

Jag1-Fluc: sviluppo e applicazione di una proteina ricombinante bioluminescente come biomarcatore per la diagnosi precoce del cancro al colon

Cristiana Caliceti

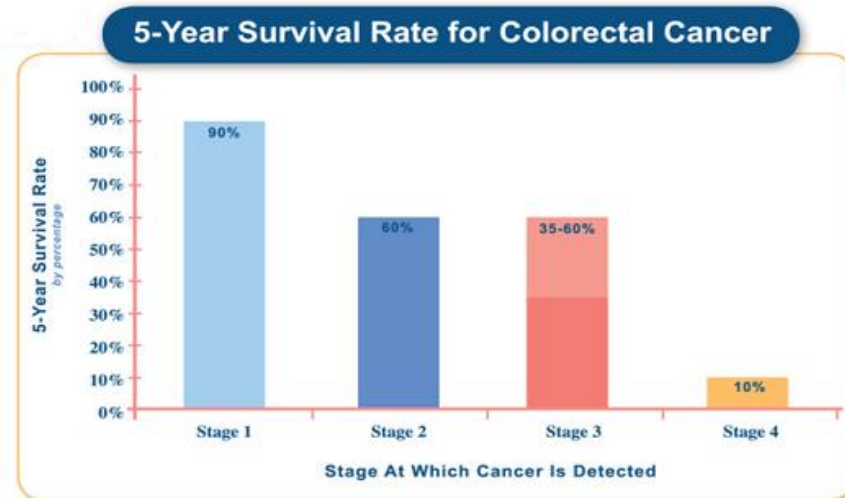
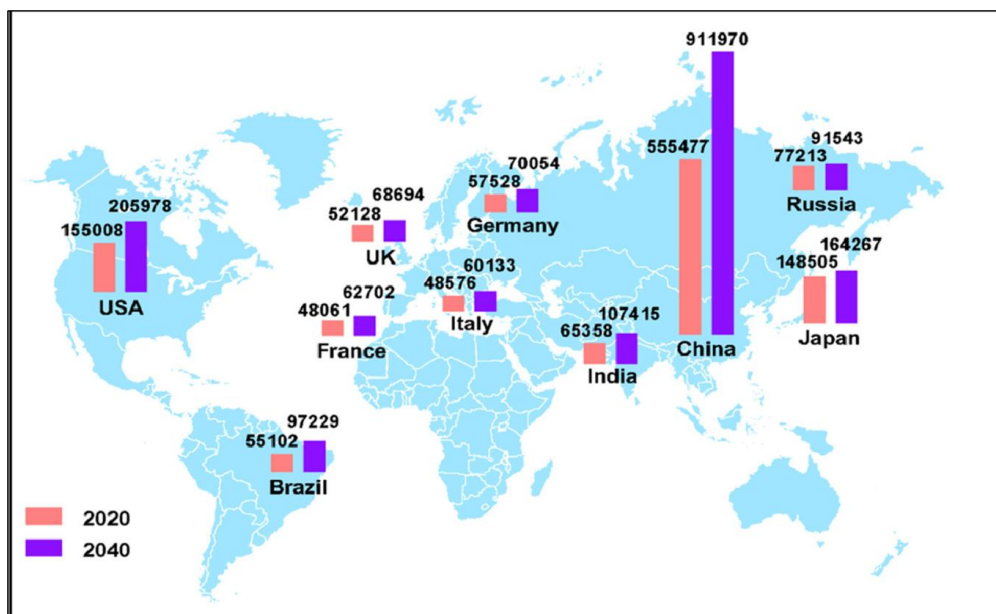
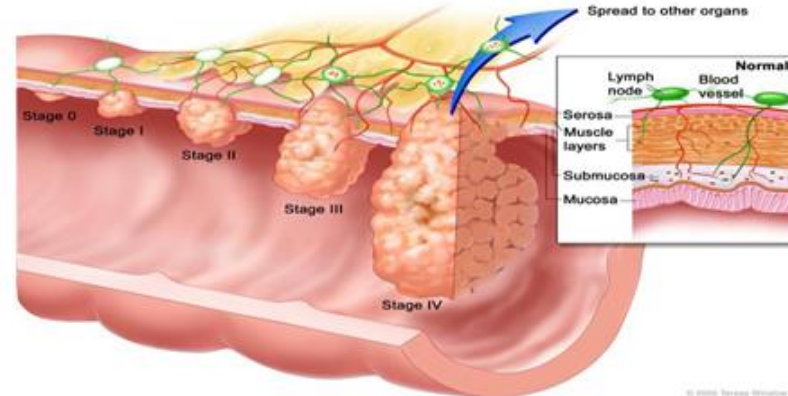
Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie
Sezione di Biochimica
Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

