

Conosciamo il linguaggio delle proteine

Minnie Luongo, N. 6/7 giugno/luglio 2003

A volte ritornano, per fortuna. I migliori “cervelli” italiani della ricerca non sempre restano all'estero a lavorare, ma talvolta rientrano in patria. È il caso del professor Pier Paolo Di Fiore, già direttore del Dipartimento di Oncologia Sperimentale II all'Istituto Europeo Oncologico (IEO) e, dal 2001, direttore scientifico dell'Istituto FIRC di Oncologia Molecolare di Milano. In occasione della Giornata Nazionale per la Ricerca sul Cancro (organizzata domenica 10 novembre 2002), Di Fiore ha ricevuto il premio FIRC Guido Venosta edizione 2002, con questa motivazione: “Le ricerche del professor Di Fiore hanno contribuito in maniera significativa alla comprensione dei meccanismi di base della formazione del cancro e hanno posto le premesse per lo sviluppo di nuove terapie.

Le sue ricerche si sono concentrate su alcuni “recettori del fattore di crescita”, proteine fondamentali nella proliferazione delle cellule, e sul loro ruolo nella trasformazione neoplastica. La comprensione dei processi che regolano la crescita normale delle cellule, e il confronto con ciò che avviene durante la formazione del tumore, ha fornito la base razionale per una serie di studi successivi, svolti in moltissimi laboratori nel mondo, che hanno portato alla messa a punto di “terapie molecolari” – non chemioterapiche – per il trattamento del cancro.”

IEO, divisione di oncologia sperimentale II

L'area principale di ricerca del gruppo è la “trasduzione” del segnale mitogenico, vale a dire lo studio dei meccanismi tramite i quali gli stimoli che provengono dall'ambiente esterno alla cellula (segnali), vengono trasformati al suo interno in eventi biochimici in grado, a loro volta, di controllare i processi cellulari fondamentali quali la proliferazione (la generazione di nuove cellule per divisione), la differenziazione (il passaggio da una struttura semplice, non specializzata, a una altamente specializzata in grado di svolgere nuove funzioni) o la migrazione. Alterazioni in tali processi sono frequentemente associate alla formazione o diffusione delle malattie tumorali. Il sistema modello prevalentemente studiato dal gruppo nell'ambito della trasduzione del segnale è quello costituito dai fattori di crescita e i corrispondenti recettori tirosino-chinasici. Uno degli obiettivi è la comprensione dei meccanismi mediante i quali i fattori di crescita, legandosi a recettori che si trovano sulla membrana della cellula, determinano una cascata di processi intracellulari in grado di consentire alla cellula di dividersi (proliferazione). L'identificazione di questi meccanismi-chiave, spesso alterati in cellule tumorali, ha come obiettivo finale di individuare nuovi bersagli e disegnare nuove strategie terapeutiche per interferire nello sviluppo delle neoplasie. Nel tentativo di identificare il repertorio completo delle molecole coinvolte nella

trasduzione del segnale, sono state identificate due nuove proteine – EPS 8 e EPS 15 – le cui funzionalità biochimiche e strutturali sono attualmente il principale oggetto di ricerca.

Ifom, un istituto di ricerca al servizio della ricerca

Il Progetto Ifom è nato nel 1998 per iniziativa della Fondazione Italiana per la ricerca sul Cancro. E l'Ifom è una realtà dal 9 aprile 2003, giorno della sua inaugurazione.

I lavori di ristrutturazione di un complesso di circa 11.200 m², originariamente adibito a centro di ricerca farmacologica e ora acquisito dalla Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (FIRC), sono cominciati nel 1999. Nel 2000 si sono trasferiti i primi ricercatori. Il costo complessivo è pari a 33,8 milioni di euro.

A regime, l'Ifom potrà ospitare circa 300 ricercatori.

Al momento ce ne sono un centinaio, di cui l'80 per cento al di sotto dei 40 anni. La metà sono donne.

