenze responsive a p53. Utilizzeremo saggi funzionali in lievito ed in cellule umane per verificare il potenziale di transattivazione di p53, p63 e p73 nei confronti di queste sequenze responsive e promotori miR. Valuteremo anche la responsività dei miR stessi a trattamenti che modulino l'attività di p53 in cellule. Successivamente, valuteremo il ruolo di questi miR sulla funzionalità di mRNA bersaglio, anch'essi predetti in silico con software sviluppati dal nostro collaboratore Dr Jegga.

Track record

Menendez D.-Inga A.-Resnick MA.

The biological impact of the human master regulator p53 can be altered by mutations that change the spectrum and expression of its target genes.

Mol. Cell. Biol. 26(6):2297/2308, 2006

Menendez D.-Krysiak O.-Inga A.-Krysiak B.-Resnick M.A.-Schoenfelder G.

A SNP in the flt-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(5):1406/1411, 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(6):417/423, 2007

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

Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr. Watson.

Oncogene 26(15):2191/2201, 2007

Menendez D.-Inga A. Snipe J.-Krysiak O.-Schoenfelder G.-Resnick MA.

A SNP in a half-binding site creates p53 and estrogen receptor control of VEGFR-1.

Mol.Cell.Biol. 7(7):2590/2600, 2007

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

Functional evolution of the p53 regulatory network through its target response elements.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(3):944/949, 2008

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

Noncanonical DNA Motifs as Transactivation Targets by Wild Type and Mutant p53

PLoS Gene. 6:e1000104, 2008

Reamon-Buettner S.M.-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(10):1397/1405, 2008

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: Alberto Inga, 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

Programmazione 2009-2001

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 contempo 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 pathway 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 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)

Descrizione delle attività 2009-2011, con dettaglio delle attività e dei risultati attesi nel primo anno

Due sono i filoni da seguire in questo triennio. Il primo riguarda la valutazione e la caratterizzazione dell'effetto genotossico di Me-lex in termini di mutazioni (1), ed in particolare induzione di grandi delezioni, riarrangiamenti (2) sia in lievito, che in cellule di mammifero (con un approccio molecolare prima e di citogenetica classica poi (3)). Il secondo riguarda invece lo studio degli effetti genetici indotti da una singola lesione specifica introdotta in un contesto di sequenza particolare (solo in lievito)(4). Più nel dettaglio:

Programmazione 2009-2001

- 1) In lievito si completerà prima lo studio del ruolo di possibili DNA Polimerasi nel processo di fissazione delle mutazioni valutando il ruolo di Pol4 sulla mutagenicità e citotossicità di Me-lex in diversi background genetici (ber-, t1s-).
- 2) Al fine di valutare e caratterizzare l'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 diversi background genetici su eventi di ricombinazione. Per far ciò, si utilizzerà un sistema di reversione dell'auxotrofia per la lisina. In pratica si prevede di trattare in vitro con Me-lex un plasmide contenente: il gene LYS2 inattivato mediante l'inserzione di 2 sequenze Alu (in orientamento inverted repeats) e separate da 12 nucleotidi, oltre al marcatore URA3. Siccome le sequenze Alu contengono potenziali siti di legame per Me-lex, ci aspettiamo che Me-lex le danneggi. Una volta purificato, il plasmide danneggiato verrà trasferito in ceppi con diverso genotipo. I ceppi aploidi sono lys- visto che contengono tutti l'allele lys2-8 (inattivo per mutazione puntiforme). I ceppi trasformati col plasmide danneggiato possono revertire a Lys+ solo per ricombinazione tra gli alleli LYS su plasmide e cromosoma. La conta dei trasformanti Lys+ ci darà una misura dell'induzione di eventi di ricombinazione. Questo approccio verrà ripetuto in ceppi di lievito con diversi background genetici (ber-, t1s-, recombination-).
- 3) In cellule di mammifero si valuterà la capacità ricombinogena di Me-lex utilizzando pannelli di linee cellulari di hamster, proficienti (CHO-9) o deficienti in specifiche funzioni riparative (EMC11- xrcc1 ber deficient; XRC1, xrcc7 recombination deficient). Il primo approccio sarà quello di determinare lo spettro di mutazione indotto da Me-lex in cellule ber- e determinare se effettivamente gli eventi molecolari ricollegabili a ricombinazione aumentino rispetto ad un contesto ber+ (Russo et al, submitted). In seconda battuta, verranno determinati nello stesso pannello di linee cellulari, l'entità dello scambio dei cromatidi fratelli (SCE) e il test del micronucleo (MN) indotti da Me-lex.
- 4) Al fine di studiare gli effetti biologici di lesioni indotte da Me-lex in maniera ancora più puntuale abbiamo deciso, di concerto con il Prof. Gold, di posizionare una singola lesione in un singolo contesto di sequenza per poi studiare i suoi effetti biologici sia a livello biochimico (e.g. replicazione in vitro con proteine purificate- B.Gold) che in vivo (saggi in lievito). Purtroppo la 3mA è una lesione talmente instabile ($t_{1/2}=0.5h$ a 37°C in ssDNA; il legame glicosidico labilizzato provoca il rilascio della base modificata con la formazione di un sito abasico) che non può essere inserita chimicamente in un oligonucleotide. Siamo quindi stati obbligati ad scegliere di utilizzare un analogo stabile della 3mA, la 3metil-3deaza-adenina (3m-deA) che grazie alla sostituzione dell'Azoto in posizione 3 dell'adenina con un Carbonio non può più andare incontro a labilizzazione del legame glicosidico. La 3m-deA è una forma chimicamente stabile del sito abasico (derivato tetraidrofuranico) verranno introdotte in un plasmide (pELUf1) in un contesto di sequenza (5'-CAAAC-3') che in passato abbiamo caratterizzato come hotspot di mutazione indotta da Me-lex nel cDNA di p53. Il plasmide contiene un gene URA3 inattivato dalla sequenza portante la lesione, e un marker selezionabile LEU2. Il plasmide verrà trasfettato nei ceppi di lievito con diversi background genetici (ber-, t1s-, recombination-), e i cloni di interesse verranno selezionati in piastre contenenti l'acido fluoroorotico (ura3- sono 5-FOA resistenti) in assenza di leucina (per selezionare i Leu+). I trasformanti verranno quindi caratterizzati a livello molecolare attraverso digestioni con enzimi di restrizione specifici diagnostici di specifici eventi a livello della incorporazione di fronte alla lesione (eventi di TLS) e mediante sequenziamento diretto.

Attività previste per il primo anno di programmazione:

- costruzione di ceppi che siano deficienti per specifiche polimerasi (e.g. Pol4) note per essere necessarie per la sintesi del DNA di fronte ad una lesione altrimenti letale, con conseguente fissazione della mutazione
- valutazione dell'influenza della delezione di POL4 sulla sopravvivenza di plasmidi danneggiati con Me-lex in diversi background genetici
- determinazione dello spettro di mutazione indotta da Me-lex al locus HPRT in una linea cellulare deficiente per i processi di Base Excision Repair (EMC-11)
- analisi dello spettro di mutazione in EMC11 e confronto con quello precedentemente ottenuto nella linea parentale CHO-9.

Track record

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 7:431/438, 2008

Russo D.-Fronza G.-Ottaggio L.-Monti P.-Inga A.-Gold B.-Menichini P.
Molecular analysis of mutations induced by Me-lex, a sequence selective N3-adenine methylating agent, at the HPRT locus in Chinese Hamster Ovary cells.
Mut. Res. Fund. Mol. M. submitted

Monti P.-Traverso I.-Menichini P.-Inga A.-Ottaggio L.-Russo D.-Gold B.-Fronza G.
Mutagenicity of N3-methyladenine: a multi translesion polymerase affair.
Submitted

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

Programmazione 2009-2001

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Guido Frosina

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.

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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Nel corso del triennio verranno perseguiti i seguenti obiettivi:

1 - Caratterizzazione dei difetti da rimozione del danno 8-oxo-dG in linee cellulari e tessuti animali riconducibili a eventi patologici associabili a processi cancerogenici ed invecchiamento. Le patologie esaminate sono: a) la malattia di Huntington, b) la anemia di Fanconi (FA), c) la sindrome di Cockayne.

Programmazione 2009-2001

Come obiettivi perseguibili nel corso del primo anno si ha: a) in un sistema di topo transgenico, modello associato alla malattia di Huntington, la overespressione di MTH, enzima responsabile di attività 8-OHdGTPasica, verrà valutata in termini di protezione dello stato patologico indotto da trattamento con acido 3-nitropropionico e da paraquat: caratterizzazione del danno al DNA mitocondriale e all'RNA. Possibili implicazioni nell'evoluzione patologica; b) caratterizzazione delle capacità di riparazione di addotti ossidati a pirimidine (5-idrossi-deossiadenuina (5oxo-dA)) in linee cellulari affette da sindrome di Cockayne ed in linee cellulari corrette; c) i deficit a carico del metabolismo energetico e mitocondriale, evidenziati nei recenti studi su questa patologia, vengono perseguiti mediante la caratterizzazione delle vie apoptotiche in linee cellulari normali ed affette da FA.

