

Programmazione 2009-2011

S.S. Tumori Urologici

Ruolo delle proteine della matrice nucleare nello sviluppo e nella aggressività del carcinoma della prostata

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

Programma: a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Cecilia Balbi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Barboro, Erica Repaci, Debora Carpena

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: carcinoma prostatico; matrice nucleare; hnRNP K; proteomica; biomarcatori

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica B (F. Boccardo, A. Rubagotti); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, B. Spina, S. Salvi); S.C. Oncologia Urologica (P. Puppo, C. Introini); S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi (N. Ferrari)

Altri Enti coinvolti: Istituto per lo Studio delle Macromolecole, CNR, Genova (C. D'Arrigo); Dipartimento di Urologia, Università di Genova (G. Carmignani)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo; Regione Liguria

Background

La medicina molecolare ha avuto nell'ultimo decennio un particolare impulso grazie allo sviluppo di tecnologie innovative quali la genomica e la proteomica; quest'ultima oggi appare la più promettente permettendo lo studio degli effettivi "biological functional end-units" risultanti dai complessi processi trascrizionali e traslazionali della cellula. La ricerca di nuovi biomarcatori tumorali, che possono avere significativi effetti sulla diagnosi, sulla prognosi, sulle opzioni terapeutiche ma soprattutto chiarire i meccanismi che stanno alla base dello sviluppo e della progressione tumorale, sta utilizzando ampiamente una area specifica di questa nuova tecnologia: la proteomica differenziale. Tale approccio si è dimostrato tanto più proficuo quanto più è ristretto ad un compartimento cellulare. E' da diversi anni che il nostro laboratorio ha focalizzato la propria ricerca sulla matrice nucleare (NM) nell'ipotesi che questa possa avere un ruolo chiave nello sviluppo tumorale. La NM è la struttura di sostegno del nucleo e rappresenta un'unità funzionale che svolge un ruolo fondamentale nell'organizzazione spazio-temporale degli eventi di attivazione genica. Cambiamenti nel pattern dell'espressione genica che avvengono durante il processo neoplastico potrebbero dipendere, almeno in parte, da alterazioni nelle funzioni regolatrici esercitate dalla NM: in numerosi tumori umani sono state dimostrate modificazioni sia nella composizione, sia nell'architettura della NM. Studi di proteomica differenziale hanno dimostrato che sono osservabili cambiamenti nel pattern di espressione della NM specifici per tipo di tumore, e che spesso queste modificazioni sono correlate alla progressione neoplastica. La ricerca condotta nel nostro laboratorio ha dimostrato che un gruppo di proteine appartenenti alla NM sono differenzialmente espresse in diversi tumori urologici (carcinoma prostatico e carcinoma muscolo-invasivo della vescica), che la neo-espressione di alcune proteine è correlata con il grado di differenziamento tumorale, ma soprattutto che alcune di queste, hanno un potenziale valore prognostico. In particolare, abbiamo dimostrato che una isoforma acida dell'heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) è esclusivamente presente nei carcinomi prostatici (CaP) e che una sua più elevata espressione all'interno della NM ed un'aberrante localizzazione nel citoplasma sono significativamente associate con una prognosi peggiore. Inoltre abbiamo dimostrato che l'hnRNP K è un possibile mediatore dell'effetto anti-angiogenico svolto dal docetaxel in cellule di CaP dopo trattamento con regime chemioterapico metronomico. L'hnRNP K è una proteina a localizzazione prevalentemente nucleare, coinvolta in numerosi processi della trasmissione del segnale, nella regolazione dell'espressione genica e nel metabolismo dell'RNA. Shi et al. (J Biol Chem 283: 36474, 2008) hanno riportato che questa proteina è coinvolta nella regolazione del recettore dell'androgeno (AR) attraverso la sua interazione con PARP-1 e può servire come una piattaforma stabilizzante per l'attivazione del complesso che governa la stimolazione dell'AR; nel modello utilizzato dagli autori viene dimostrato che il silenziamento dell'hnRNP K determina una diminuzione nell'espressione dell'AR. Inoltre, molto recentemente, è stato riportato che questa proteina agisce come un repressore endogeno nel processo di traslazione dell'AR (Mukhopadhyay NK et al., Cancer Res., 69, 2210, 2009). Entrambi i lavori confermano il ruolo chiave dell'hnRNP K nel processo di cancerogenesi del CaP.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale di questo progetto è lo sviluppo di test non invasivi per la diagnosi, la stadiazione, la prognosi ed il monitoraggio del CaP. La possibilità di utilizzare contemporaneamente un pannello di biomarcatori potrebbe aumentare l'accuratezza del test ovviando ai limiti di ciascun marcatore e consentire di arrivare a valori adeguati per il loro impiego nella pratica clinica.