Inoltre, è stato avviato un programma di reclutamento all'estero, mediante il quale l'Ifom intende richiamare ricercatori stranieri e – soprattutto – invertire il fenomeno della “fuga di cervelli”, offrendo opportunità di lavoro ai ricercatori italiani che si trovano all'estero. Attualmente gli stranieri che lavorano all'Ifom sono una decina.

I programmi di ricerca attivi sono:

1. Validazione di nuovi bersagli terapeutici (Pier Giuseppe Pelicci)
2. Angiogenesi (Elisabetta Dejana)
3. Genetica molecolare dei tumori (Marco Pierotti)
4. Controllo del ciclo cellulare e stabilità del genoma (Marco Foiani)
5. Analisi funzionale del proteoma (Francesco Blasi)
6. Genetica delle metastasi (Pier Paolo Di Fiore)
7. Oncologia Cellulare e Ultrastrutturale (Carlo Tacchetti, Genova)
8. C. elegans (Giuseppe Cassata)

Oltre a questi programmi l'Ifom dispone di un core tecnologico che offre metodologie sperimentali avanzate nell'ambito delle nanotecnologie, della bioinformatica e della biologia strutturale.

Alcuni degli strumenti Ifom

Affymetrix – GeneChip Instrument System – Tecnologia dei microarray. La macchina analizza i livelli di espressione dei geni in un campione di RNA. È in grado di analizzare fino a 22mila geni alla volta e restituisce dei “profili di espressione genica”, cioè dice quanti e quali geni sono espressi nel campione studiato. All'Ifom si usa per capire qual è il quadro genetico caratteristico della formazione dei tumori. In Italia ci sono 4 o 5 macchine di questo tipo (costo dell'ordine delle centinaia di migliaia di euro).

FACSCalibur. Per mezzo di un raggio laser, questo apparecchio consente di valutare facilmente lo stadio di evoluzione di una popolazione cellulare. Le cellule, per dividersi e proliferare, attraversano varie fasi di un ciclo detto “ciclo cellulare”: la macchina è in grado di dire in quale fase si trovano le cellule esaminate. Ciò è importante non solo per le cellule sane, ma soprattutto per le cellule tumorali che tipicamente proliferano in maniera incontrollata. Inoltre lo strumento permette di selezionare, all'interno di una popolazione

eterogenea di cellule, quelle che presentano determinati antigeni (ad es. Antigeni tumorali). La lettura delle cellule avviene in pochi minuti (costo approssimativo: 80-100mila euro).

Spotter. È uno strumento che permette di depositare rapidamente su dei vetrini delle dimensioni simili a quelli del microscopio un altissimo numero di geni (fino a 25mila) che vengono poi esaminati per vedere come variano quelli nel campione da analizzare (per esempio un tessuto tumorale da confrontare con un tessuto normale). In Italia ne esiste un solo altro esemplare (costo approssimativo ca. 60mila euro).

Sequenziatori Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer. Strumenti di ultima generazione per l'analisi delle sequenze del DNA. Grazie alla tecnologia molto evoluta (la macchina usa un sistema detto di "elettroforesi capillare"), questo sequenziatore è in grado di leggere una sequenza di 650-700 basi nucleotidiche (gli elementi che costituiscono il DNA) in due ore, contro le quattro necessarie con i vecchi sequenziatori.

Oltre alla rapidità, questo strumento garantisce una maggior precisione nella lettura e necessita di quantitativi minori di DNA per l'analisi. In Italia esistono attualmente circa dieci macchine di questo tipo (costo approssimativo: 170mila euro).

Spettrometri di massa per l'analisi funzionale del proteoma. Spettrometri di massa ad alta risoluzione e sensibilità "Voyager DE-STR" (MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) e "q-star pulsar" (hybrid quadrupole TOF microsequence mass spectrometry) in grado di misurare la massa delle proteine e di identificare la loro "sequenza aminoacidica", cioè in pratica di sapere esattamente da quali elementi (aminoacidi) esse sono costituite. Si tratta di strumenti di ultimissima generazione per l'analisi di piccole quantità di proteine e per la caratterizzazione delle loro modificazioni. In Italia esistono meno di cinque macchine di questo tipo (costo approssimativo complessivo: 700mila euro).

