

## s.s. Mutagenesi molecolare e riparazione del DNA

### Valutazione di nuovi agenti antineoplastici induttori di specifiche lesioni al DNA

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

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

*Responsabile scientifico:* Gilberto Fronza

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

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

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

*Altre strutture IST partecipanti:* s.c. Anatomia e citoistologia patologica (L. Ottaggio)

*Altri Enti coinvolti:* Department of Pharmaceutical Sciences, University of Pittsburgh, U.S.A. (B. Gold); Georgia Tech Institute, Atlanta, USA (K. Lobachev); Centre for Integrative Biology, Università di Trento (A. Inga), University of Florida USA (S. Tornaletti)

*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 pathways di riparazione del DNA. I risultati ottenuti indicano che le cellule CHO proficienti nella riparazione del DNA presentano una scarsa mutabilità anche se sottoposte ad alte dosi di Me-Lex. Questi dati sono in accordo con i dati di mutagenicità ottenuti in lievito. L'analisi molecolare dei mutanti HPRT- ha evidenziato che: a) la maggioranza delle mutazioni indotte da Me-lex è rappresentata da grosse delezioni (un tipo di mutazione, poco apprezzabile nel saggio di lievito precedentemente utilizzato); b) le mutazioni puntiformi indotte (singole sostituzioni di basi) coinvolgono prevalentemente coppie AT, in sequenze AT ricche, caratteristiche queste perfettamente compatibili con le caratteristiche chimiche di questo nuovo agente antineoplastico.

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

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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

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

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

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

### *Risultati e prodotti 2010*

1) Alla luce dei risultati ottenuti in cellule di Hamster cinese (CHO) è stata valutata la capacità ricombinogena di Me-lex utilizzando linee cellulari di hamster, proficienti (CHO-9) o deficienti in specifiche funzioni riparative (EMC11- xrcc1 ber deficient). In primis si è completato lo spettro di mutazione indotto da Me-lex in cellule ber-. In seconda battuta, è stata determinata l'entità dello scambio dei cromatidi fratelli (SCE) e dei micronuclei (MN) in seguito a trattamento con Me-lex. Le EM-C11 mostrano una sensibilità alla tossicità indotta da Me-lex circa 2.5 volte superiore a quella della linea parentale. Lo spettro di mutazioni spontanee in EM-C11 mostra un'elevata percentuale di delezioni genomiche. Dopo trattamento con Me-lex tale percentuale non varia, ma aumenta significativamente una classe di mutazioni mirate alle zone regolatrici del gene. A basse dosi di Me-lex (50µM) il livello di SCE/cromosoma aumenta di circa 3 volte sopra il background in CHO-9, e dosi più elevate causano un drammatico aumento di MN e di nuclei frammentati. Nelle EMC-11 il background di SCE e MN è molto superiore a quello osservato in CHO-9 e anche basse dosi di Me-lex aumentavano significativamente tali valori. Questi risultati indicano che la mancanza della funzione riparativa di XRCC1 comporta elevate instabilità genomica e che anche bassi livelli di lesioni indotte da Me-lex, i.e. 3-mA, possono esacerbare tale instabilità.

2) La tossicità della 3-mA è stata attribuita all'abilità della stessa lesione di bloccare la replicazione del DNA. Al fine di valutare tale effetto e se esso dipende dal contesto di sequenza abbiamo sviluppato un sistema in vitro in grado portare alla formazione di 3mA utilizzando Me-lex. Sono stati approntati inoltre diversi substrati per saggi di replicazione del DNA in vitro contenenti un analogo chimicamente stabile della 3mA (3-methyl-3-deazaadenina, 3m-c3A), o una lesione di controllo (un sito abasico stabile) localizzate in diverse posizioni di una particolare sequenza nucleotidica (AAAA) trovata come hot spot di lesione e di mutazioni nel gene p53. Si è osservato che la 3-mA e la 3m-c3A mostrano un pronunciato effetto inibitorio sulla replicazione del DNA. Non è stata osservata nessuna influenza del contesto di sequenza sul processo di replicazione per queste due lesioni, cosa che invece è evidente per il sito abasico. Questi risultati indicano che il meccanismo molecolare della mutagenicità della Me-lex precedentemente caratterizzata in sistemi di lievito, possa passare attraverso la formazione della 3mA che, a seguito della sua instabilità produce un sito abasico, vero responsabile della mutagenicità sequenza dipendente osservata.