Roma, 17 novembre 2022



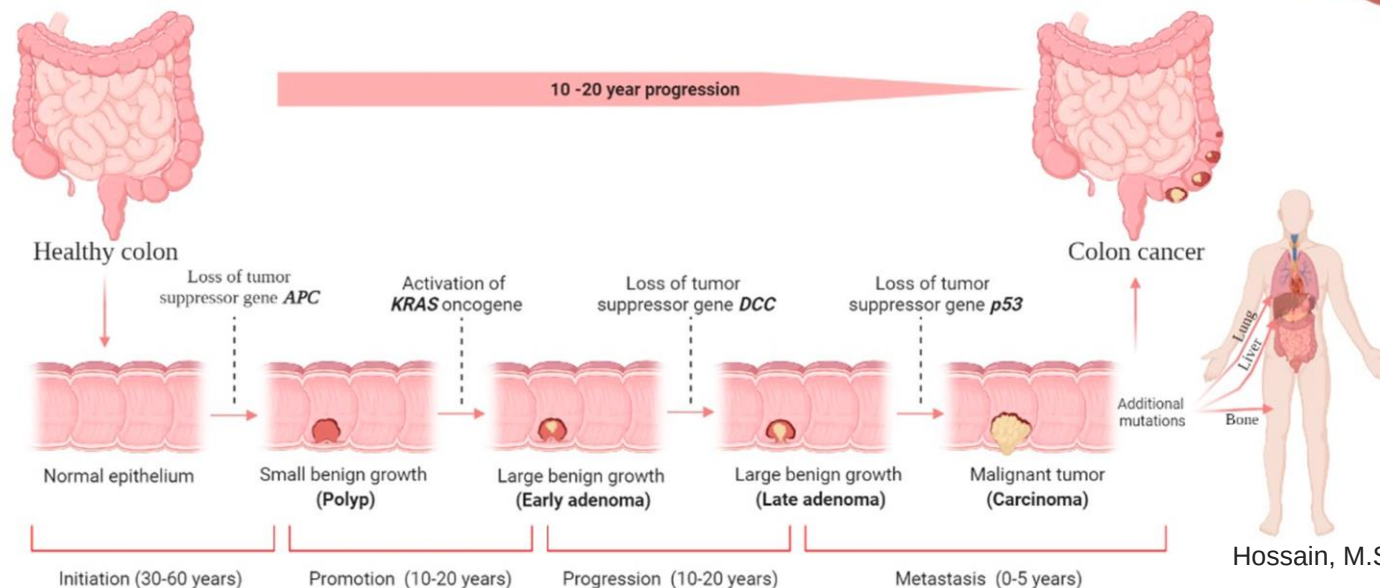
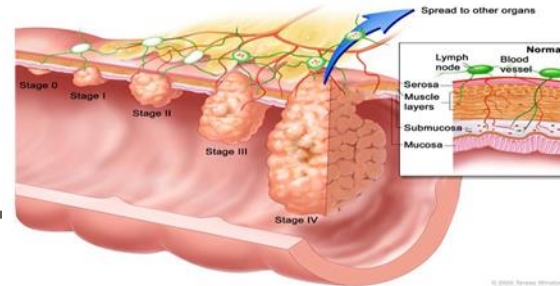
Cancro al colon

Il cancro al colon rappresenta la quarta tipologia di tumore più diffusa al mondo, e la seconda causa più comune di morte per cancro nel mondo occidentale. (Siegel, R.L., et al. 2020. CA Cancer J. Clin)



Yue Xi, et al. *Translational Oncology* 2021, 14 (10), 101174

Cancro al colon



Hossain, M.S. et al. *Cancers* 2022, 14, 1732.

