



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Scienze Biologiche

**RISCRIVERE IL DESTINO CELLULARE: L'INFLUENZA DELLE
MUTAZIONI MISSENSO DEL GENE TP53 NEL CANCRO**

**REWIRING CELL FATE: THE INFLUENCE OF
TP53 GENE MISSENSE MUTATION IN CANCER**

Tesi di Laurea di:
Francesco Domenico Lanzone

Docente Referente di:
Chiar.mo Prof. Federica Carducci

Sessione estiva

Anno Accademico 2023/2024

Corso di laurea triennale in Scienze Biologiche

Riscrivere il destino cellulare: l'influenza delle mutazioni missenso del gene TP53 nel cancro



Figura 1. Il ruolo del gene TP53 nel cancro.

Francesco Domenico Lanzone

Anno accademico 2023/2024

Relatore

Federica Carducci

INTRODUZIONE

- ❖ TP53 è un gene codificante per la proteina p53 ed è localizzato sul cromosoma 17.
- ❖ P53 è definita “soppressore tumorale”, poiché fornisce un’importante barriera alla trasformazione neoplastica delle cellule ed alla progressione tumorale. Questa capta in maniera estremamente sensibile gli input di stress e coordina processi che proteggono l’omeostasi cellulare e la stabilità del genoma.
- ❖ TP53 è il gene più frequentemente alterato nei tumori umani, dando origine a proteine p53 mutate che perdono la funzione di soppressori tumorali e saranno associate ad una prognosi sfavorevole in tumori sporadici ed ereditari.

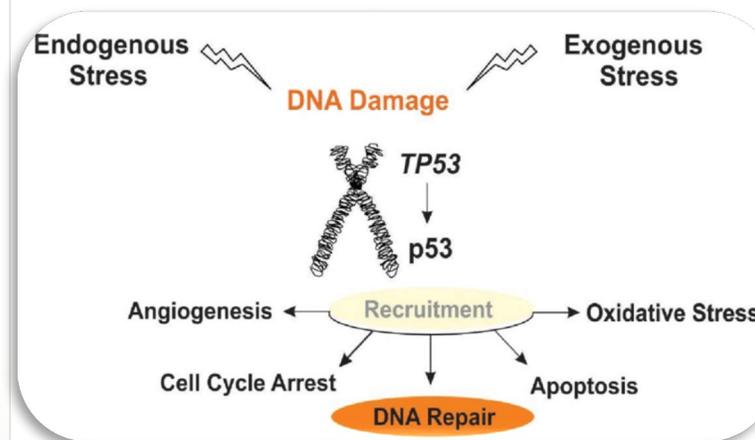


Figura 2. Funzione di TP53. Espressione di p53 in risposta ad input di stress per regolare l'oncogenesi.

COSA SONO LE MUTAZIONI? COME SONO DISTINTE?

- Le mutazioni sono processi che alterano la sequenza di basi del DNA e possono avere effetto positivo o negativo.
- Sono distinte in somatiche e germinali, ed a seconda della lunghezza del tratto di DNA mutato parliamo di:
 - ➔ Mutazioni puntiformi;
 - ➔ Mutazioni cromosomiche;
 - ➔ Mutazioni genomiche;

- ❖ Nel caso di TP53, parliamo di mutazioni geniche in quanto alterano la funzione del gene stesso e sono di tipo puntiformi. Queste si verificano nelle regioni codificanti dei geni o nelle loro sequenze regolative, provocando un'alterazione fenotipica cambiando funzione o livelli di espressione di una proteina.
- ❖ Il tipo di mutazione puntiforme che coinvolge il gene TP53 è, più specificamente, una mutazione missenso; quest'ultima prevede la sostituzione di un coppia di basi nel DNA provocando un cambiamento nel codone di mRNA, con il conseguente inserimento di un aminoacido diverso nel polipeptide tradotto.