### *Pubblicazioni*

Russo D.-Fronza G.-Ottaggio L.-Monti P.-Perfumo C.-Inga A.-Iyer P.- Gold B.-Menichini P.  
XRCC1 deficiency influences the cytotoxicity and the genomic instability induced by Me/lex, a specific inducer of N3/methyladenine.  
DNA Repair (Amst) 9:728/736, 2010

Settles S.-Wang R.-Fronza G.-Gold B.  
Effect of N3/methyladenine and an isosteric stable analogue on DNA polymerization.  
J. Nucleic Acids 2010:426505;1/426505;14, 2010

### *Presentazioni a congressi*

Russo D.-Fronza G.-Ottaggio L.-Monti P.-Inga A.-Gold B.-Menichini P.  
XRCC1 deficiency influences the cytotoxicity and the genomic instability induced by ME-LEX, a specific inducer of N3-methyladenine  
Congresso "Environmental Mutagenesis in the North", Oslo 15-18 settembre 2010

Russo D.-Fronza G.-Ottaggio L.-Monti P.-Inga A.-Gold B.-Menichini P.  
XRCC1 deficiency increases cytotoxicity and genomic instability induced by ME-LEX, a sequence selective N3-adenine methylating agent  
Minisimposio SIMA 2010, Roma 15-16 novembre 2010

Monti P.-Menichini P.-Inga A.-Ottaggio L.-Russo D.-Gold B.-Fronza G.  
Role of translesion synthesis polymerases in the mutagenicity of ME-LEX induced lesions  
Congresso "Environmental Mutagenesis in the North", Oslo 15-18 settembre 2010

Monti P.-Menichini P.-Ottaggio L.-Inga A.-Russo D.-Iyer P.-Gold B.-Fronza G.  
Role of Translesion Synthesis Polymerases in the mutagenicity of Melex induced lesions  
Minisimposio SIMA 2010, Roma 15-16 novembre 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

In lievito si cercheranno le condizioni per effettuare un trattamento in vivo con Me-lex. Riuscire in questo intento permetterebbe di valutare in situazioni specifiche e con un approccio più diretto e meno laborioso (rispetto al

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

trattamento in vitro di un plasmide con Me-lex seguito da trasfezione e crescita selettiva) quali geni sono più importanti per la citotossicità e la mutagenicità indotta da Me-lex. Abbiamo in effetti un pannello di ceppi ottenuti da EUROSCARF isogenici tra loro tranne che per delezioni di specifici geni coinvolti in processi di ricombinazione, checkpoints, riparazione per dei mismatch etc.

Intendiamo inoltre valutare l'influenza di una 3m-c3A in due processi fondamentali per la cellula: a) la replicazione del DNA in vivo utilizzando un substrato plasmidico ad hoc e b) la trascrizione in vitro (in collaborazione con la Dr. S. Tornaletti, University of Florida USA). Nel primo caso intendiamo anche valutare l'influenza delle capacità delle cellule di operare sintesi attraverso la lesione (Trans Lesion Synthesis, TLS), utilizzando ceppi proficienti o deficienti nelle diverse TLS di lievito.

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

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

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

*Responsabile scientifico:* Paolo Degan

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

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

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

*Altre strutture IST partecipanti:* s.c. Anatomia e citoistologia patologica (S. Viaggi)

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

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Agenzia Spaziale Italiana; Fondazioni

#### *Background*

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

Le crescenti conoscenze nell'ambito della regolazione molecolare e biochimica dei processi fisiologici hanno recentemente permesso di associare specifici marker e alterazioni fisiologiche ad eventi molecolari alla base di specifiche alterazioni del metabolismo ossidativo.

Perciò la definizione dello stato redox può essere utile nella definizione di uno stato patologico e di aiuto nella definizione diagnostica e prognostica in molte patologie come anche nella definizione di specifici trattamenti terapeutici.

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

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

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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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.