Obiettivi secondari di questo progetto sono:

- fornire al clinico nuovi parametri per distinguere all'interno dei tumori mediamente differenziati quelli più aggressivi con la finalità di diminuire il numero di pazienti sottoposti ad interventi radicali terapeutici non necessari.

Programmazione 2009-2011

- fornire all'anatomo-patologo nuovi parametri per migliorare la tipizzazione del CaP e per seguire l'evoluzione della malattia.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Il progetto ha una forte componente traslazionale prevedendo una stretta collaborazione tra ricerca di base e ricerca clinica, ciò favorirà un rapido trasferimento dei risultati alla pratica clinica. L'identificazione di specifici biomarcatori che permettano di selezionare pazienti ad alto rischio, soprattutto nelle forme iniziali, consentirebbe di intervenire più efficacemente con il percorso terapeutico più idoneo e di risparmiare ai pazienti a basso rischio inutili e costosi interventi.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Il progetto sarà sviluppato attraverso studi su tessuti umani ottenuti da pazienti sottoposti a prostatectomia radicale; durante tutto il suo svolgimento continueremo ad implementare la banca (appartenente al Centro di Risorse Biologiche dell'IST) di tessuti prostatici non tumorali e tumorali.

Oggi siamo in grado di analizzare l'espressione dell'hnRNP K non solo con tecniche estremamente raffinate e sensibili, ma poco applicabili alla routine dell'analisi clinica, quali l'elettroforesi bidimensionale ad alta risoluzione, ma anche con tecniche utilizzabili routinariamente quali l'immunoistochimica (IIC) su tessuto paraffinato. Purtroppo i campioni di CaP esprimono grandi quantità della proteina, soprattutto nel compartimento nucleare, che non permettono di distinguere tumori a diverso grado di differenziamento. Poiché attraverso l'analisi in Western blot abbiamo determinato che la frazione hnRNP K che meglio correla con il follow-up dei pazienti è quella che rimane legata alla NM, intendiamo mettere a punto una tecnica che permetta di evidenziare, sempre utilizzando l'IIC, solo questa frazione. Il DNA delle sezioni congelate o ottenute dalle inclusioni in paraffina sarà digerito selettivamente e successivi lavaggi con opportuni tamponi solubilizzeranno la frazione di proteina che non è legata alla NM. Intendiamo anche verificare se utilizzando anticorpi diversi contro l'hnRNP K, in particolare anticorpi contro le forme fosforilate, sia possibile ottenere risultati più specifici per i tessuti tumorali evidenziando esclusivamente l'isoforma acida neoesspressa durante la progressione tumorale.