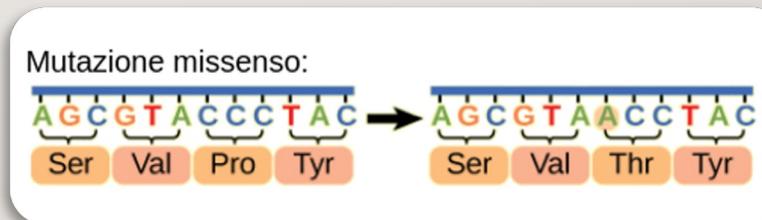


Figura 3. Esempio di mutazione missenso con sostituzione di Prolina in Treonina

L'ESITO DELLE MUTAZIONI MISSENSO NEL GENE TP53

- ❖ La proteina codificata dal gene mutato è denominata mutp53 e perderà le funzioni della proteina p53 wild-type, privando la cellula di risposte tumorali come senescenza ed apoptosi e conferendo alla cellula stessa vantaggi selettivi grazie alla capacità di rimodellare trascrittoma e proteasoma.
- ❖ Le mutp53 sovvertono le vie cellulari cruciali e favoriscono la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali promuovendo risposte adattative a condizioni di stress ed agendo come fattori omeostatici.

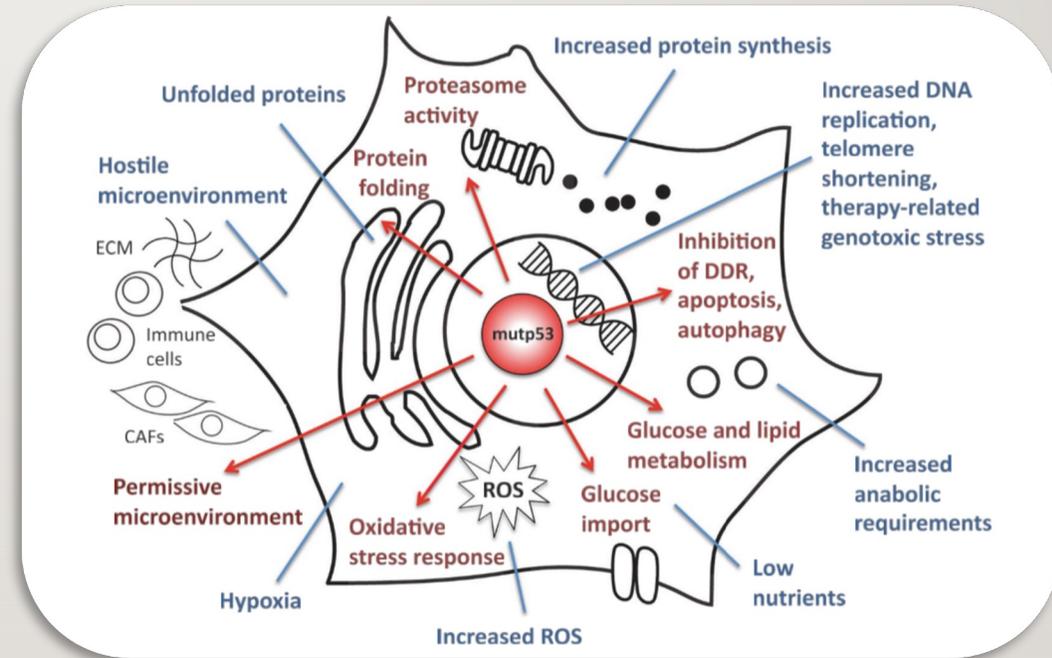


Figura 4. Input di stress percepiti da una cellula con mutp53 e promozione di risposte adattative dalla proteina stessa.

L'ACCUMULO DI MUTP53 NELLE CELLULE TUMORALI

- Le proteine mutp53 sono instabili a causa della degradazione mediata dal proteasoma e guidata da specifiche E3 ubiquitin ligasi, le quali legano direttamente quest'ultima.
- A mediare l'accumulo della proteina mutante all'interno delle cellule tumorali, per far fronte allo stress cellulare, sono implicati diversi meccanismi di adattamento:
 - ➔ Interazione di mutp53 con componenti del sistema chaperon Hsp ad inibire MDM2 e CHIP;
 - ➔ Attivazione di RhoA e di conseguenza della componente Hsp90 ad opera di HDAC6;
 - ➔ Elevata disponibilità di glucosio per evitare la proteolisi di mutp53;
 - ➔ Fosforilazione di Ser15 della proteina mutante da parte di ATM che impedisce legame di MDM2;
 - ➔ Modifiche post-traduzionali di mutp53 ad opera di PLK2;