### *Risultati e prodotti 2010*

L'utilizzo delle tecniche per la quantificazione di uno stato di stress e di danno riconducibile ad uno sbilanciamento dello stato red-ox cellulare (o di un organo e di un organismo) in dotazione al laboratorio ha permesso:

1 - La caratterizzazione di uno stato patologico infiammatorio significativo in un modello mouse per la colite ulcerosa ed in un sistema cellulare per la poliposi familiare. Entrambe questi sistemi di indagine sono basati sulla presenza di mutazioni a carico del gene MUTYH coinvolto nei meccanismi di riparazione BER.

2 - Lo sbilancio di attività red-ox caratterizzato in sistemi cellulari ad espressione alterata per il gene KRIT1, coinvolto nella patologia CCM (Malformazioni Cerebrali Cavernose) che predispone a difetti neurologici, emorragie e malformazioni cerebrali.

3 - Infine la caratterizzazione di attività difettive nella riparazione dell'addotto 5-metil-citosina, la modificazione indotta da ossidanti a carico della citosina, ha permesso di caratterizzare, ulteriormente, alcune caratteristiche deficitarie nella sindrome di Cockayne.

Nell'ambito della attività di ricerca focalizzata allo studio della anemia di Fanconi sono in progressione differenti attività:

1 - Lo studio della differente suscettibilità di linee FA rispetto a linee normali e/o neoplastiche al trattamento con differenti inibitori di GSH per una caratterizzazione della biochimica red-ox

2 - La caratterizzazione della espressione delle attività coinvolte nell'apoptosi mediante l'utilizzo di array-blots che permettono la simultanea visualizzazione di 43 attività proteiche

3 - la suscettibilità di cellule FA e linee cellulari normali e/o tumorali nei confronti della microgravità.

Infine nell'ambito dello studio delle nano particelle è in preparazione la stesura di un manoscritto relativo alla attività sperimentale svolta nella caratterizzazione della alterazione delle caratteristiche red-ox indotta dal trattamento di differenti linee cellulari con ossidi di zinco e titanio.

### *Pubblicazioni*

Casorelli I.-Pannellini T.-De Luca G.-Degan P.-Chiera F.-Iavarone I.-Giuliani A.-Butera A.-Boirivant M.-Musiani P.-Bignami M.

The Mutyh base excision repair gene influences the inflammatory response in a mouse model of ulcerative colitis. PLoS One 5(8):e12070;1/e12070;11, 2010

Goitre L.-Balzac F.-Degani S.-Degan P.-Marchi S.-Pinton P.-Retta S.

KRIT1 regulates the homeostasis of intracellular reactive oxygen species. PLoS One 5(7):e11786;1/e11786;22, 2010

Cuccarolo P.-Barbieri F.-Sancandi M.-Viaggi S.-Degan P.

Differential behaviour of normal, transformed and Fanconi's anemia lymphoblastoid cells to modelled microgravity. J. Biomed. Sci. 17:63;1/63;10, 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Nel corso del 2011 sono previste differenti iniziative progettuali nell'ambito delle varie aree di interesse di questa linea di ricerca.

1 - Specificamente per quanto riguarda la caratterizzazione dello stress ossidativo, considerando l'elevata incidenza che un tale sbilancio implica nei confronti della suscettibilità patologica anche nei confronti di patologie oncologiche, appare importante sensibilizzare la comunità scientifica nei confronti di una possibile definizione dei parametri red-ox a livello individuale. E' stato preparato uno studio focalizzato alla possibilità di impiegare un certo numero di dosaggi analitici di semplice impiego e a costi contenuti che permetta la definizione dei parametri fisiologici ed alterati di uno stress ossidativo a livello precoce e pre-genotossico. E' previsto un lavoro di verifica per una iniziativa progettuale in questo senso. La pubblicazione di un manoscritto inerente a questa area di ricerca potrà fornire qualche indicazione sulla percezione di questo problema.