CMS1 MSI immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF- β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

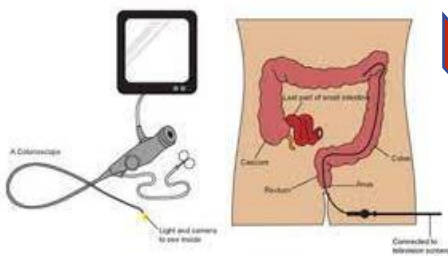
4 sottotipi molecolari
consenso per il cancro al
colon

Justin Guinney et al. *Nature Medicine* (2015), 21: 1350–1356

Diagnosi del cancro al colon



Il 43% delle persone over 50 invitate a fare lo screening per il sangue occulto fecale si sottopone realmente al test.



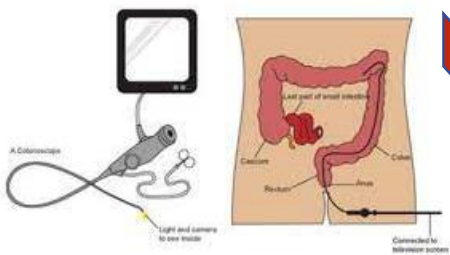
Per ogni 100 persone esaminate, 5 vengono sottoposte a colonscopia. Tra questi, vengono diagnosticati adenomi circa nello 0.8% dei casi e tumore conclamato nello 0.2%.



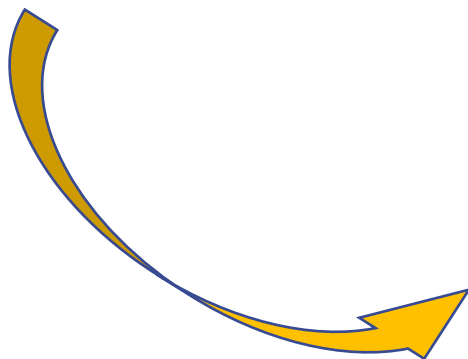
Diagnosi del cancro al colon



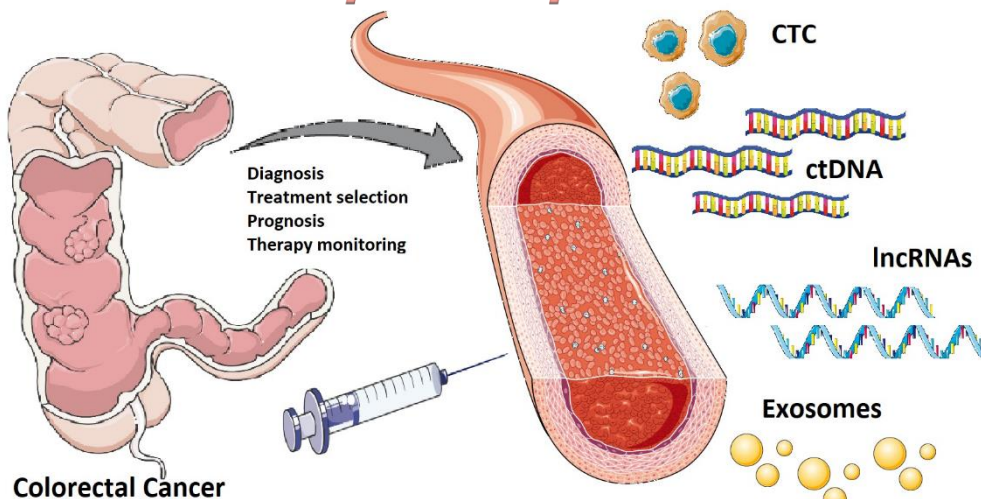
Il 43% delle persone over 50 invitate a fare lo screening per il sangue occulto fecale si sottopone realmente al test.



Per ogni 100 persone esaminate, 5 vengono sottoposte a colonscopia. Tra questi, vengono diagnosticati adenomi circa nello 0.8% dei casi e tumore conclamato nello 0.2%.



