

NUOVE MOLECOLE E PEPTIDI QUALI FARMACI REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE E DELLA RISPOSTA A CHEMIOTERAPICI NEI TUMORI EPITELIALI E CUTANEI

Gerry Melino

Laboratorio di Biochimica, Istituto Dermatologico dell'Immacolata IRCCS, Roma

Base di partenza e rationale

La famiglia di p53 comprende tre membri: p53, p63 e p73. p53 è il gene mutato più frequentemente nei tumori umani. È un fattore trascrizionale, che è attivato rapidamente come risposta a danni genotossici od ad attivazione d'oncogeni, regolando l'espressione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Analogamente a p53, p73 e p63 contengono un dominio di transattivazione (TA), un dominio di legame al DNA (DBD) e un dominio d'oligomerizzazione (*Oligomerization Domain*, OD). La struttura genica di p63 e p73 è molto complessa in quanto entrambi i geni codificano per diverse isoforme e per diverse varianti che derivano da splicing alternativi e da inizi di trascrizione diversi. In particolare, le varianti ΔN mancano del dominio TA e quindi agiscono da dominanti negativi. Dal momento che p53, p63 e p73 sono altamente omologhi, questi geni dovrebbero avere funzioni ridondanti. Infatti, sia p53 che p73 sono in grado di bloccare la crescita cellulare e indurre apoptosi. Conseguentemente, sia p63 che p73 sono coinvolti nella tumorigenesi, in particolare nei tumori epiteliali. Le proteine p53/p63/p73 cooperano nella tumorigenesi regolando l'apoptosi. Lo "status" dei geni della famiglia di p53 è un fattore importante nella prognosi e chemiosensibilità tumorale: l'azione di p63/p73 diventa quindi essenziale nei frequenti casi di inattivazione di p53. Infatti, deregolazioni di p63/p73 inducono resistenza alla citotossicità da chemioterapici.

Similmente a p53, l'espressione di p63 e p73 è mantenuta a bassi livelli nelle cellule di mammiferi, e la loro induzione e attivazione cellulare è principalmente controllata a livello post-traduzionale. Sia p63 che p73 sono ubiquitinati *in vivo* e degradati attraverso la via proteolitica proteasoma-dipendente. Mentre p53 è degradato da mdm2, noi abbiamo scoperto che la degradazione di p63/p73 è regolata da Itch, una ubiquitina E3 ligasi contenente HECT e appartenente alla famiglia Nedd4. Itch ha come bersaglio sia le varianti TAp73 che $\Delta Np73$, tenendo i loro livelli proteici bassi in condizioni normali. Oltre a p63/p73, Itch reprime la via di Hedgehog e dei suoi trasduttori (proteine Gli), la cui attivazione è frequentemente responsabile dell'insorgenza di tumori neuroectodermici.

Oltre ai farmaci anti-Itch per regolare i livelli di p63/p73, genereremo inibitori delle interazioni molecolari di p73. Sono stati identificati peptidi sintetici (che rappresentano la sequenza del dominio di legame specifico al DNA della proteina p73) che interagendo con la proteina p53 mutata ripristinano la funzione apoptotica della proteina p73. Il bersaglio molecolare individuato è rappresentato dal complesso proteico mutp53/p73, la cui attività oncogenica e il diretto coinvolgimento nella chemioresistenza di tumori a p53 mutata è stato documentato da vari studi *in vitro* e *in vivo*. Oltre ad usare Itch come target farmacologico diretto, è possibile ipotizzare un'azione sinergica con altre molecole che regolano punti diversi della stessa via: cicline-chinasi dipendenti (*Cyclin-Dependent Kinases*, CDK) e regolatori di IKK/NF- κ B. Nelle cellule tumorali si riscontra quasi costantemente un'aumentata attività delle

CDK e una modulazione negativa della loro attività/espressione può determinare inibizione della crescita tumorale *in vitro* e in modelli animali. Analogamente, la protein-chinasi RaLP regola proliferazione e sopravvivenza cellulare, promuovendo la tumorigenesi, e IKK/NF- κ B è costitutivamente attivata nei tumori, dove NF- κ B causa resistenza all'apoptosi da farmaci antitumorali. Inoltre, p63 e p73 regolano il ciclo cellulare, interagiscono con NF- κ B e transattivano IKK.