2 - Nel corso del 2010 sono stati scritti due progetti in ambito di caratterizzazione metabolomica per la anemia di Fanconi. La metabolomica possiede caratteristiche per la caratterizzazione di difetti biochimici inerenti ad una fisiologia e ad un metabolismo alterati. Una tale caratteristica è d'altra parte condivisa da molte altre patologie oncologiche e non oncologiche. Il lavoro eseguito per la preparazione dei progetti in ambito metabolomica verrà sfruttato nel corso del 2011 per replicare richieste di finanziamento sul soggetto della anemia di Fanconi ma anche per altre patologie di interesse all'istituto.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

3 – Al di là degli studi di caratterizzazione dello stress ossidativo indotto dalla interazione di nano particelle con i sistemi biologici in vitro in prospettiva si pensa di curare l'interesse allo studio dei sistemi di NP come carriers di farmaci, soggetto per il quale c'è un grande interesse in ambito diagnostico.

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

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Gilberto Fronza

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

*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. Oncopatologia traslazionale

*Altri Enti coinvolti:* National Institute of Environmental Health Sciences, RTP, NC, USA (M.A. Resnick, D. Umbah); Università di Genova (G. Bianchi-Scarrà, V. Andreotti); Istituto G. Gaslini, Genova (ML. Garré, V. Capra, R. Haupt); Centre for Integrative Biology, Università di Trento (A. Inga)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

#### *Background*

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

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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.

### *Risultati e prodotti 2010*

1) Lo SNP309 e NB. Avevamo precedentemente trovato che lo SNP309 nel promotore di MDM2, era un fattore prognostico negativo per bimbi affetti da Neuroblastoma (NB) di stadio 4 ma non per bambini con malattia localizzata. Tale polimorfismo non risultava associato con altre caratteristiche cliniche, comprendenti l'amplificazione di MYCN e la delezione del braccio corto del cromosoma 1. Al fine di definire meglio il coinvolgimento di questo SNP nel NB abbiamo esplorato l'esistenza di associazioni con i principali marcatori tumorali biochimici, quali le concentrazioni urinarie dell'Acido Vanil-Mandelico (VMA) e acido omo-vanillico (HVA) e le concentrazioni sieriche di ferritina e lattato deidrogenase (LDH), in una coorte di 497 bambini affetti da NB, iscritti nel registro italiano dei NB e precedentemente genotipizzati per lo SNP309. I risultati ottenuti mostrano un'associazione tra lo SNP309 ed i livelli sierici di ferritina e LDH in pazienti NB di stadio 4. Questi risultati suggeriscono che il genotipo dello SNP309 può avere un impatto sulle alterazioni del metabolismo energetico nelle cellule di NB.

2) Il potere dominante di alleli mutanti p53 in portatori di mutazioni germinali ha un impatto limitato sugli aspetti clinici dei tumori sviluppati. In analisi precedenti avevamo mostrato che alleli con deficienza severa (SD) risultano associati con sindromi di suscettibilità allo sviluppo dei tumori più severe, un maggior numero di tumori sviluppati rispetto agli alleli con una deficienza funzionale parziale (PD). Visto che i mutanti p53 possono avere effetti Dominanti Negativi (DN) abbiamo affrontato il rapporto tra DN e manifestazioni cliniche. Abbiamo pensato che gli effetti DN potrebbero essere più forti nei casi di cancro associato a mutazioni germinali di p53, situazione in cui l'allele mutante e quello selvatico coesistono sin dal concepimento. Abbiamo costruito 104 alleli mutanti p53 con singole sostituzioni aminoacidiche descritte nel database della mutazioni germinali dello IARC e determinato per ognuno di essi la capacità di (i) transattivazione e (ii) ridurre l'attività dell'allele selvatico (i.e., effetto DN) utilizzando saggi quantitativi in lievito. Le classificazioni funzionali di alleli p53 sono state poi correlate a variabili cliniche (IARC database). Abbiamo confermato che una classificazione basata solo sulla transattivazione è in grado di identificare i casi di cancro familiare con le caratteristiche cliniche più gravi. La classificazione basata sugli effetti DN ci ha permesso di evidenziare associazioni simili, ma non ha rivelato distinte sottoclassi cliniche considerando solo alleli SD. Abbiamo concluso che in portatori di mutazioni germinali, la classificazione degli alleli p53 basata sulla transattivazione sembra più importante di quella basata sugli effetti DN per le correlazioni genotipo-fenotipo.