Biopsie liquide



Vacante, M et al. Biomedicine 2020, 8, 308.

Coinvolgimento del Notch signaling nella progressione del cancro al colon

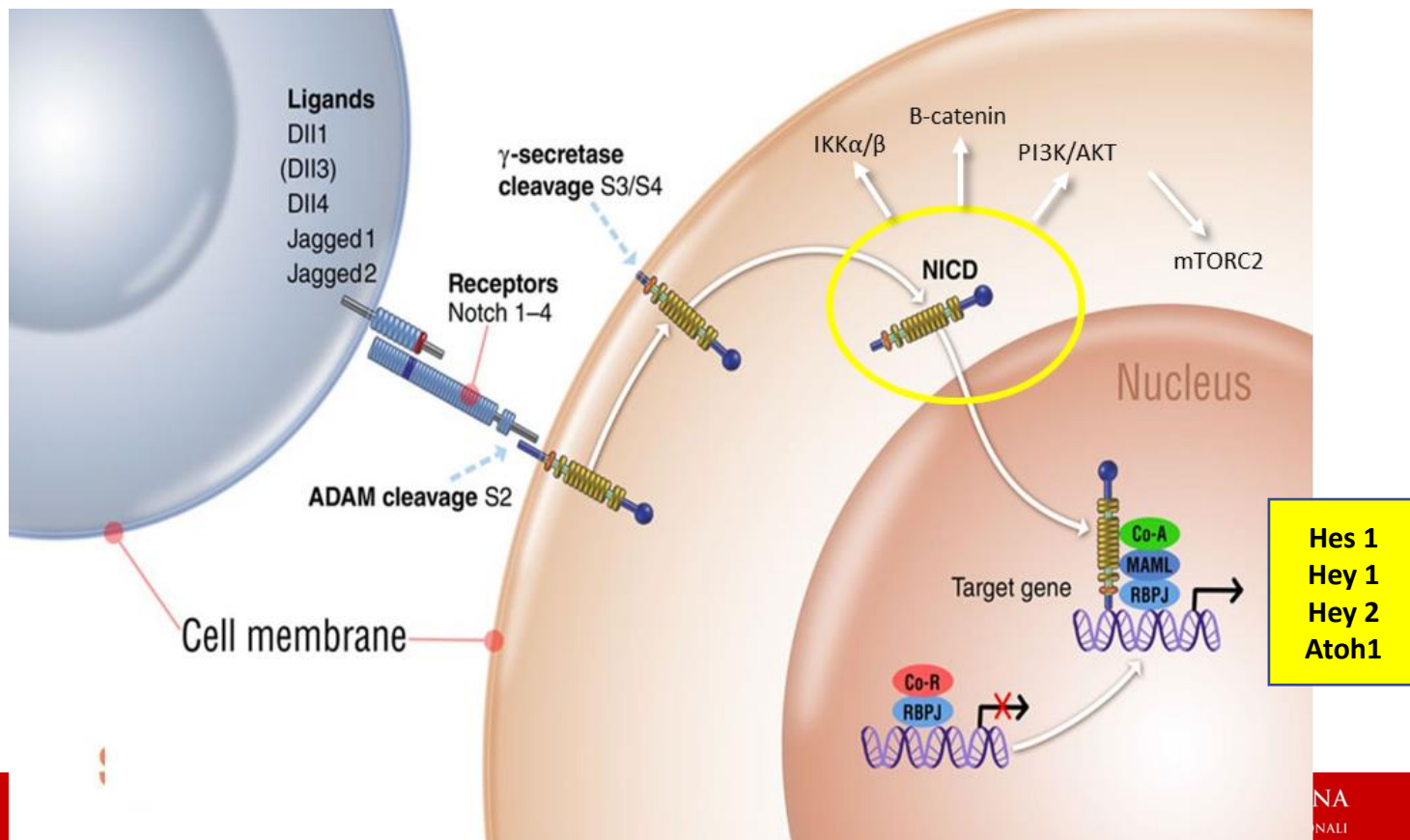
NOTCH

Ruolo fisiologico:

- Mantenimento e proliferazione delle cellule staminali nelle cripte
- Differenziamento in enterociti

Ruolo patologico:

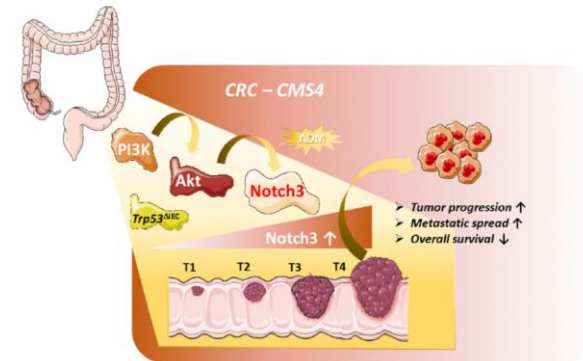
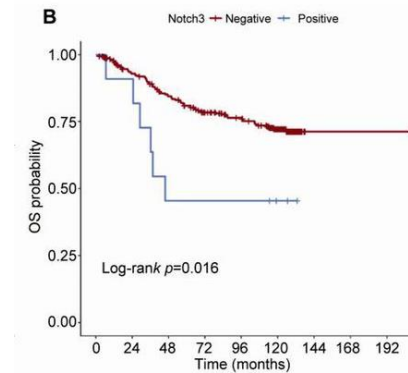
- Proliferazione e sopravvivenza cellulare
- Migrazione cellulare
- Angiogenesi



Hes 1
Hey 1
Hey 2
Atoh1

Notch3 come biomarcatore innovativo del cancro al colon

- ✓ Esiste una relazione diretta tra l'attivazione di Notch e la progressione tumorale, tra cui la T-ALL e il cancro al seno (Pelullo et al. *Neoplasia*. 2014 Dec; 16(12): 1007-1017; Strati et al. *Anticancer Res*. 2017 May;37(5):2323-2334).
- ✓ In 325 soggetti con CRC, l'espressione della proteina Notch3 è stata considerata un fattore prognostico sfavorevole per la sopravvivenza (OS). (Rallis G et al. *Anticancer Research* 2019, 39 (4) 2129-2138)
- ✓ L'espressione di Notch3 è risultata essere up-regolata in soggetti con CRC CMS4 e associata alla progressione del tumore, alle metastasi linfonodali e a distanza. (Ute Koch, Freddy Radtke. *J Exp Med* (2020) 217 (10): e20201017).





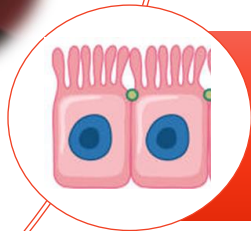
Sviluppo di una proteina ricombinante bioluminescente per la valutazione dell'attivazione del "Notch signaling" nel cancro al colon



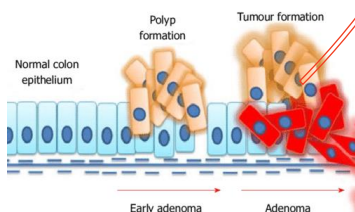
Studio clinico pilota su 20 soggetti con polipi iperplastici, 20 con polipi adenomatosi di basso e alto grado e 20 soggetti con cancro al colon.



Valutazione del ruolo della segnalazione mediata dai recettori Notch nella progressione del tumore e relazione con la composizione e il contenuto fecale degli acidi biliari.



Studio preclinico su cellule umane di adenocarcinoma del colon per indagare il cross-talk tra recettori Notch e gli acidi biliari.