La regolazione farmacologia di Itch su p63/p73/Hedgehog/Gli ed eventuali sinergie con CDK/IKK/NF- κ B/RaLP è un'area totalmente inesplorata nel cancro e in particolare nei tumori epiteliali.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare nuove molecole (da noi identificate) inibitori della E3-ubiquitina-ligasi Itch e di validare tali molecole nella via p63/p73 e nella via Hedgehog/Gli. Inoltre, valuteremo il potenziale terapeutico di peptidi capaci di disassemblare complessi proteici (mp53/p73) ad attività oncogenica, e studieremo il potenziale terapeutico di inibitori selettivi di NF- κ B/IKK e di CDK, come singoli agenti e in associazione con gli inibitori di Itch e chemioterapici convenzionali. Analizzeremo l'espressione della proteina chinasi RaLP nei melanomi e caratterizzeremo la trasduzione del segnale da essa attivata. Il progetto è suddiviso nei seguenti obiettivi specifici.

- Valutazione dell'espressione di p63/p73/Itch in tumori cutanei/linfomi.
- Studio delle proprietà biochimiche delle proteine leganti/regolanti ITCH.
- Generazione topi transgenici che esprimono alti livelli di p63 nei tessuti epiteliali.
- Identificazione di inibitori della E3 ligasi Itch.
- Caratterizzazione del complesso proteico mutp53/p73 come bersaglio molecolare di peptidi sintetici; sintesi dei peptidi.
- Studio dell'effetto di piccole molecole ciclopentenoniche inibitrici della via IKK/NF- κ B e caratterizzazione del sistema IKK/NF- κ B e del *pathway* di HSF1 nei modelli prescelti.
- Identificazione delle molecole con proprietà agoniste di Numb, caratterizzarne l'interazione con Itch, Numb e le proteine Gli (Gli1, Gli2 e Gli3), e identificare i domini funzionali.
- Definizione degli effetti antitumorali di inibitori di CDK, come singoli agenti e in combinazione con chemioterapici convenzionali, su linee cellulari di melanoma umano e in modelli animali.
- Identificazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale migratorio mediato da RaLP, identificazione di inibitori della funzione di RaLP.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Nuove molecole e peptidi quali farmaci regolatori del ciclo cellulare e della risposta a chemioterapici nei tumori epiteliali e cutanei

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
IDI (Gerry Melino)	UO1 (IDI: Gerry Melino)	IDI	Gerry Melino
		Università Tor Vergata	Eleonora Candi
	UO2 (IRE: Giovanni Blandino)	IRE	Giovanni Blandino
		Università Tor Vergata	Maria Grazia Santoro
		IEO	Luisa Iannone
	UO3 (IDI: Stefania D'Atri)	IDI	Stefania D'Atri
		ISTGE	Ulrich Pfeffer
		CNR	Ester Alvino

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare nuove molecole inibitori della E3-ubiquitina-ligasi Itch e di validare tali molecole nella via p63/p73 e nella via Hedgehog/Gli. Inoltre, abbiamo intrapreso la valutazione del potenziale terapeutico di diversi agenti, quali i) peptidi capaci di disassemblare complessi proteici (mp53/p73); ii) inibitori selettivi di NF- κ B/IKK e di CDK, come singoli agenti e in associazione con gli inibitori di Itch e chemioterapici convenzionali.

Le diverse unità hanno sviluppato le ricerche descritte nel progetto, raggiungendo gli obiettivi intermedi previsti per il secondo anno, di seguito in dettaglio.

- Unità operativa 1

Sviluppo di nuove molecole inibitorie della E3-ubiquitina-ligasi Itch e di validare tali molecole nella via p63/p73

Questa unità ha dimostrato le proprietà di oncosoppressore dell'isoforma TAp73 tramite la caratterizzazione di topi TAp73^{-/-}. Abbiamo dimostrato che TAp73 interagisce con le proteine regolatrici del fuso Bub1, Bub3 e BubR1 e fibroblasti derivanti da topi TAp73^{-/-} hanno un'elevata incidenza di aneuploidia caratterizzata da difetti dell'assemblaggio del fuso mitotico.