### *Pubblicazioni*

Parodi S.-Perfumo C.-Garaventa A.-Inga A.-Mazzocco K.-Defferrari R.-Tonini G.P.-Fronza G.-Haupt R.  
MDM2 SNP309 genotype is associated with ferritin and LDH serum levels in children with stage 4 neuroblastoma.  
Pediatr. Blood Cancer 55:267/272, 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

- Partecipare allo sviluppo di un sistema in lievito in grado di investigare efficientemente l'impatto di diversi fattori, quali livelli di espressione, tipo di mutazione, cofattori proteici e piccole molecole con possibili funzioni di modulatori di tali interazioni. Il sistema prevederà 1) un'espressione variabile e finemente modulabile di p53, 2) un gene reporter (Luciferasi) sotto il controllo di un promotore responsivo a p53, 3) un'aumentata possibilità di uptake di sostanze chimiche mediante l'inattivazione di trasportatori di membrana (ABC transporter). Intendiamo valutare interattori quali, MDM2, 53BP1 BRCA1 e altri.

- Valutare, in collaborazione con la Prof.ssa G. Bianchi-Scarrà dell'Università di Genova e la Dr.ssa Bonelli dell'IST, se SNPs nel pathway di p53 modificano l'aggressività nello sviluppo del melanoma cutaneo. Sono pochi gli studi che hanno affrontato questo argomento. In questo studio esploreremo la possibile associazione tra diversi SNPs nel pathway di p53 (p53-P72R, -PIN3, MDM2 -SNP309) e le caratteristiche clinico patologiche di pazienti affetti da melanoma cutaneo.

- Costruire, sulla base della funzionalità superiore rispetto al WT di alcuni mutanti p53 (noti come SuperTransattivanti), i corrispondenti alleli mutanti negli altri partner della famiglia di p53 (p63/p73) e caratterizzare loro funzionalità (transattivazione).

## Riparazione del DNA

*Linea di ricerca:* 1 – Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

*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. Oncologia molecolare e angiogenesi (A. Poggi)

*Altri Enti coinvolti:* U.O. Neurochirurgia, Istituto G. Gaslini, Genova (V. Capra); Dipartimento di Emato-Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova (E. Cappelli); Università di Genova, Dipartimento di Scienze della Salute (A. Izzotti); Department of Radiation Oncology, Emory University School of Medicine, Clifton Road NE, Atlanta, GA, USA (Y.W. Kow); Laboratorio Epidemiologia Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma (E. Dogliotti); Istituto Genetica Molecolare, Consiglio Nazionale Ricerche, Pavia (M. Stefanini); U.O. Neurochirurgia, E.O. Ospedali Galliera, (P. Severi)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* Istituto Superiore Sanità; Compagnia di San Paolo

## *Background*

La Riparazione del DNA è bifronte: da un lato provoca resistenza all'azione antineoplastica di vari agenti chemioterapici, rimuovendo le lesioni citotossiche e causando perdita di efficacia terapeutica; dall'altro, la Riparazione del DNA protegge le cellule normali dal danno al DNA sia di origine interna (ad es. danno ossidativo) che esterna (danno da inquinanti ambientali o radiazioni), avendo quindi un'importante funzione antimutagenica e anticancerogena. La nostra ricerca verterà sui seguenti due aspetti:

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

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

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

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

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Gli obiettivi generali della nostra ricerca sono :

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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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 forza replicativa. Queste caratteristiche potrebbero essere comuni ad altri tumori come le leucemie (Viale et al Nature 2009, 457, 51-56). Le terapie miranti alla reversione del blocco del ciclo cellulare nelle cellule staminali di glioma potrebbero produrre una completa eradicazione del tumore cerebrale. In particolare gli inibitori delle chinasi ATM, Chk1 e Chk2 potrebbero effettivamente sensibilizzare le cellule staminali di glioma a radiazione ionizzante e ad agenti alchilanti permettendo di superare i checkpoint attivati costitutivamente. In conclusione, l'uso di inibitori dei checkpoint del ciclo cellulare potrebbe migliorare significativamente l'efficacia dei trattamenti chemio- e radioterapici dei gliomi.