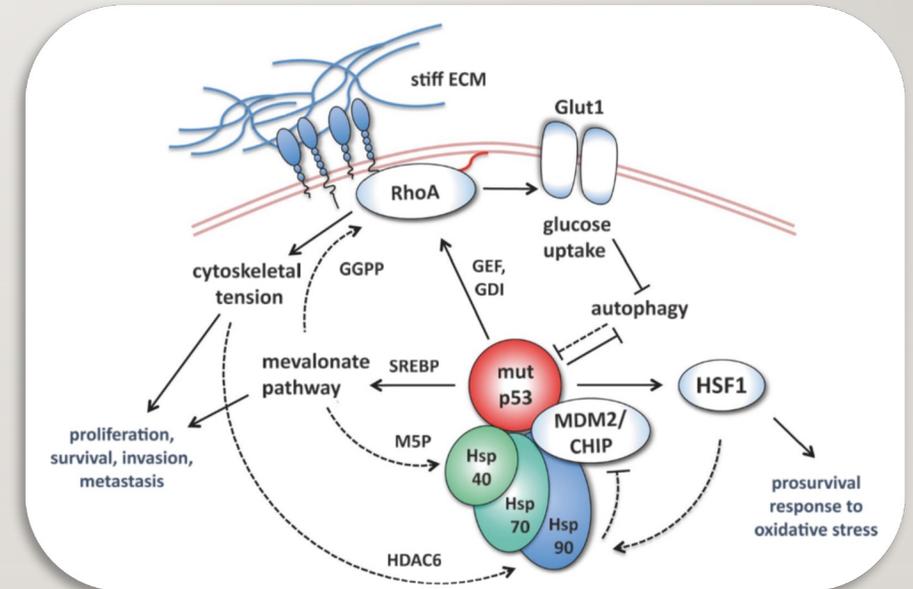


Figura 5. I processi di adattamento allo stress indotti dalla p53 mutante innescano loop positivi che alimentano il suo stesso accumulo nelle cellule tumorali.

MUTP53 RICREA IL METABOLISMO DELLE CELLULE TUMORALI

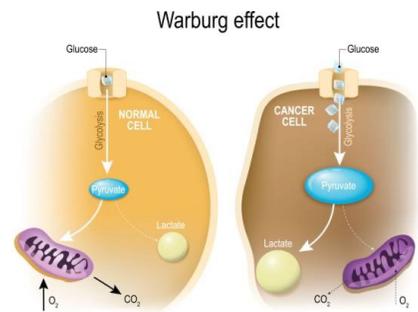


Figura 6a. Effetto Warburg, in figura è mostrato l'aumento di assorbimento del glucosio accompagnato da glicolisi aerobica.

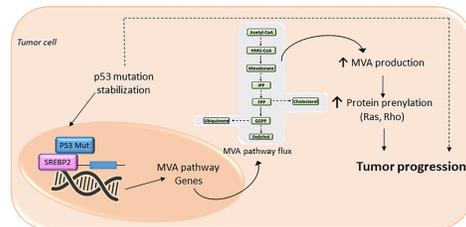


Figura 6b. Alterazione del metabolismo lipidico con induzione della via del mevalonato(MVP).

- La riprogrammazione del metabolismo cellulare è un segno distintivo del cancro, in quanto necessario per crescita e proliferazione continua delle cellule tumorali.
- Gli adattamenti metabolici diffusi nelle cellule tumorali sono rappresentati principalmente dall'effetto Warburg e dall'alterazione del metabolismo lipidico.

MUTP53 AUMENTA LA SOPRAVVIVENZA IN CONDIZIONI DI STRESS OSSIDATIVO

- Lo stress ossidativo induce un aumento dei ROS nella cellula, danneggiandone tutte le componenti.
- Come conseguenza ad esso, le cellule tumorali subiscono delle lesioni persistenti del DNA, innescando l'attivazione di DDR che eliminerebbe queste ultime tramite apoptosi ed autofagia o senescenza.