Stazioni robotiche di gestione dei campioni liquidi. Sistemi automatici in grado di suddividere il contenuto degli stock base delle soluzioni in centinaia di minuscole dosi (aliquote), utilizzabili successivamente per le diverse necessità dei laboratori (Spotter, sequenziamento, sviluppo di anticorpi monoclonali). Le stazioni robotiche consentono di gestire, con grande precisione, aliquote di pochi milionesimi di litro (costo approssimativo di una stazione: 3-400mila euro).

Laser capture. Il raggio laser di questo strumento permette di isolare determinate popolazioni cellulari in un tessuto normalmente eterogeneo. Il Laser capture, riducendo a zero la cosiddetta "contaminazione cellulare", consente di separare perfettamente – senza danneggiarle – le cellule di un tumore, o di una metastasi, da tutte le cellule sane circostanti. In questo modo è possibile confrontare, con assoluta precisione, il materiale genetico estratto dalle diverse popolazioni cellulari. In Italia esiste un solo altro esemplare di questo strumento (costo approssimativo: 200mila euro).

Una molecola tuttofare

Simona Polo, una giovane ricercatrice dello IEO, assieme a Pier Paolo Di Fiore e ad altri studiosi italiani, nel marzo 2001 ha pubblicato su "Nature" uno studio – finanziato dall'Associazione Italiana per la ricerca sul Cancro (AIRC) e dalla

Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (FIRC) – che illustra la scoperta di un nuovo meccanismo della cellula. Gli studiosi italiani, di fatto, hanno individuato nella “scatola di montaggio” delle proteine un nuovo meccanismo che ne controlla la funzione, con importanti implicazioni nello sviluppo di diverse malattie, fra cui i tumori.

Tale meccanismo molecolare permette la ubiquitinazione delle proteine. “L’ubiquitina è una piccola molecola che viene “appiccicata” a molte proteine cellulari e ne modifica la funzione”, spiega Di Fiore. “A seconda che venga appiccicata una sola ubiquitina o più ubiquitine, noi parliamo di mono o poli-ubiquitinazione. Le due modifiche hanno conseguenze molto diverse: la poli-ubiquitinazione porta alla distruzione della proteina, mentre la mono-ubiquitinazione le permette di funzionare. Tutto questo era già noto da tempo, ma non si conosceva come e perché una proteina potesse essere mono o poli-ubiquitinata. Il nostro studio chiarisce i meccanismi molecolari tramite i quali ciò avviene. Il valore della nostra ricerca – continua Di Fiore – sta, per il momento, nell’aver oltrepassato una frontiera nella comprensione del funzionamento della cellula. Tuttavia sappiamo che il meccanismo di degradazione delle proteine, tramite poli-ubiquitinazione, e il meccanismo di attivazione, tramite mono-ubiquitinazione, intervengono nella normale proliferazione cellulare (la duplicazione della cellula) e ci sono già evidenze di alterazioni di queste funzioni in alcuni tumori umani. La comprensione del funzionamento della ubiquitinazione è il primo passo per correggere queste alterazioni”.

“Studiando i recettori, le “antenne” molecolari, che captano i segnali esterni di crescita per la cellula – spiega Simona Polo – abbiamo trovato che la ubiquitinazione ha una funzione in più oltre a quella finora conosciuta. Abbiamo scoperto cioè, che questo meccanismo non porta sempre e solo alla degradazione o all’attivazione delle proteine, ma anche alla regolazione del segnale di crescita per la cellula. Ha quindi un ruolo nel processo di proliferazione.”

“In alcuni tumori umani – conclude il professor Di Fiore – sono state evidenziate alterazioni della funzione del sistema dell’ubiquitinazione.

Capirne il meccanismo rappresenta dunque il primo passo per poter interferire con queste alterazioni e con le malattie ad esse collegate.”