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

### *Risultati e prodotti 2010*

Nel 2010 abbiamo iniziato lo studio degli inibitori di checkpoint del ciclo cellulare quali agenti sensibilizzanti le cellule staminali di glioma alla radioterapia. Sono state isolate e caratterizzate due linee di glioma di alto grado (Borru e 177) che esprimono livelli molto diversi di markers di staminalità (p.es. CD133, Musashi-1 e Sox-2). Su queste cellule stiamo vagliando nove diversi inibitori dei checkpoints del ciclo cellulare per verificare se qualcuno di essi possa sensibilizzare specificamente le sole cellule che esprimono alti livelli di markers di staminalità (Borru) ma non cellule con bassa espressione di markers di staminalità (177). Abbiamo anche passato in rassegna la letteratura scientifica per fare il punto sul ruolo della riparazione del DNA nella protezione di cellule staminali normali dalla mutagenesi spontanea e nei meccanismi di resistenza di cellule staminali tumorali alla radio- e chemioterapia.

Nel 2010 sono stati condotti ulteriori studi sulla protezione dei tessuti umani dal danno ossidativo tramite espressione di proteine eterologhe. A questo proposito è stato utilizzato il modello patologico offerto dalla Sindrome di Cockayne (CS). Abbiamo chiarito il ruolo delle proteine CS-A e CS-B nella riparazione delle basi pirimidiniche ossidate del DNA. Questo studio è stato eseguito tramite saggi in vitro ed in vivo ed utilizzando fibroblasti derivati da pazienti CS e relativi controlli. Sono stati utilizzati due agenti ossidanti modello: uno chimico (il potassio bromato) ed uno fisico (radiazioni ionizzanti). La risposta di CS al danno ossidativo è stata studiata analizzando: 1. la induzione e riparazione di pirimidine ossidate (5-OHdC) in cellule integre tramite HPLC/ED; 2. l'efficienza di riparazione in cellule lisate incubate con substrati oligonucleotidici contenenti una singola lesione 5-OH-dC. Questi esperimenti hanno dimostrato che le cellule prelevate dai pazienti con sindrome di Cockayne sono difettive nella riparazione delle pirimidine ossidate. Abbiamo inoltre studiato la proteina batterica FPG quale possibile strumento per correggere il difetto di riparazione del danno ossidativo in CS. Abbiamo mostrato nel 2007 che la proteina FPG di E.coli corregge completamente il difetto di riparazione delle purine ossidate (8-oxodG) in ambedue i gruppi di complementazione di CS. Quest'anno abbiamo osservato che la proteina FPG corregge completamente anche il difetto di riparazione delle pirimidine ossidate in CS. Pertanto, l'espressione della proteina FPG corregge il difetto di riparazione di quasi tutte le basi ossidate del DNA in CS, siano esse purine o pirimidine. FPG rappresenta quindi un possibile strumento per tentativi di terapia genica per correggere il difetto di riparazione del DNA in questa sindrome neurodegenerativa. In conclusione questi studi di espressione della proteina FPG in cellule umane possono dare utili indicazioni su come proteggere tessuti umani a rischio di degenerazione e/o trasformazione a causa dell'accumulo di danno ossidativo al DNA.

### *Pubblicazioni*

Foresta M.-Ropolo M.-Degan P.-Pettinati I.-Kow Y.-Damonte G.-Poggi A.-Frosina G.  
Defective repair of 5/hydroxy/2'/deoxycytidine in Cockayne syndrome cells and its complementation by Escherichia coli formamidopyrimidine DNA glycosylase and endonuclease III.  
Free Radic. Biol. Med. 48:681/690, 2010

Frosina G.  
The bright and the dark sides of DNA repair in stem cells.  
J. Biomed. Biotechnol. 2010:845396;1/845396;14, 2010

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Frosina G.-Dogliotti E.-Botta E.-Calcagnile A.-Degan P.-D'Errico M.-Foresta M.-Lemma T.-Narciso L.-Nardo T.-Oneda R.-Orioli D.-Ropolo M.-Stefanini M.

Genetic, molecular and functional characterization of Cockayne syndrome, a rare transcription/repair defective hereditary disease.

Rapporti ISTISAN, 10/2, p. 59-61, 2010

### *Presentazioni a congressi*

Frosina G.