Nel CaP, ad oggi, il parametro che meglio correla con la sopravvivenza è il Gleason score: pazienti con un tumore ben differenziato (Gleason score ≤ 6) hanno una prognosi migliore mentre quelli con tumore poco differenziato (Gleason score ≥ 8) hanno una prognosi peggiore. Pazienti con un tumore mediamente differenziato (Gleason score = 7) hanno una prognosi intermedia. Recentemente è stato suggerito di dividere i Gleason score 7 in due categorie a seconda del pattern primario cioè 3+4 e 4+3; è stato infatti riportato che tumori con un pattern primario 4 sono più aggressivi di quelli con un pattern primario di 3. Ma il Gleason score, soprattutto nei tumori mediamente differenziati, spesso non è un parametro obiettivo e dipende fortemente dalla valutazione dell'anatomopatologo che potrebbe essere notevolmente agevolato se avesse un criterio di giudizio indipendente che lo aiuti a stabilire l'aggressività del tumore. In effetti, dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio, suggeriscono che il contenuto nella NM dell'hnRNP K, per i campioni con Gleason score 7, dipende dall'aggressività del tumore. Intendiamo quindi proseguire, durante questo progetto, l'analisi del contenuto dell'hnRNP K focalizzandoci soprattutto sui pazienti con tumore mediamente differenziato (Gleason 7) per definire se questa proteina può essere un biomarcatore adatto a stratificare questi pazienti in due differenti sottogruppi.

Verificheremo inoltre se è possibile individuare e dosare attraverso tecniche di IIC il contenuto di hnRNP K anche su frammenti agiobiotici e nelle TURP. Inoltre, in collaborazione con la S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi, utilizzando tecniche ELISA, suggeriremo se la proteina è presente anche nel siero di pazienti per poter eventualmente correlare la sua concentrazione con la progressione della malattia.

Durante il primo anno di attività prevediamo di mettere a punto la metodologia per individuare con tecniche di IIC la frazione di hnRNP K che rimane legata alla NM e iniziare ad analizzarne il contenuto in campioni di CaP con Gleason 7.

Track record

Coradeghini R.-Barboro P.-Rubagotti A.-Boccardo F.-Parodi S.-Carmignani G.-D'Arrigo C.-Patrone E.-Balbi C.
Differential expression of nuclear lamins in normal and cancerous prostate tissues.
Oncol. Rep. 15: 609/613, 2006

Barboro P.-Rubagotti A.-Orecchia P.-Spina B.-Truini M.-Repaci E.-Carmignani G.-Romagnoli A.-Introini C.-Boccardo F.-Carnemolla B.-Balbi C.
Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle-invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis.
Cell. Oncol. 30: 13/26, 2008

Benelli R.-Monteghirfo S.-Balbi C.-Barboro P.-Ferrari N.
Novel anti-vascular efficacy of metronomic docetaxel therapy in prostate cancer: hnRNP K as a player.
Int. J. Cancer 124:2989/2996, 2009

Barboro P.-Repaci E.-Rubagotti A.-Salvi S.-Boccardo S.-Spina B.-Truini M.-Introini C.-Puppo P.-Ferrari N.-Carmignani G.-Boccardo F.-Balbi C.
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer.
Br. J. Cancer 100:1608/1616, 2009

Barboro P.-D'Arrigo C.-Repaci E.-Patrone E.-Balbi C.
Organization of the lamin scaffold in the internal nuclear matrix of normal and transformed hepatocytes.
J. Struct. Biol., submitted

Programmazione 2009-2011

Utilizzo di modelli cellulari per la sperimentazione di nuove terapie per il carcinoma prostatico

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

Programma: c - Innovazioni terapeutiche: sviluppo dalle fasi precoci, incluse le correlazioni biologiche, agli studi di efficacia, inclusa la verifica di applicabilità nella pratica clinica

Responsabile scientifico: Paola Barboro

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Cecilia Balbi, Erica Repaci, Debora Carpena

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: carcinoma prostatico; matrice nucleare; Matrix Attachment Regions (MARs); proteomica; innovazioni terapeutiche; ormono-resistenza

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica B (F. Boccardo, A. Rubagotti); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, B. Spina, S. Salvi); S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer); S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi (N. Ferrari)

