



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



1. Anagrafica progetto PON AIM

Id. proposta	linea di attività: AIM1892002 – 2
Area	Salute
S.C.	06/N1 “Scienze delle Professioni Sanitarie e delle Tecnologie Mediche Applicate”
S.S.D.	MED/46 “Scienze Tecniche di Medicina di Laboratorio”
Mesi all'estero	6
Tutor	Prof. Giorgio Stassi
Titolo del progetto di ricerca	L' inattivazione epigenetica di p53 come bersaglio terapeutico nelle cellule staminali tumorali del cancro coloretale

2. Descrizione sintetica degli obiettivi generali e degli obiettivi dell'anno in corso

1. Validazione di p53K382me1 come biomarcatore di prognosi tramite l'uso di anticorpi specifici.
2. Studio dei meccanismi epigenetici di inattivazione di p53 nelle cellule staminali tumorali (CST).
3. Sviluppo di inibitori selettivi per riattivare le funzioni di p53 ed indurre differenziamento delle CST.

3. Descrizione dei risultati ottenuti

4. Elenco Pubblicazioni o altri prodotti eseguiti entro l'arco temporale del progetto

5. Elenco altre Pubblicazioni o prodotti



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



6. Descrizione sintetica di eventuali collaborazioni da parte di enti/organismi pubblici e privati esterni per il raggiungimento dei risultati

Il raggiungimento degli obiettivi sarà supportato dalla collaborazione di questo Dipartimento con esperti di fama mondiale che lavorano al National Institutes of Health (N.I.H.), National Cancer Institute (NCI) Bethesda, MD, USA:

Dr. Carol J Thiele, PhD, capo del laboratorio di biologia cellulare e molecolare nel reparto di oncologia pediatrica, esperta di neuroblastoma un tumore pediatrico in cui l'inibizione di SETD8 come meccanismo di riattivazione di p53 è stato identificato;

Dr. Ettore Appella, MD, capo del laboratorio di biologia cellulare nella sezione di immunologia chimica, esperto riconosciuto a livello internazionale del gene oncosoppressore TP53 e tra i primi dieci ricercatori italiani nel mondo per livello di pubblicazioni scientifiche.

7. Descrizione delle attività programmate

Il cancro coloretale è la terza causa di morte per tumore nei paesi occidentali a causa dell'inefficacia delle attuali terapie convenzionali. Molti tumori presentano l'oncosoppressore p53 nella sua forma wt, tuttavia p53 può essere funzionalmente inattivato tramite meccanismi alternativi perdendo la sua capacità di mantenimento dell'integrità genomica. In particolare, nel cancro coloretale il 50-60% dei casi presenta p53 wt, mentre mutazioni di p53 si manifestano come un evento tardivo. Oltre al suo ruolo di soppressore tumorale, p53 è coinvolto nella regolazione di cellule staminali tumorali (CST). Le CST rappresentano una sottopopolazione cellulare dinamica caratterizzata dalla capacità di auto-rinnovamento, dall'overespressione di proteine anti-apoptotiche, da meccanismi di riparo al danno al DNA più pronunciati e da continui cambiamenti genetici ed epigenetici, che sono responsabili della eterogeneità tumorale e della chemioresistenza. Forzare queste cellule a differenziare potrebbe eliminare le caratteristiche proprie delle cellule staminali, che perderebbero la capacità di far crescere il tumore, aumentando la sua sensibilità alle terapie convenzionali. SETD8 è l'unico enzima epigenetico responsabile della mono-metilazione di H4K20me1, una modificazione istonica critica per la regolazione della replicazione del DNA e della condensazione cromosomica durante la mitosi. SETD8 mono-metila anche p53 nella lisina 382 (p53K382me1), inibendo le funzioni pro-apoptotiche e di arresto della crescita cellulare mediate da p53. Recentemente abbiamo identificato SETD8 come regolatore epigenetico cruciale della crescita e del differenziamento delle cellule tumorali. Pertanto, l'inibizione di SETD8 rappresenta una strategia terapeutica mirata ad attivare le funzioni di p53 ed indurre differenziamento delle CST nel cancro colo rettale.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



I livelli di espressione di SETD8 risultano aumentati in campioni derivati da pazienti affetti da cancro coloretale rispetto a soggetti sani. Inoltre, p53K382me1 è espressa nelle cellule presenti nel fronte di invasione tumorale che esprimono CD44v6, un marcatore che identifica le CST metastatiche del cancro coloretale. L'inibizione di SETD8 attiva le funzioni di p53 attraverso la riduzione di p53K382me1, attenuando le capacità proliferative e invasive delle CST. Pertanto, questa metilazione potrebbe rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico nelle CST al fine di ripristinare le funzioni di p53. Ci proponiamo, quindi, di studiare i livelli di espressione di p53K382me1 in una estesa collezione di sezioni in paraffina derivate da pazienti affetti da cancro coloretale per correlare questo potenziale biomarcatore con lo stadio tumorale. Valuteremo, inoltre, il profilo di espressione genica dopo l'inibizione di SETD8 in una collezione di CST per identificare target terapeutici a valle di p53. Testeremo l'efficacia in vitro e in vivo di peptidi e peptidomimetici specifici per l'interazione SETD8-p53. I nostri studi forniranno una migliore comprensione sul ruolo delle alterazioni epigenetiche di p53 nella regolazione della crescita tumorale e della chemioresistenza del cancro coloretale. I risultati ottenuti saranno importanti nel disegnare strategie efficaci per programmare le CST al differenziamento terminale e sensibilizzarle alle terapie standard.