Relazione su invito "Genetic, molecular and functional characterization of Cockayne syndrome, a rare transcription/repair defective hereditary diseases"

3rd International Conference "Rare Diseases and Orphan Drugs", Roma, Feb 22-26, 2010

Frosina G.

Relazione su invito "DNA repair and glioma resistance"

9th meeting of the European Association for NeuroOncology (EANO), Maastricht, The Netherlands, Sept 16-19, 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Nel 2011 definiremo i meccanismi con cui gli inibitori della risposta al danno al DNA alterano la sensibilità di cellule staminali di glioma (Borru) e non staminali di glioma (177). In particolare determineremo le variazioni di ciclo cellulare, velocità di crescita e fenomeni apoptotici indotte dagli inibitori di ATM, Chk1 e Chk2 in cellule irradiate, per determinare quali variazioni correlino con la aumentata o diminuita sensibilità alla radiazione ionizzante.

Passeremo inoltre in rassegna la letteratura per fare il punto sulle nuove terapie che mirano a migliorare la sopravvivenza dei pazienti con glioma, prendendo a bersaglio le cellule staminali tumorali.

Un altro aspetto interessante che studieremo nel 2011 riguarda il ruolo emergente delle proteine della sindrome di Cockayne nel processamento degli intermedi di riparazione (Wong et al, Nucleic Acids Res 35: 4103-4113, 2007) ed il suo possibile coinvolgimento nella neurodegenerazione progressiva. Questa correlazione è già stata dimostrata in altre sindromi, quali l'ataxia telangiectasia (AT), l'ataxia con apraxia oculomotoria di tipo 1 (AOA1) e l'ataxia spinocerebellare con neuropatia assonale di tipo 1 (SCAN1), in cui sono stati identificati specifici difetti nella riparazione delle rotture a singolo filamento (SSB), un tipo di lesione generato dalle specie reattive dell'ossigeno (per una rassegna vedi Rass et al, Cell, 130: 991-1004, 2007). In particolare ci proponiamo di caratterizzare ulteriormente i difetti biochimici e molecolari responsabili dell'aumentata sensibilità agli agenti ossidanti definendo il ruolo delle proteine di Cockayne nel processamento degli intermedi di riparazione, nell'espressione dei geni redox e nel rimodellamento della cromatina.

Infine, nel 2011 studieremo il possibile utilizzo della proteina FPG nella protezione di cellule di trabecolato oculare dal danno ossidativo. La protezione di queste cellule può rappresentare una valida strategia per la prevenzione del glaucoma.

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

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Paola Menichini

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

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

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

*Altre strutture IST partecipanti:* s.c. Anatomia e citoistologia patologica (L. Ottaggio)

*Altri Enti coinvolti:* Scuola Medica, Università di Pisa (M. Masini)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

### *Background*

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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

- 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).

### *Risultati e prodotti 2010*

Abbiamo dimostrato che in cellule tumorali MDA-MB-231 che esprimono la proteina p53 mutata p53R280K, il trattamento con PRIMA-1 induce una significativa localizzazione nucleolare della proteina p53 associata alla sua degradazione in seguito ad ubiquitinazione. Cellule T100, ovvero cellule derivate dalla linea MDA-MB-231 in cui la p53R280K è stata silenziata attraverso "RNA interference" e quindi p53-KD, si sono dimostrate più sensibili al trattamento con PRIMA-1 rispetto alle cellule parentali che esprimono alti livelli di p53 mutata. I nostri risultati indicano

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

che PRIMA-1 può scatenare una via di morte cellulare che induce degradazione delle proteine, inclusa la p53, eliminando di conseguenza una funziona della p53 mutata che conferisce resistenza a PRIMA-1 (Russo D. et al., 2010). Dal momento che le cellule tumorali accumulano spesso alti livelli di p53 mutata, diventando così resistenti al trattamento con chemioterapici classici, PRIMA-1, o molecole da essa derivate, potrebbe rappresentare uno strumento valido per ridurre il livello di p53 mutata e uccidere le cellule tumorali. Questa strategia potrebbe essere vincente specialmente in cellule particolarmente resistenti ai chemioterapici classici. L'analisi al FACS della percentuale di cellule in subG1, la determinazione del "cleavage" di PARP e la valutazione dell'induzione di depolarizzazione della membrana mitocondriale, hanno rivelato che in queste cellule PRIMA-1 non è in grado di indurre apoptosi. Tuttavia, attraverso la quantificazione dell'induzione di vescicole MAP-LC3 e analisi al microscopio elettronico (Dott.ssa M. Masini, Scuola Medica, Università di Pisa) abbiamo dimostrato una forte induzione di autofagia che quindi può rappresentare un meccanismo alternativo indotto da PRIMA-1 (manoscritto in preparazione).