Altri Enti coinvolti: Istituto per lo Studio delle Macromolecole, CNR, Genova (C. D'Arrigo); Mass Spectrometry Core Facility, Istituto G. Gaslini, Genova (A. Petretto)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo; Regione Liguria

Background

Il carcinoma della prostata (CaP) è considerato tra i principali tumori killer essendo, nei paesi occidentali, al primo posto tra i tumori più frequenti e la seconda causa di morte per tumore nel sesso maschile. In Italia il rischio di avere una diagnosi di tumore della prostata nel corso della vita (fra 0 e 74 anni) è 62‰ mentre il rischio di morire è 8.2 ‰. La sua incidenza ha avuto una crescita notevole portando i tassi a raddoppiare negli ultimi 10 anni; questo è spiegabile soprattutto con la diffusione dell'impiego del dosaggio del PSA (antigene prostatico specifico) come test di screening e la conseguente sovradiagnosi di un elevato numero di tumori asintomatici e destinati a non manifestarsi clinicamente. Inoltre ad oggi non siamo in grado di identificare le neoplasie più aggressive, destinate a causare sintomi clinici e/o ad influire sulla sopravvivenza, da quelle meno aggressive destinate a rimanere latenti per un lungo periodo tempo. Sarebbe importante quindi poter identificare precocemente il grado di aggressività di questa neoplasia per modulare al meglio l'approccio terapeutico. Ad oggi le opzioni terapeutiche per la malattia localizzata comprendono la chirurgia radicale, la radioterapia e la chemioterapia associata o meno all'ormonoterapia. Tuttavia in molti pazienti si verifica una ineluttabile progressione, e anche i pazienti considerati ormono-responsivi possono, col passare del tempo, diventare refrattari a questo tipo di trattamento con una sopravvivenza mediana di circa 12 mesi. Inoltre una scarsa chemiosensibilità, gli alti profili di tossicità dei farmaci utilizzati e la presenza di comorbidità, soprattutto nei pazienti anziani, rendono problematico l'approccio farmacologico a questa neoplasia. Lo studio del pattern di espressione delle proteine up o down regolate durante i trattamenti ormonali, può portare all'identificazione dei pattern di espressione associati alla risposta terapeutica e di conseguenza all'identificazione delle neoplasie più responsive. Tale approccio avrà tanta più probabilità di successo quanto più sarà ristretto ad un compartimento cellulare fondamentale per lo sviluppo tumorale. E' da diversi anni che il nostro laboratorio ha focalizzato la propria ricerca sulla matrice nucleare (NM). Questa struttura subnucleare è coinvolta nel controllo e nella coordinazione dell'espressione genica inoltre numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che la NM è coinvolta nei processi di differenziamento e trasformazione cellulare tanto che la sua composizione proteica può essere considerata come il "fingerprint" cellulare; ma ancora più interessante è il risultato che sono osservabili cambiamenti del pattern di espressione della NM specifici per tipo di tumore, e che spesso queste modificazioni sono correlate alla progressione neoplastica. Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio ci hanno permesso di definire che il pattern proteico delle linee cellulari stabilizzate di carcinoma prostatico umano LNCaP e PC3 è molto simile a quello dei tessuti tumorali ottenuti dopo prostatectomia radicale: più del 70% delle proteine appartenenti alla NM sono sovrapponibili. Queste linee cellulari rappresentano quindi un buon modello per studiare il ruolo delle proteine della NM durante il trattamento con i farmaci. Inoltre è noto che l'interazione tra la NM e la cromatina avviene attraverso specifiche sequenze chiamate MARs (Matrix Attachment Regions). Il legame delle MARs alla NM è un evento dinamico che dipende dal tipo e dallo stadio del ciclo cellulare. Le MARs sono sequenze ricche in AT posizionate vicino alle regioni trascrizionalmente attive del genoma così che la trascrizione inizia nelle regioni della cromatina ancorate alla NM. E' ben conosciuto che il pattern di espressione delle proteine della NM è caratteristico del tipo cellulare e del suo stato differenziale ed analogamente le proteine leganti le MARs potrebbero essere caratteristiche dello stato patologico di uno specifico tessuto. Sono state identificate diverse proteine leganti le MARs; alcune di queste sono drammaticamente up-regolate nelle cellule tumorali ed in particolare la loro espressione è significativamente più elevata nei fenotipi più aggressivi. Queste osservazioni confermano l'ipotesi che modificazioni nell'espressione di alcune proteine leganti le sequenze MARs riflettono lo stadio dello sviluppo tumorale e sono essenziali per il globale cambiamento dell'espressione genica richiesta durante la progressione neoplastica. Dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio indicano che esiste una grande differenza tra il tessuto non tumorale ed il CaP nel set di proteine che legano le sequenze MARs, ma soprattutto all'interno dei diversi tessuti