2 - nel contesto di sistemi modello in colture cellulari verrà valutata, nell'ambito della instabilità genomica come modello di de regolazione pro-cancerogena, la sovraespressione 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 overespressione 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. Obiettivi del primo anno. Nel corso del primo anno verranno effettuate analisi sulle differenti linee cellulari per verificare gli effetti della sovra espressione di hNOX1.

3 - La microgravità, come agente di stress fisico, viene valutata come strumento di alterazione della regolazione metabolica. Nei lavori in corso stiamo valutando come la microgravità comporti alterazioni differenti in linee cellulari normali e trasformate. Questi dati vengono anche utilizzati per la valutazione del potenziale cancerogenico di linee cellulari, quali l'anemia di Fanconi, per le quali un evidente stato di trasformazione non può essere definito. Nel corso del primo anno verranno eseguiti esperimenti con differenti linee cellulari per valutare l'inibizione di specifiche pathways apoptotiche in seguito al trattamento di cellule in coltura con agenti che interferiscono sulla polarizzazione della membrana mitocondriale. Tali misure vengono effettuate soprattutto in citofluorimetria.

4 - NP. Sono in fase di preparazione progetti per la valutazione dei potenziali di tossicità (valutata mediante l'induzione di uno stress ossidativo) di alcune classi di NP. Simili progetti hanno l'esigenza di una profonda integrazione nelle competenze tra biologia cellulare e esperti nella analisi chimica delle NP. A tale scopo sono in fase di selezione gruppi adeguati per l'integrazione con le competenze del nostro gruppo. Obiettivo del primo anno: valutazione del potenziale tossico di Quantum Dots (QD) in linee cellulari in coltura continua. L'impiego di queste particolari NP pone meno problemi, rispetto ad altre particelle, di stabilità del materiale e dunque non necessita l'integrazione tra competenze di biologia e fisica.

Track record

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, 2006

Blasi MF.-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

D'Errico M.-Parlanti E.-Teson M.-Bernardes de Jesus B M.-Degan P.-Calcagnile A.-Jaruga P.-Bjoras M.-Crescenzi M.-Pedrini A M.-Egly J-M.-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

Pallardó FV.-Degan P.-d'Ischia M.-Kelly FJ.-Zatterale A.-Calzone R.-Castello G.-Fernandez-Delgado R.-Dunster C.-Lloret A.-Manini P.-Pisanti MA.-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 MR.-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.-Maccocci L.-Martini F.-Scattei M.-Mariottini P.-R. Amendola.
Chronic sub-lethal oxidative stress by spermine oxidase overactivity induces continuous DNA repair and hypersensitivity to radiation exposure.
BBA Mol. Cell Res. 1773(6):774/783, 2007

D'Errico M.-Parlanti E.-Teson M.-Degan P.-Lemma T.-Calcagnile A.-Iavarone P.-Jaruga P.- Ropolo M.-Pedrini A.M.-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

Degan P.-d'Ischia M.-Pallardo FV.-Zatterale A.-Brusco A.-Calzone R.-Cavalieri S.-Kavakli K.-Lloret A.-Manini P.-Pisanti MA.-Vuttariello E.-Pagano G.
Glutathione levels in blood from ataxia telangiectasia patients suggest in vivo adaptive mechanisms to oxidative stress.
Clin. Biochem. 40(9-10):666/670, 2007

Monticone M.-Tonachini L.-Tavella S.-Degan P.-Biticchi R.-Palombi F.-Puglisi R.-Boitani C.-Cancedda R.-Castagnola P.