Attività 1. Utilizzando l'anticorpo policlonale già validato, valuteremo sistematicamente i livelli di espressione di p53K382me1 in 377 campioni di tumore del colonretto derivati da pazienti forniti dal National Institutes of Health (NIH) al fine di correlare l'espressione di questo potenziale biomarcatore con lo stadio tumorale. Un'analisi statistica multivariata stabilirà se p53K382me1 è un fattore prognostico indipendente nel cancro coloretale. Risultati preliminari: di nota, i livelli di espressione di SETD8 e p53K382me1 sono elevati in un piccolo gruppo di tumori primari derivati da pazienti affetti da cancro del colon-retto. Inoltre, analizzando un database di campioni tumorali R2 databases (<http://r2.amc.nl/>) i livelli di mRNA di KMT5A (SETD8) sono più elevati nei pazienti affetti da cancro coloretale paragonati ai livelli presenti in soggetti sani. Per migliorare la selezione di pazienti affetti da cancro coloretale esprimenti alti livelli di SETD8 e di p53K382me1 associati ad una prognosi sfavorevole, verrà prodotto un anticorpo monoclonale che riconosce la monometilazione della lisina 382 di p53, e sarà valutato il suo utilizzo come "companion" marker per la prognosi in un ampio spettro di tumori. Questo anticorpo verrà prodotto in collaborazione con il Dr. Ettore Appella (Laboratory of Cell Biology, NCI, NIH).

Attività 2. SETD8 regola i geni a valle della via del segnale di Wnt nelle cellule di mammifero e promuove l'EMT nel tumore della mammella. Questo suggerisce che SETD8 potrebbe avere un ruolo nell'alterata riprogrammazione epigenetica nelle CST, e nelle CST di tumore del colon-retto (CR-CST) in particolare. Pertanto, studiare il meccanismo di inattivazione di p53 nelle CST può portare allo sviluppo di strategie terapeutiche alternative che selettivamente mirano all'esaurimento di questa popolazione. Valuteremo se la metilazione di p53 contribuisce alle particolari caratteristiche che la popolazione delle CST presenta, in 55 CR-CST. Risultati preliminari: l'analisi di immunoblot ha mostrato che 8/11 (72%) delle CR-CST p53 wt esprimono p53K382me1 e che almeno il 50% di tali cellule mostra un alto rapporto p53K382me1/p53. Di nota: in due linee



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



cellulari commerciali che presentano uno stato differenziato, p53K382me1 è espresso a bassi livelli quasi non valutabili, nonostante gli alti livelli proteici di p53. Inoltre, p53K382me1 risulta espresso ad alti livelli nelle CR-CST del fronte invasivo tumorale positive per CD44v6, un marker delle cellule staminali tumorali necessario per il potenziale metastatico. Questo suggerisce che la metilazione di p53 potrebbe giocare un ruolo sinergico nella capacità tumorigenica e metastatica delle CST. Sulla base dei nostri risultati preliminari, analizzeremo la capacità tumorigenica e metastatica delle CST in vitro e in vivo dopo l'inibizione genetica e farmacologica di SETD8. In particolare, dopo l'inibizione di SETD8, valuteremo i cambiamenti nel profilo di espressione genica nelle CR-CST, studieremo se le CST positive per CD44v6 mostrano ancora un'attivazione del pathway di Wnt, della EMT e/ o delle proprietà metastatiche e se queste pathway sono regolate dalla inattivazione di p53.

Sviluppo di inibitori selettivi per riattivare le funzioni di p53 ed indurre differenziamento delle CST. Al fine di inibire specificatamente il legame tra SETD8 e p53 evitando la tossicità dovuta all'inibizione di H4K20me1, particolarmente nelle cellule non tumorali, disegneremo dei peptidi e peptidomimetici specifici per l'interazione SETD8-p53. Questo permetterà lo sviluppo di una nuova generazione di composti per la terapia epigenetica di precisione che mirano a riattivare le normali funzioni dell'oncosoppressore p53 inducendo apoptosi e/o differenziamento delle CST. Risultati preliminari: Il trattamento di 5 linee di CR-CST esprimenti p53 wt con un inibitore specifico di SETD8, UNC0379, inibisce la proliferazione cellulare in maniera dose e tempo dipendente. Di nota, la IC50 biologica di tale composto per le CR-CST che presentano una mutazione nel gene p53, risulta di circa 10 volte più alta, suggerendo che l'inibizione farmacologica di SETD8 usando questa molecola (UNC0379) è più potente nel riattivare p53 piuttosto che nel ridurre H4K20me1. Inoltre, la riduzione dei livelli di p53K382me1 è accompagnata da aumentati livelli proteici di p53 e p21. Gli screening degli inibitori di enzimi epigenetici recentemente condotti hanno utilizzato i peptidi istonici. Tuttavia, la conformazione delle molecole enzimatiche può essere modulata dai loro specifici substrati. Per questa ragione, molti sforzi sono stati fatti al fine di sviluppare un inibitore di SETD8 potente basato sulla modificazione di un peptide come substrato. Supportati da questi risultati recenti, abbiamo disegnato 4 peptidi basati su entrambe le sequenze dell'H4 e di p53 con 6 residui di arginina nella porzione N-terminale. In futuro, aggiungeremo la fluoresceina a questi peptidi per seguire il loro turnover in esperimenti in vitro ed in vivo. Se questa strategia non sarà efficace, svilupperemo uno screening ad alto rendimento dell'attività di SETD8 usando come peptide p53 contenente p53K382me1.