Policlinico S. Orsola-Malpighi



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna



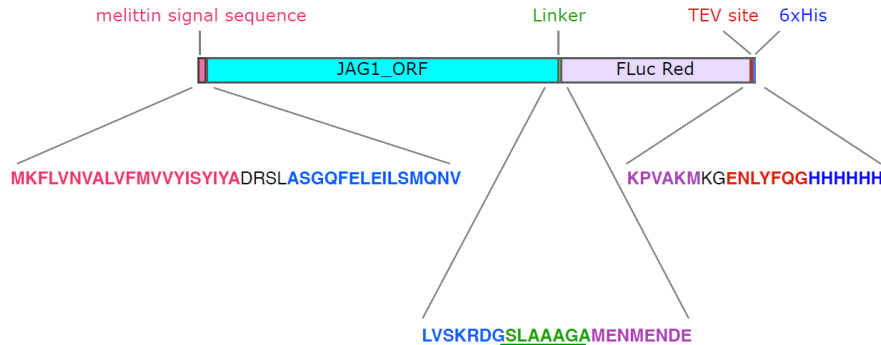
ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI

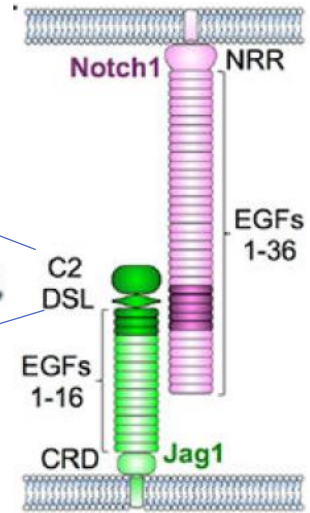
Sviluppo di Jag1-Fluc: proteina ricombinante bioluminescente costituita dal dominio extracellulare mutato di Jagged1 e dalla luciferasi di lucciola “red emitting”

JAG1 Fluc Fusion protein
173.45 kDa



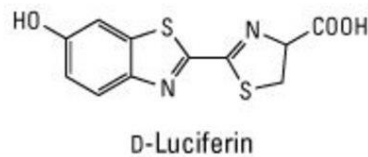
Evolved
high-affinity
Jag1(N-3)
variant

Jag1_{JV1}(N-3)
S32L, R68G, D72N,
T87R,

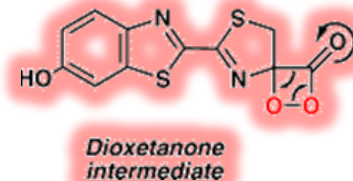


Luca VC et al. Science. 2017

Jag1-Fluc fusion protein



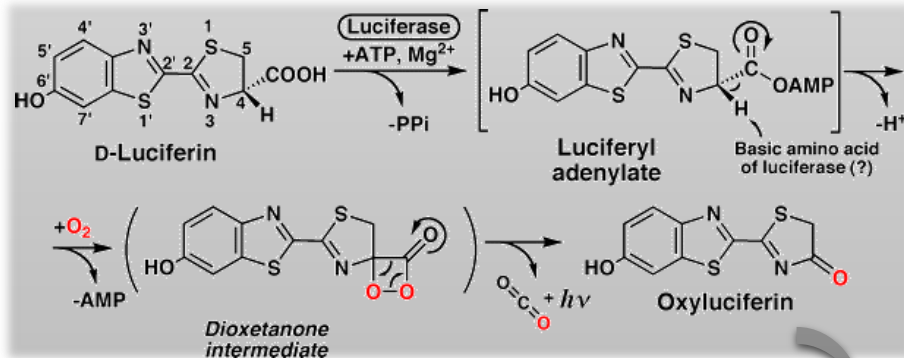
Notch



Stanford
University

Bioluminescenza

La bioluminescenza è un fenomeno caratteristico di alcuni organismi che emettono luce attraverso una reazione chimica che coinvolge specifici enzimi endogeni (e.g le luciferasi) o fotoproteine.