Chi è Di Fiore

Pier Paolo Di Fiore è nato a Napoli l’11 aprile del 1958. Nel 1981 si laurea in Medicina e Chirurgia presso la II Facoltà di Medicina e Chirurgia dell’Università di Napoli, meritando il massimo dei voti con lode e una menzione speciale della Commissione Esaminatrice. Conseguito nel 1984 il diploma di specializzazione in Oncologia presso la stessa Università, ancora con il massimo dei voti e con la lode, Di Fiore ottiene una posizione di ricerca presso il Laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare del National Cancer Institute (National Institutes of Health) di Bethesda, nel Maryland (USA). Qui, nel 1987, avvia un proprio progetto di ricerca indipendente e, dal 1988 al 1994, ricopre la posizione di “Visiting scientist and section chief” (Direttore di sezione). Nel frattempo, nel 1988, consegue con dignità di stampa il Dottorato di Ricerca in Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare presso la II Facoltà di Medicina e Chirurgia dell’Università di Napoli. Dal 1994 al 1995 dirige la Sezione di Biologia

Molecolare presso il Laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare del National Cancer Institute di Bethesda. A partire al 1995 è Direttore di divisione presso il Dipartimento di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Europeo di Oncologia di Milano. Dal 2001 è Direttore Scientifico dell'Istituto FIRC di Oncologia Molecolare di Milano. L'attività di Di Fiore, pertanto, si svolge su un duplice fronte: all'Istituto europeo oncologico e al neonato Ifom (entrambi a Milano).

Due chiacchiere con Di Fiore

Parlare con il professor Pier Paolo Di Fiore è un vero piacere. Come altre persone dotate di intelligenza ben oltre la media, il nostro mostra una modestia eccezionale nel "raccontarsi". Il tutto unito alla simpatia di una "napoletanità" che 12 anni all'estero non hanno intaccato.

Professore, parliamo un po' del suo quotidiano. Per aver raggiunto certi importanti risultati scientifici così giovane (Di Paolo ha 45 anni), la gente immagina che lei stia 24 ore su 24 chino sulle sue ricerche, perennemente in camice bianco .

"Ma neanche per sogno! Pensi che in casa non abbiamo neppure un computer... Dopo il lavoro, sia io che mia moglie, anche lei ricercatrice, stacchiamo completamente. Vivendo tutto il giorno in mezzo ad apparecchiature di tecnologia ultrasofisticata, non vogliamo vedere niente che ci assomigli." *Si stenta a crederci. Davvero nulla di tecnologico?*

"Abbiamo solo un vecchio televisore malandato, che accendiamo (quando si accende...) di tanto in tanto per far contenti i bambini."

Quanti figli ha?

"Io e mia moglie (che è di Bratislava e che ho conosciuto mentre lavoravo in America) abbiamo tre bambini piccoli, tutti maschi, avuti a distanza di due anni esatti uno dall'altro."

Non ci dica che con una famiglia e tre bimbi piccoli, oltre al suo lavoro trova il tempo per qualcosa d'altro .

"Ci mancherebbe! Non potrei fare a meno né della lettura (almeno un paio di libri al mese), né della musica: ascolto sia quella classica che il rock, soprattutto quello degli anni '70."

Rimpianti per l'estero o, al contrario, per non essere rimasto sempre in Italia?

"No, sono partito per l'America subito dopo essermi laureato, giovanissimo, con una buona dose di "incoscienza", ma anche come una conseguenza naturale, considerato l'ambiente stimolante dell'Università di Napoli. Mi sono trovato molto bene là, così come non ho avuto problemi di alcun tipo nel ritornare in Italia. Comunque, penso che nella vita occorra anche un po' di fortuna, e io mi ritengo fortunato."

Indirizzi utili

- IFOM
via Adamello, 16 - 20139 Milano
tel. 02.5743.03200 fax 02.5743.03231
e-mail: ifom@ifom-firc.it
www.ifom-firc.it
- Istituto Europeo di Oncologia
Via Ripamonti, 435 - 20141 Milano

tel. 02.57489855 (diretto del professor Di Fiore) fax 02.57489208
pdifiore@ieo.it
www.ieo.it