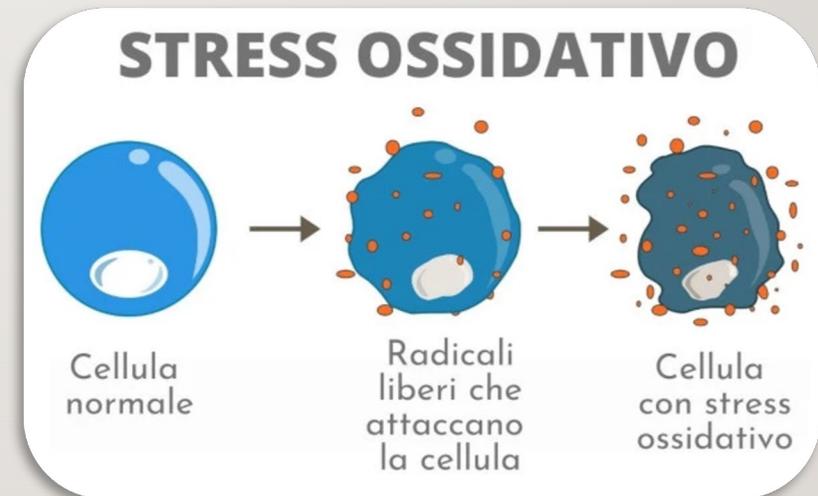


Figura 7. Immagine di una cellula con stress ossidativo.

MECCANISMI DI ADATTAMENTO ALLO STRESS ATTUATI DA MUTP53

➤ Per consentire la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali, i diversi meccanismi attuati sono i seguenti 

- Interazione con il fattore di trascrizione NRF2.
- Blocco dell'attivazione di ATM e stimolo di funzioni di PARP1.
- Incremento di riparazione del DNA mediata da HR, potenziando la funzione di Top I.
- Aumento dell'efficienza di replicazione del DNA facilitando la proliferazione di cellule anomale con il reclutamento di PARP insieme a PCNA ed MCM4.
- Associazione con TopBP1.
- Inibizione del programma trascrizionale pro-apoptotico di p73 e sopprime autofagia inibendo AMPK e stimolando vie Akt/mTOR.
- Stabilizzazione di HIF-1 α in condizioni di ipossia.

MUTP53 PERMETTE L'INSTAURAZIONE DI UN MICROAMBIENTE TUMORALE PRO-ONCOGENICO

➤ Il microambiente tumorale è l'ambiente cellulare ed extracellulare attorno al quale esiste e si sviluppa il tumore. Questo comprende diverse componenti:

- Vasi sanguigni circostanti.
- Cellule del sistema immunitario.
- Fibroblasti associati al cancro(CAF).
- Matrice extracellulare del tumore(ECM).

➤ Durante il processo di invasione-metastasi, le cellule tumorali devono essere in grado di modulare attivamente il microambiente tumorale al fine di renderlo permissivo per favorire la progressione del cancro.

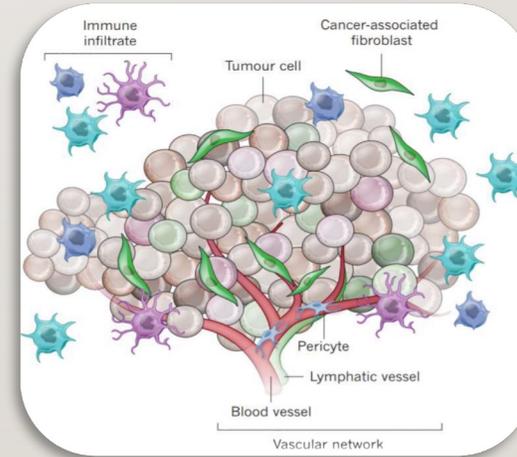


Figura 9. Immagine di un microambiente tumorale.

RUOLO DI MUTP53 NEL MICROAMBIENTE TUMORALE

- ❖ La proteina mutante può stimolare l'angiogenesi se sovraespressa, inducendo VEGF o aumentando l'espressione di ID4.
- ❖ Rimodella il profilo di citochine e chemochine permettendo alle cellule tumorali di adattarsi ad infiammazione cronica.
- ❖ Protegge le cellule tumorali da IFN-beta secreto da CAF.