Per quanto riguarda i meccanismi regolativi dell'espressione dei geni della famiglia di p53 abbiamo identificato una nuova E3 ubiquitina ligasi capace di legare, ubiquitinare e regolare la degradazione proteica di p73: il complesso SCF^{F_{BOX}45}.

Per quanto riguarda l'identificazione di nuove vie potenzialmente importanti nel modulare la risposta apoptotica indotta da trattamenti chemioterapici, abbiamo dimostrato che la regolazione dell'espressione dell'enzima de-ubiquitinasi USP47 può essere importante nei processi apoptotici indotti da diversi agenti genotossici in cellule tumorali. Abbiamo inoltre dimostrato il potenziale terapeutico dei mediatori farmacologici dei flussi autofagici, quali il clomipramin (approvata dall'FDA) e il suo metabolita attivo desmethylclomipramina (DCMI).

Per quanto riguarda p63 abbiamo identificato un nuovo meccanismo c-Abl/TAp63 importante nella regolazione dell'infertilità causata dagli agenti chemioterapici.

- *Unità operativa 2*

Il complesso proteico m-p53/p73 come bersaglio terapeutico nel trattamento dei tumori umani

Abbiamo generato due versioni del peptide SIMP1 che è in grado di rompere i complessi m-p53/p73 in cellule tumorali portatrici della mutazione p53His-273. La sostituzione del K138 in Ala138 non impedisce la formazione del complesso DNA/p73/mutp53His273; la sostituzione del residuo K138 con Arginina potenzia gli effetti interferenti esercitati dal peptide SIMP1 sul complesso proteico mm-p53/p73. Il trapianto in topi nudi di cellule tumorali di carcinoma della mammella (MDA-MB-468) e di carcinoma del colon (HT-29) trasdotte con i peptidi SIMP1 e SIMP1M evidenziava una drastica riduzione del calibro dei tumori rispetto a quelli presenti nei gruppi di controllo inoculati con i peptidi SIMP1KO o con il SIMP5M. Inoltre, il trattamento quotidiano per via intramuscolare di topi nudi portatori di tumori indotti dall'inoculo di cellule HT29 con peptidi SIMP1 e SIMP1M. evidenziava una riduzione significativa della massa tumorale, rispetto ai topi di controllo trattati con i peptidi di controllo SIMP5 (specifici per la m His175).

Il sistema IKK/NF- κ B come bersaglio strategico nella terapia antitumorale

Abbiamo identificato e caratterizzato un nuovo gene bersaglio del fattore HSF1: il gene AIRAP. Attraverso un'analisi di mutagenesi sito-specifica è stato identificato il sito HSE di HSF1-binding responsabile dell'induzione dopo stress termico, identificando AIRAP come un gene 'heat shock'.

Identificazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale migratorio mediato da RaLP e inibizione della sua funzione

Abbiamo dimostrato che l'espressione di RaLP in 154 casi di melanomi primari è specifica dei melanomi invasivi. Una prima analisi ha indicato che la presenza di RaLP nel melanoma correla significativamente con l'indice di Breslow, il livello di Clark, l'ulcerazione e l'istotipo. generati un topo geneticamente delecto per RaLP (RaLP-KO) e un topo transgenico (topo RaLP Kin). Il topo RaLP-KO, rappresenta un eccellente modello per lo studio del ruolo di RaLP sia nella migrazione, sia nella differenziazione *in vitro*. Il topo RaLP-Kin consente invece l'iperespressione di RaLP mediante inserimento del cDNA umano all'interno del locus HPRT murino, e questi animali verranno caratterizzati per eventuale formazione di tumori spontanei o indotti da DMBA e per eventuale potenziale metastatico.