Utilizzando una tecnologia innovativa che permette di determinare in tempo reale sia la proliferazione che la migrazione cellulare (xCELLigence, Roche) abbiamo iniziato lo studio della tossicità di PRIMA-1 e di inibitori dell'autofagia in cellule MDA-MB-231, nelle cellule T100 da esse derivate e in cellule tumorali che esprimono o meno una p53 selvatica (HCT116 p53+/+ e HCT116 p53-/-). L'utilizzo di questo strumento ci ha permesso di misurare interessanti cambiamenti di adesione e migrazione cellulare in cellule p53-KD. Inoltre abbiamo osservato che nonostante PRIMA-1 sia stata identificata come molecola in grado di riattivare la p53 mutata, essa ha anche un'attività citotossica in cellule tumorali che esprimono una p53 selvatica.

### *Pubblicazioni*

Russo D.-Ottaggio L.-Penna I.-Foggetti G.-Fronza G.-Inga A.- Menichini P.  
PRIMA/1 cytotoxicity correlates with nucleolar localization and degradation of mutant p53 in breast cancer cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 402:345/350, 2010

### *Presentazioni a congressi*

Nucleolar localization and degradation of mutant p53 correlate with cell death induced by PRIMA-1 in MDA-MB-231 breast cancer cells  
Relazione al Simposio SIMA "Instabilità genomica e Riparazione del DNA: nuovi paradigmi per la ricerca traslazionale", Roma, 15-16 Novembre 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Le attività previste per il 2011 saranno rivolte allo studio delle seguenti problematiche:

- la caratterizzazione dell'autofagia indotta da PRIMA-1, nelle cellule MDA-MB-231, nelle T100 da esse derivate (p53-KD) e in cellule tumorali che esprimono o meno una p53 selvatica (HCT116 p53+/+ e HCT116 p53-/-). In particolare vorremmo capire: i) se l'autofagia che osserviamo è dipendente dall'espressione di p53 selvatica o mutata e ii) se la tossicità indotta da PRIMA-1 è dovuta a morte cellulare per autofagia
- la definizione della correlazione tra la localizzazione nucleolare di p53R280K, la sua degradazione e la tossicità in seguito al trattamento con PRIMA-1. Utilizzeremo un inibitore del preteasoma, come l'MG132, per verificare se l'inibizione della degradazione della p53R280K causata da questa molecola, determina un cambiamento della localizzazione nucleolare ed eventualmente della tossicità di PRIMA-1. Questo indicherebbe che la localizzazione nucleolare è un evento necessario per la degradazione di p53 mutata e per la tossicità indotta da questa molecola
- l'analisi della capacità di migrazione e invasione cellulare nelle MDA-MB-231, T00 e altre linee cellulari derivate da tumori al seno che esprimono differenti proteine p53 mutate. A questo scopo utilizzeremo lo strumento XCELLigence che permette di valutare in tempo reale sia la proliferazione che la migrazione cellulare. Useremo PRIMA-1 e RITA, due piccole molecole di nuova sintesi che potrebbero modulare l'interazione della p53 con possibili "interattori" ritenuti importanti per la risposta delle cellule tumorali ad agenti chemioterapici (es. 53BP1) e per la modulazione di migrazione ed invasività (es. p63)
- l'analisi della capacità di PRIMA-1 di aumentare i livelli di ROS intracellulari e di formare addotti con i gruppi tiolici della p53 mutata. Tale attività sembra essere alla base della capacità di questa molecola di riattivare le funzioni selvatiche perdute dalla p53 mutata. In collaborazione con P. Degan intendiamo studiare l'induzione di stress ossidativo in seguito a trattamenti con PRIMA-1 in linee cellulari che esprimono p53 mutate.