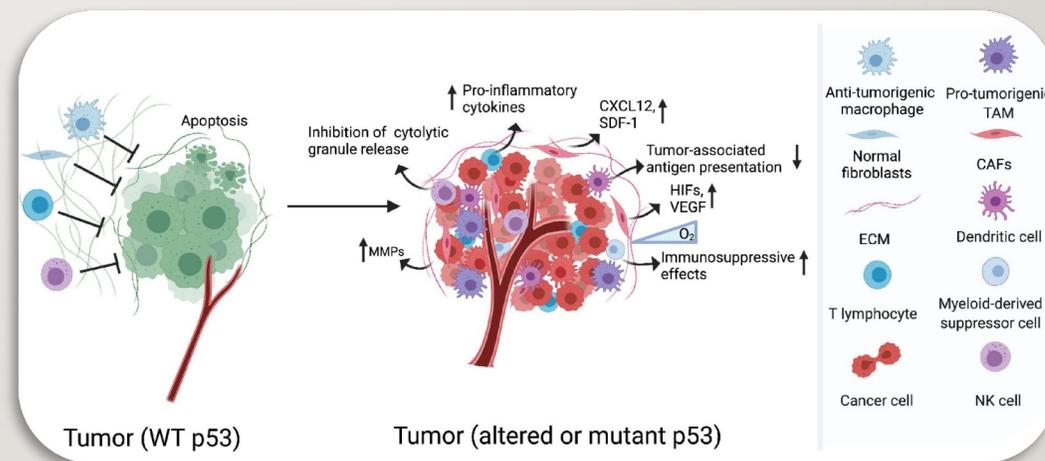


Figura 10. Rimodellamento del microambiente tumorale guidato da mutp53.

OPPORTUNITÀ TERAPEUTICHE PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO IN RELAZIONI ALLE FUNZIONI OMEOSTATICHE DI MUTP53

- Esistono prove sperimentali che dimostrano che l'interruzione dell'espressione di mutp53 mediante approcci farmacologici o RNAi porta all'interruzione di proliferazione, sopravvivenza e metastasi delle cellule tumorali e ad una regressione del tumore stesso, tuttavia le terapie antitumorali basate sul bersaglio diretto di mutp53 sono ancora lontane.
- L'unica molecola che ad oggi ha raggiunto con successo gli studi clinici di fase I e II è APR-246, anche chiamata PRIMA I-Met.
- Attraverso lo studio delle funzioni omeostatiche di mutp53 è stato possibile prevedere strategie terapeutiche ➡

Compound	Mechanism	Experimental model/clinical stage
PRIMA-1MET	Binds to mutp53 restoring its wild-type conformation and activity and inducing its degradation.	Phase II clinical trials in ovarian cancer (NCT02098343; NCT03268382).
Hsp90 inhibitors, HDAC inhibitors (SAHA)	Elicit mutp53 destabilization by inhibiting the HDAC6-Hsp90 chaperone machinery to release MDM2/CHIP ubiquitin ligases.	Citotoxicity of the Hsp90 inhibitor 17AAG in combination with SAHA in mutp53 cancer cells is largely due to mutp53 destabilization. The Hsp90 inhibitor Ganetespib and combination of Hsp90 inhibitor 17-DMAG and SAHA restrained tumor growth in mutp53 R172H KI mice. AUY922 synergized with concurrent cisplatin radiotherapy in HNSCC with mutant <i>TP53</i> status.
Pin1 inhibitors (ATRA, ATO, KPT-6566)	Prevent activation of mutp53 downstream to phosphorylation-dependent prolyl-isomerization.	ATO/ATRA combination blunts Pin1 oncogenic activities and inhibits growth of TNBC cell lines and of patient-derived mouse xenografts. KPT-6566 inhibits mutp53 oncogenic activities, decreases viability and metastatic capability of mutp53-expressing TNBC cells.
Mevalonate-RhoA pathway inhibitors (statins, ZA, GGTI)	(a) Elicit mutp53 destabilization by inhibiting the Hsp chaperone machinery; (b) Block MVP induction downstream to mutp53.	Statins and ZA decreased mutp53 accumulation in cancer cell lines and tumor xenografts, inhibiting tumor growth. Phase II clinical trials of pre-operative ZA (NCT02347163) and ZA/atorvastatin plus neoadjuvant chemotherapy (NCT03358017) in TNBC are ongoing.
Glucose-lowering treatments (e.g. Metformin)	(a) Interrupting glucose supply elicits mutp53 destabilization in tumor cells; (b) Metformin inhibits induction of OxPhos downstream to mutp53 blunting its oncogenic effects.	Glucose restriction inhibited mutp53 accumulation in mutp53 (A135V) knock-in mice and reduced growth of mutp53-expressing tumor xenografts. Metformin treatment increased tumor-free survival in a Li Fraumeni mouse model.
Proteasome inhibitors (e.g. carfilzomib)	Inhibition of proteotoxic stress support pathways sustained by mutp53.	Carfilzomib synergized with PRIMA-1MET in reducing growth of breast cancer xenografts in a mutp53-dependent fashion.
PARP inhibitors, Chk1 inhibitors	Exploit dependency of mutp53-expressing tumor cells on PARP activity to counteract genotoxic stress.	mutp53 expression conferred sensitivity of cancer cell lines to cell death induced by Rucaparib. Chk1 inhibitor PF47736 inhibited growth of lung cancer xenografts in mice in a mutp53-dependent manner.
Inhibitors of antioxidant systems (e.g. Auranofin)	Inhibition of oxidative stress support pathways sustained by mutp53.	Auranofin synergized with PRIMA-1MET to selectively induce cell death in mutp53-expressing breast cancer cell lines; Auranofin effect in cancer is being evaluated in several clinical trials.
mTor inhibitors (e.g. Everolimus)	Inhibition of mTOR pro-survival pathway sustained by mutp53.	mutp53 expression conferred sensitivity of breast and pancreatic cancer cell lines to cell death induced by Everolimus.