Programmazione 2009-2011

tumorali le differenze sembrano essere correlate all'aggressività del tumore. Lavori recenti hanno dimostrato che regioni AT ricche, simili alle MARs, sono target critici per i farmaci antitumorali della famiglia del ciclopropilpirrolindolo quali la Bizelesina e l'Adozelesina. Inoltre sono in corso studi per verificare se poliammidi sintetiche, che legano con altissima affinità specifiche sequenze di DNA e che possono essere facilmente veicolate all'interno della cellula avendo un basso peso molecolare, sono in grado di distruggere il legame proteine-MARs nelle cellule trasformate (Nelson S.M. et al. Cell Chrom., 3,2, 2004).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del presente progetto di ricerca è ampliare le conoscenze sui meccanismi del processo di cancerogenesi nel CaP con particolare riferimento al ruolo della NM e delle proteine che legano le sequenze MARs. Il progresso nella conoscenza dei fattori causali e di progressione potrà tradursi nella possibilità di disporre di basi razionali per lo sviluppo sia di nuove strategie terapeutiche (fondate sull'impiego di composti già utilizzati nel trattamento di questa neoplasia quali antiandrogeni ed antiestrogeni) sia di nuovi composti antineoplastici.

Obiettivi secondari sono:

- valutare se le proteine della NM, che sono modulate durante i trattamenti chemioterapici (antiandrogeni ed antiestrogeni) possono essere utilizzate come biomarcatori per ottimizzare le strategie terapeutiche;
- valutare se le proteine della NM che legano le sequenze MARs hanno un ruolo nell'eziopatogenesi del CaP e quindi se la loro modulazione può essere utilizzata per mettere a punto nuove strategie terapeutiche per controllare l'evoluzione della malattia.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Il progetto prevede una stretta collaborazione tra ricerca di base e ricerca clinica: ciò favorirà un rapido trasferimento dei risultati alla pratica clinica che ha una forte necessità di strategie terapeutiche alternative ai trattamenti androgeno-soppressivi nonché di nuovi targets terapeutici in grado di impedire o ritardare l'insorgenza della androgeno-resistenza.