Programmazione 2009-2001

Impaired expression of genes coding for reactive oxygen species scavenging enzymes in testes of Mtrf1/Chppr-deficient mice.
Reproduction 134(3):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. U S A 104(43):17010/17015, 2007

Ropolo M.-Degan P.-Foresta M.-D'Errico MR.-Lasigliè 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 E.coli formamidopyrimidine DNA glycosylase.
Free Radic. Biol. Med. 42:1807/1817, 2007

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

Zatterale A.-Kelly FJ.-Degan P.-d'Ischia M.-V Pallardó F.-Calzone R. Dunster C.-Lloret A.-Manini P.-Cogulu O.-Kavakli K. -Pagano G.
Oxidative stress biomarkers in four bloom syndrome (BS) patients and in their parents suggest in vivo redox abnormalities in BS phenotype
Clin. Biochem. 40(15):1100/1103, 2007

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(3):332/342, 2008

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.
PloS Genet. 4(11):e1000266, 2008

Izzotti A.-D'Agostini F.-Balansky R.-Degan P.-Pennisi TM.-Steele VE.-De Flora S.
Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA alterations in heart and aorta.
Mutat. Res. 644(1-2):38/42, 2008

Lloret A.-Calzone R.-Dunster C.-Manini P.-d'Ischia M.-Degan P.-Kelly FJ.-Pallardó FV.-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(4):495/503, 2008

Russo M.T.-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(10):4372/4379, 2009

Capitolo di libro

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 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: Alberto Inga, 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)

Programmazione 2009-2001

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 specificamente) 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 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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

L'attività nel triennio verterà in generale su:

- caratterizzazione funzionale di mutanti p53 mediante una serie di saggi funzionali nel lievito *S. cerevisiae* (determinazione della capacità transattivante in diversi ceppi reporter con elementi p53 responsivi presenti nelle regioni regolatrici di geni effettori di p53 noti da più tempo ma anche quelli di più recente scoperta (e.g. mir34a); determinazione dell'abilità dei mutanti di abrogare le funzioni della proteina selvatica, es. dominanza). Il pannello di mutanti conterrà principalmente alleli trovati a livello germinale. Si estenderà la caratterizzazione anche a isoforme selvatiche di p53 (e.g. p53 beta), e a forme selvatiche o mutate di p73.
- Verifica dell'ipotesi che la caratterizzazione funzionale dei mutanti di p53 (di origine germinale) permetta di predire l'out-come clinico dei pazienti con particolare attenzione alla casistica dei portatori di mutazioni germinali di p53 in letteratura (IARC database) e in Liguria (collaborazione con L. Varesco, V. Capra e M.L. Garré).
- Determinazione dell'effetto di varianti polimorfiche di geni appartenenti al pathway di p53 (e.g. SNP309 MDM2) nella suscettibilità allo sviluppo di tumori (pancreas, melanoma in collaborazione con G. Bianchi Scarrà, L. Bonelli; neuroblastoma in collaborazione con G.P. Tonini, R. Haupt).

Programmazione 2009-2001

In particolare per il 2009 ci prefiggiamo di

- costruire attraverso un approccio di mutagenesi sito-specifica il pannello di 103 alleli presenti nella banca dati dello IARC -mutazioni p53 germinali
- costruire una serie di ceppi reporter di lievito con nuovi elementi responsivi (e.g. mir34a) che controllano l'espressione del gene reporter
- effettuare l'analisi di transattivazione degli alleli nei ceppi reporter
- effettuare la valutazione di SNP in almeno una delle patologie tumorali in studio nell'ambito di collaborazioni con l'Università di Genova o con il Gaslini).

Track record

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

Increased risk of colorectal adenomas in Italian subjects carrying the p53 PIN3 A2-Pro72 haplotype.
Digestion 74(3-4):228/235, 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(5):1276/1287, 2007

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

transcriptional functionality of germline p53 mutants influences cancer phenotype.

Clin. Cancer Res. 13(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. *Pediatr. Blood Cancer* 52:303/304, 2008

Perfumo C.-Parodi S.-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

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; profilassi; 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 e Biostatistica (D.F. Merlo); S.C. Immunologia (A. Poggi); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (A. Zunino)

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); S.C. di Anatomia ed Istologia Patologica, A.O. Santa Corona, Pietra Ligure, Savona (S. Sola; A. Vitali); Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica, Università di Genova, (R. Spaziantè; G. Zona); Istituto Genetica Molecolare, Consiglio Nazionale Ricerche, Pavia (E. Botta; M. Stefanini)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Istituto Superiore Sanità, Programma Malattie Rare; Compagnia di San Paolo; Programma Oncologia; MIUR, Fondo Investimenti Ricerca Base Internazionalizzazione

Programmazione 2009-2001

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.
- 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.

Programmazione 2009-2001

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 .