Figura 11. Tabella di approcci farmacologici che hanno come bersaglio mutp53 e i suoi circuiti omeostatici.

CONCLUSIONI

- Ai mutanti missenso p53 è attribuita un'ampia gamma di attività oncogeniche che contribuiscono alla progressione del cancro.
- Abbiamo compreso la capacità di mutp53 di sostenere la sopravvivenza di cellule tumorali facendo fronte a condizioni di stress, in modo tale da individuare terapie antitumorali basate su combinazione di farmaci che colpiscono direttamente o indirettamente i circuiti omeostatici mutp53-dipendenti.
- La varietà di mutazioni missenso di TP53, tuttavia, produce conseguenze funzionali distinte e le capacità di vulnerabilità del tumore sono diverse in base alla specifica mutazione.
- Attualmente sono necessari ancora molti studi per avere una prospettiva più chiara sulle attività protettive di mutp53 e sulla loro prevalenza in diverse varianti della proteina stessa e in diversi contesti tumorali, al fine di identificare le attività “core” di quest'ultima come bersagli terapeutici ideali.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Fiamma mantovani, Licio Collavin, Giannino Del Sal, “Mutant p53 as a guardi of the cancer cell”.
- Genetica. Un approccio molecolare. Peter J. Russel. Pearson.
- www.airc.it
- www.wikipedia.com
- www.treccani.it

SINTESI

La proteina p53, in seguito a ricerche, è stata definita come soppressore tumorale in quanto fornisce un'importante barriera alla trasformazione neoplastica delle cellule ed alla progressione del tumore. Questa è in grado dunque di captare, in maniera estremamente sensibile, input di stress e di coordinare processi che proteggono l'omeostasi cellulare e la stabilità del genoma. Le mutazioni missenso del gene TP53 danno origine a proteine p53 mutate, le quali di conseguenza perdono la funzione di soppressori tumorali, e saranno diffuse in tumori umani. Le cellule tumorali acquisiscono vantaggi selettivi mantenendo le forme mutanti della proteina e promuovendo invasione, metastasi e chemioresistenza. Nell'articolo sono dunque considerate le prove disponibili che suggeriscono che le proteine p53 mutanti possono favorire la sopravvivenza delle cellule tumorali e la progressione del tumore agendo come fattori omeostatici, ragion per cui il loro studio può rivelare vulnerabilità tumorali e letalità sintetiche che potrebbero essere sfruttate per colpire tumori portatori di mutazioni missenso di TP53.