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

Linee epiteliali normali di prostata (RWPE1, AR+) saranno confrontate sia con una linea ormone dipendente (LNCaP, AR+ e ER+) sia con linee ormone indipendenti a diverso grado di malignità (PC3 e DU145) cresciute in mezzo normale, ed in presenza di androgeni. Le cellule ormone sensibili saranno sottoposte a trattamenti con anti-androgeni quali il Ciproterone acetato, un anti-androgeno steroideo che interagisce con la NM e la Bicalutamide, l'anti-androgeno non steroideo utilizzato normalmente come monoterapia per il CaP localmente avanzato. Inoltre sarà valutato l'effetto della co-somministrazione di quest'ultimo con il Tamoxifene, un anti-estrogeno utilizzato normalmente nel trattamento del tumore mammario, che studi preliminari hanno dimostrato avere un effetto positivo sugli effetti collaterali della terapia anti-androgeno, quali la ginecomastia. Gli esperimenti verranno eseguiti in triplicato utilizzando concentrazioni e tempi di coltura differenti. Attraverso tecniche di elettroforesi bidimensionale ad alta risoluzione saranno studiate le variazioni nella composizione delle proteine della NM. Quelle modulate dai farmaci saranno individuate con tecniche di spettrometria di massa associata a Western blot. Particolare attenzione sarà rivolta alla modulabilità della hnRNP K, la proteina della NM, che, come abbiamo precedentemente dimostrato, ha un elevato valore prognostico essendo significativamente correlata con il rischio di progressione biochimica. Alcuni autori hanno inoltre riportato che l'hnRNP K è coinvolta nella regolazione del recettore dell'androgeno (AR) attraverso la sua interazione con PARP-1 (che occorre ricordare è una proteina che lega le MARs) e, come è stato dimostrato molto recentemente, è in grado di agire come un repressore endogeno nel processo di traslazione dell'AR suggerendo un suo possibile ruolo nei tumori androgeno resistenti. Tecniche di proteomica differenziale associate a Southwestern blot bidimensionali, già messe a punto nel nostro laboratorio nel modello sperimentale dell'epatocarcinogenesi del ratto, saranno impiegate per caratterizzare le proteine della NM che legano le sequenze MARs. La sequenza sintetica XmnI di 370 bp, altamente ripetitiva, ricca in A-T e contenete una regione BUR (base unpairing region) verrà utilizzata come sonda per gli esperimenti di legame che saranno sempre condotti in presenza di un eccesso di 500 volte di DNA non specifico come competitore. Tecniche di microscopia confocale saranno utilizzate per definire la localizzazione delle proteine sotto studio e la loro colocalizzazione con il recettore dell'androgeno. Durante il primo anno di attività prevediamo di identificare alcune delle proteine della NM che sono modulate dai trattamenti ormonali e che legano differenzialmente le MARs.

Track record

Coradeghini R.-Barboro P.-Rubagotti A.-Boccardo F.-Parodi S.-Carmignani G.-D'Arrigo C.-Patrone E.-Balbi C.
Differential expression of nuclear lamins in normal and cancerous prostate tissues.
Oncol. Rep. 15:609/613, 2006

Patrone E.-Coradeghini R.-Barboro P.-Parodi S.-D'Arrigo C.-Mormino M.-Balbi C.
SCN⁺ binding to the charged lysines of histones end domains mimics acetylation and shows the major histone-DNA interactions involved in eu and heterochromatin stabilization.
J. Cell. Biochem. 98:869/881, 2006

Barboro P.-D'Arrigo C.-Repaci E.-Bagnasco L.-Orecchia P.-Carnemolla B.-Patrone E.-Balbi C.
Proteomic analysis of the nuclear matrix in the early stages of rat liver carcinogenesis: identification of differentially expressed and MAR-binding proteins.
Exp. Cell. Res. 315:226/239, 2009

Barboro P.-D'Arrigo C.-Repaci E.-Patrone E.-Balbi C.
Organization of the lamin scaffold in the internal nuclear matrix of normal and transformed hepatocytes.
J. Struct. Biol. submitted, 2009

Programmazione 2009-2011

Benelli R.-Monteghirfo S.-Balbi C.-Barboro P.-Ferrari N.

Novel Antivascular Efficacy of Metronomic Docetaxel Therapy in Prostate Cancer: hnRNP K as a player.

Int. J. Cancer 124:2989/2996, 2009

Barboro P.-Repaci E.-Rubagotti A.-Salvi S.-Boccardo S.-Spina B.-Truini M.-Introini C.-Puppo P.-Ferrari N.-Carmignani G.-Boccardo F.-Balbi C.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer.

Br. J. Cancer 100:1608/1616, 2009