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

1. Valuteremo se il trattamento con AZD7762, CP466722 ed altri inibitori dei checkpoint del ciclo cellulare da soli o in combinazione possa selettivamente sensibilizzare le cellule staminali di glioma a radiazione ionizzante e temozolomide.
2. Studieremo proteine di riparazione eterologhe che proteggano cellule umane normali o prelevate da pazienti con specifiche patologie dal danno ossidativo al DNA

Dettaglio delle attività

- Isolamento di linee cellulari staminali di glioma. Biopsie tumorali da 10 pazienti adulti e 10 pediatriche con diagnosi di glioblastoma multiforme, grado WHO IV, saranno recuperate dopo aver ottenuto il relativo consenso informato. I pazienti saranno reclutati presso il Dipartimento di Neurochirurgia dell'Ospedale Galliera di Genova (Dr. P. Severi) e dall'Unità Operativa di Neurochirurgia dell'Istituto G. Gaslini di Genova (Dr. A. Cama). Le biopsie saranno immediatamente poste in ghiaccio e processate per l'isolamento delle cellule staminali di glioma. Due linee pediatriche e cinque da adulto verranno isolate durante il primo anno.
- Purificazione di cellule CD133+. Sarà ottenuta mediante microbiglie CD133/1 Miltenyi, in conformità a quanto prescritto dalla ditta produttrice (Miltenyi Biotech). Verrà effettuata su 2 linee da adulto durante il primo anno.
- Analisi morfologica con marcatori. Verrà effettuata su 5 linee da adulto durante il primo anno.
- Studio del ciclo cellulare, apoptosi e tempo di raddoppiamento della popolazione cellulare. Verrà effettuata su 5 linee da adulto durante il primo anno.
- Attivazione di Chk1 e Chk2 chinasi. Cellule CD133+ e CD133- isolate da linee staminali di glioma saranno trattate con IR (3 Gy) per indurre danno al DNA. Lo stato di attivazione dei checkpoint sarà valutato un'ora più tardi. Verrà effettuata su 2 linee da adulto durante il primo anno.
- Determinazione delle alterazioni del cariotipo. Verrà effettuata su 5 linee da adulto durante il primo anno.
- Sensibilizzazione in vitro. Il tasso di sopravvivenza cellulare sarà valutato mediante il saggio MTT (Sigma In Vitro Toxicology Assay kit-MTT based) secondo le istruzioni della ditta fornitrice. Non verranno analizzate linee cellulari durante il primo anno.
- Caratterizzazione del ruolo delle proteine CS nella riparazione delle pirimidine ossidate. Verrà effettuata durante il primo anno di progetto.
- Caratterizzazione del ruolo delle proteine CS nella riparazione delle rotture del DNA a singolo filamento. Durante il primo anno verranno iniziati gli studi su questo punto.
- Identificazione di proteine della riparazione eterologhe la cui espressione possa accelerare la riparazione del danno ossidativo ed eventualmente revertire i difetti di riparazione osservati in CS. Durante il primo anno verrà studiata la proteina endonucleasi III (NTH) di E. coli che ripara efficacemente le pirimidine ossidate. Successivamente verrà analizzata la proteina endonucleasi IV (NFO).

Track record

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 MR.-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, P.-Jaruga P.-Ropolo M.-Pedrini A.M.-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.

Tumor suppression by DNA base excision repair.

Mini Rev. Med. Chem. 7: 727/743, 2007

Frosina G.

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

Programmazione 2009-2001

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

Ropolo M.-Degan P.-Foresta M.-D'Errico MR.-Lasigliè 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 E.coli formamidopyrimidine DNA glycosylase.
Free Rad. 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

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. 8:2009, in press

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

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

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

Capitolo di libro

Frosina G. -Cappelli E.-Ropolo M.-Fortini P.-Pascucci B.-Dogliotti E.
In vitro base excision repair assay using mammalian cell extracts.
In: "Methods in Molecular Biology. Vol. 314: DNA Repair Protocols: Mammalian Systems", Second Edition.Henderson D.S. Editor.
Humana Press Inc, Totowa, p. 377/396, 2006

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, Alberto Inga, Debora Russo

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)

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.

Programmazione 2009-2001

-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 forza replicativa, inducendo rotture nel DNA e quindi fragilità cromosomica. Piccole molecole con alta affinità e 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).