- *Unità operativa 3*

Studio del potenziale terapeutico di inibitori di chinasi ciclina-dipendenti (CDK-Is) nel melanoma

Abbiamo caratterizzato i meccanismi molecolari implicati nell'attività antiproliferativa del CDK2-I nelle linee di melanoma GL-Mel, M10. Nella linea GL-Mel trattata con il CDK2-I, è stata evidenziata una significativa riduzione dei livelli di RB, fosfo-RB-Thr826, fosfo-RB-Thr821 e ciclina A, mentre è stato osservato un aumento dei livelli di p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, p53, ciclina D1 e ciclina E. Nella linea M10, circa 4 volte meno sensibile della linea GL-Mel al CDK2-I, è stata evidenziata una moderata diminuzione dell'espressione di fosfo-RB-Thr821 e un moderato aumento dell'espressione di p21^{Cip1}. Sono stati inoltre determinati i profili d'espressione genica di cellule GL-Mel di controllo o trattate con il CDK2-I (0.625 mM per 24 h). L'analisi bionformatica dei dati ha evidenziato 71 geni significativamente sotto-espressi e 50 geni significativamente sovra-espressi nelle cellule trattate rispetto alle cellule di controllo. L'analisi di arricchimento di

categorie funzionali ha rivelato esclusivamente categorie associate a ciclo cellulare, mitosi, divisione cellulare, compatibilmente con il meccanismo d'azione dell'inibitore.

Identificazione di inibitori della pathway oncogenica di Hedgehog/Gli e loro uso nella soppressione della tumorigenesi cerebrale

Sono state identificate "signature" di espressione di microRNA in una casistica di medulloblastomi umani che caratterizzano il tipo istologico, le caratteristiche molecolari e la prognosi. Sono stati inoltre identificati tre microRNA che regolano la pathway di Hedgehog (Smoothed e Gli1) e la crescita e differenziamento di progenitori neurali e cellule di medulloblastoma, la cui espressione è ridotta nel tumore umano per alterazioni genetiche ed epigenetiche.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo secondo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Belardo G, Piva R, Santoro MG. Heat stress triggers apoptosis by impairing NF-kappaB survival signalling in malignant B cells. *Leukemia* 2009 Nov 19 (online prima della stampa). prima della stampa).
2. Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 2008;14:10-21.
3. Caporali S, Alvino E, Starace G, Ciomei M, Brasca MG, Levati L, Garbin A, Castiglia D, Covaciu C, Bonmassar E, and D'Atri S. The cyclin-dependent kinase inhibitor PHA-848125 suppresses the *in vitro* growth of melanomas sensitive or resistant to temozolomide and shows synergistic effects in combination with this triazene compound. *Pharmacol Res* (inviato per la pubblicazione).
4. Careccia S, Mainardi S, Pelosi A, Gurtner A, Diverio D, Riccioni R, Testa U, Pelosi E, Piaggio G, Sacchi A, Lavorgna S, Lo-Coco F, Blandino G, Levrero M, Rizzo MG. A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. *Oncogene* 2009;28(45):4034-40.
5. Ciuffini L, Belardo G, Angelini M, Santoro MG. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 triggers apoptosis in human melanoma cells by impairing NF-kB survival signaling: role of the Jun-N-terminal kinase. Manoscritto in preparazione.
6. Di Agostino S, Cortese G, Monti O, Dell'orso S, Sacchi A, Eisenstein M, *et al.* The disruption of the protein complex mutantp53/p73 increases selectively the response of tumor cells to anticancer drugs. *Cell Cycle* 2008;7(21):3440-7.
7. Di Agostino S, Dell'Orso S, Cortese G, Eisenstein M, Citro G, Strano S, Blandino G. SIMP1 impairs *in vivo* tumor growth and response to anticancer agents of mutant p53 tumors. Manoscritto in preparazione.
8. Enzler T, Chang X, Facchinetti V, Melino G, Karin M, Su B, *et al.* MEKK1 binds HECT E3 ligase Itch by its amino-terminal RING motif to regulate Th2 cytokine gene expression. *J Immunol* 2009;183:3831-8.
9. Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, *et al.* Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J* 2008;27:2616-27.
10. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MSB, *et al.* microRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer* 2009;124(3):568-77.
11. Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, Terrenato I, Mottolese M, Muti P, Domany E, Del Bufalo D, Strano S, Blandino G. The execution of the transcriptional axis

- mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(10):1086-93.
12. Gagiannis S, Muller M, Uhlemann S, Koch A, Melino G, Krammer PH, *et al.* Parathyroid hormone-related protein confers chemoresistance by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Int J Cancer* 2009;125:1551-7.
 13. Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S, Cannata SM, Klinger FG, Di Bartolomeo C, *et al.* Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med* 2009;15:1179-85.
 14. Hansen TM, Rossi M, Roperch JP, Ansell K, Simpson K, Taylor D, *et al.* Itch inhibition regulates chemosensitivity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:33-6.
 15. Klanrit P, Taebunpakul P, Flinterman MB, Odell EW, Riaz MA, Melino G, *et al.* PML involvement in the p73-mediated E1A-induced suppression of EGFR and induction of apoptosis in head and neck cancers. *Oncogene* 2009;28:3499-512.
 16. Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, *et al.* Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ* 2008;15:1103-12.
 17. Peschiaroli A, Scialpi F, Bernassola F, Pagano M, Melino G. The F-box protein FBXO45 promotes the proteasome-dependent degradation of p73. *Oncogene* 2009;28:3157-66.
 18. Peschiaroli A, Skaar J, Pagano M, Melino G. The ubiquitin-specific protease USP47 is a novel beta-TRCP regulating cell survival. *Oncogene* 2009 (in corso di stampa).
 19. Piva R, Ciucci A, Ferreri C, Belardo G, Evans P, Roberts SM, Santoro MG. Antitumoral activity of novel prostanoid mimetics targeting the NF-kB pathway. Manoscritto in preparazione.
 20. Pockley AG, Calderwood SK, Santoro MG. *Prokaryotic and eukaryotic heat shock proteins in infectious disease*. New York: Springer-Verlag; 2009.
 21. Raimondo D, Giorgetti A, Bernassola F, Melino G, Tramontano A. Modelling and molecular dynamics of the interaction between the E3 ubiquitin ligase Itch and the E2 UbCH7. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1620-7.
 22. Rivetti di Val Cervo P, Tucci P, Majid A, Lena MA, Agostini M, Bernardini S, *et al.* p73, miR106b, miR34a, and Itch in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:6498-9; author reply 6499-6500.
 23. Rossi A, Santoro M.G. Differential regulation of human versus mouse HSP70 gene expression by cyclopentenone prostaglandin A1: role of HSF1 phosphorylation. Manoscritto in preparazione.
 24. Rossi A, Trotta E, Brandi R, Arisi I, Coccia M, Santoro MG. AIRAP: a new heat shock gene regulated by Heat Shock Factor 1. 2009. (inviato per la pubblicazione).
 25. Rossi M, Inoue S, Walewska R, Knight RA, Dyer MJ, Cohen GM, *et al.* Caspase cleavage of Itch in chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009a;379:659-64.
 26. Rossi M, Munarriz ER, Bartesaghi S, Milanese M, Dinsdale D, Guerra-Martin MA, *et al.* Desmethylclomipramine induces the accumulation of autophagy markers by blocking autophagic flux. *J Cell Sci* 2009b;122:3330-9.
 27. Schilling T, Schleithoff ES, Kairat A, Melino G, Stremmel W, Oren M, *et al.* Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;387:399-404.
 28. Scialpi F, Malatesta M, Peschiaroli A, Rossi M, Melino G, Bernassola F. Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1515-21.
 29. Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, *et al.* Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer* 2009 Aug 26 (online prima della stampa).

30. Tomasini R, Tsuchihara K, Tsuda C, Lau SK, Wilhelm M, Ruffini A, *et al.* TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:797-802.
31. Vernole P, Neale MH, Barcaroli D, Munarriz E, Knight RA, Tomasini R, *et al.* TAp73alpha binds the kinetochore proteins Bub1 and Bub3 resulting in polyploidy. *Cell Cycle* 2009;8:421-9.