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Nel primo anno di attività perseguiremo i seguenti obiettivi:

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

In questa fase valuteremo se il trattamento con PRIMA-1 è in grado di indurre autofagia o senescenza, quali meccanismi alternativi di morte cellulare. L'autofagia sarà valutata quantificando la formazione di vescicole acide dopo

Programmazione 2009-2001

colorazione vitale con arancio di acridina. Inoltre verranno studiati i livelli di proteine coinvolte nell'autofagia come la Beclina e la MAP LC3-II. L'induzione di senescenza verrà valutata con il saggio per la SA- β -gal; sarà utilizzato anche un saggio quantitativo con la fluorescein di- β -D-galactopyranoside (FDG) o con 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUG). Per studiare più in dettaglio la correlazione tra status di p53 e sensibilità a PRIMA-1, faremo esperimenti di RNAi. Verranno effettuate transfezioni stabili e transienti e i livelli di p53, dopo RNAi, verranno valutati tramite western blot. Sui cloni in cui la p53 non sarà rilevata, si effettueranno esperimenti di proliferazione a breve (MTT) e lungo (colony-forming assay) termine. L'apoptosi sarà studiata attraverso la quantificazione del cleavage di PARP, analisi al FACS della percentuale di cellule in subG1 e saggi con Annexina V. I saggi per autofagia e senescenza verranno effettuati anche sui cloni con p53 depleta.

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

E' stato osservato che PRIMA-1 e il suo derivato PRIMA-1Met inducono una re-distribuzione di p53 nel nucleolo insieme alle proteine PML, CBP e Hsp70. Queste evidenze suggeriscono che la traslocazione nucleolare della proteina p53 mutata e la sua interazione con alcune proteine come Hsp70 e Hsp90 potrebbero rappresentare un possibile meccanismo di riattivazione di p53 in seguito a trattamenti con PRIMA-1. Attraverso esperimenti di immunocitochimica intendiamo studiare la localizzazione della proteina p53 mutata nel nostro pannello di linee cellulari in seguito a trattamenti con PRIMA-1. I nostri dati preliminari mostrano una localizzazione nucleolare della proteina mutata in cellule SKMes1 in seguito a trattamenti con PRIMA-1 ma non dopo trattamento con adriamicina. Nelle stesse cellule sarà anche valutata 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.

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

Un aspetto importante nell'uso di queste molecole è la loro capacità di agire in sinergia con altri farmaci chemioterapici classici. E' stato infatti dimostrato che PRIMA-1Met, un derivato di PRIMA-1, agisce in sinergia con cisplatino nell'indurre apoptosi e nell'inibire la crescita di tumori in topi SCID. Noi 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. Durante lo svolgimento di questo progetto utilizzeremo anche linee cellulari KO per p53. Sarà studiata l'induzione di apoptosi utilizzando gli endpoints sopracitati e verrà analizzata la modulazione di proteine anti- e pro-apoptotiche (bax, puma, bcl-XL and bcl2). Oltre all'adriamicina, altri farmaci (cisplatino, agenti alchilanti) verranno usati con PRIMA-1 per trovare condizioni di trattamento sinergiche nell'indurre citotossicità e inibizione della proliferazione cellulare.

-Nella fasi successive del progetto ci dedicheremo anche allo studio della citotossicità indotta dalle azacianine. Dal momento che si tratta di composti innovativi, non ci sono ancora dati sugli effetti biologici di queste molecole in cellule umane. Nell'ambito di una collaborazione intrapresa con il Prof. Lobachev e il Prof. Hud, tre di queste molecole, aza3, aza4 e aza5 sono attualmente disponibili nel nostro laboratorio. Esperimenti di citotossicità a breve (MMT assay) e lungo termine (colony-forming assay) verranno condotti su diverse linee cellulari a disposizione del laboratorio (i.e. cellule che esprimono una p53 mutata o selvatica). In base a questi risultati preliminari, valuteremo la possibilità di applicare i saggi di apoptosi, necrosi, autofagia, etc., per studiare l'attività di queste molecole più in dettaglio.

Track record

Catassi A.-Cesario A.-Arzani D.-Menichini P.-Alama A.-Bruzzo 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 Chinese hamster cell line causes defective p53 nuclear localization and abrogates its residual function.
J. Cell. Biochem. 98:1689/1700, 2006

Boffa L.C.-Menichini P.-Bolognesi C.-Cutrona G.-Rondella S.-Damonte GL.-Millo E.-Mariani MR.-Matis S.-Russo D.-Ciliutti P.-Ferrarini M.
Lack of mutagenicity and clastogenicity of a PNA targeted to a regulatory sequence of the translocated c-myc oncogene in Burkitt's Lymphoma.
Mutat. Res. 628:129/137, 2007

Magrini R.-Russo D.-Fronza G.-Inga A.-Ottaggio L.-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