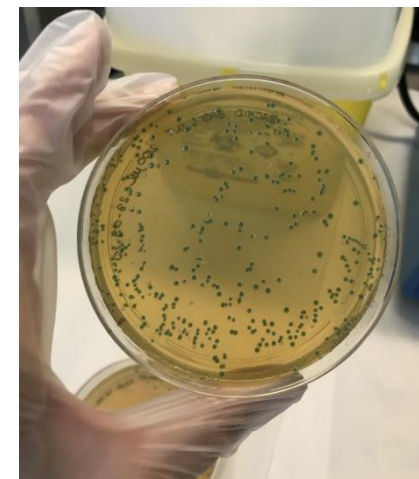
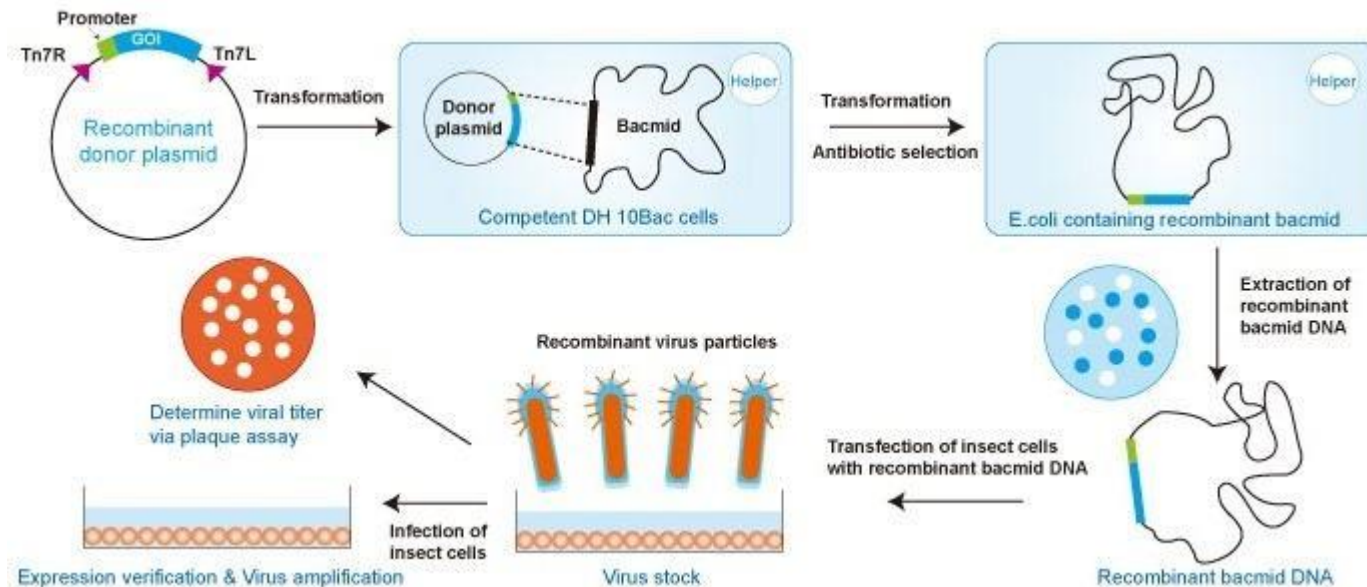
Branchini B ... Roda A. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23(5), 2451



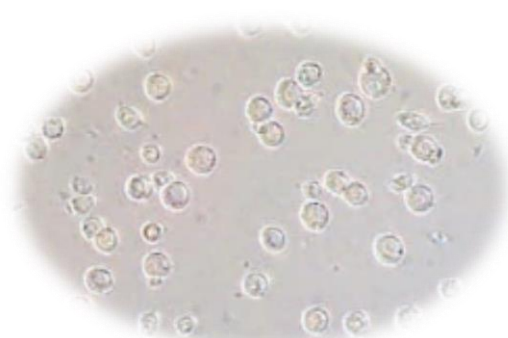
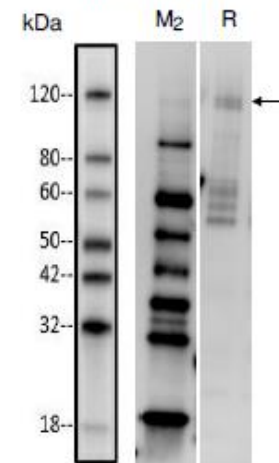
- ✓ Elevato rapporto segnale/rumore
- ✓ Utilizzabili per studi quali e quantitativi
- ✓ Strumentazione semplice
- ✓ Non sono necessarie sorgenti di fotoeccitazione
- ✓ Utilizzabile per sistemi multiplex

- ✗ Richiede la presenza di substrati e cofattori
- ✗ Reazione alcune volte instabile

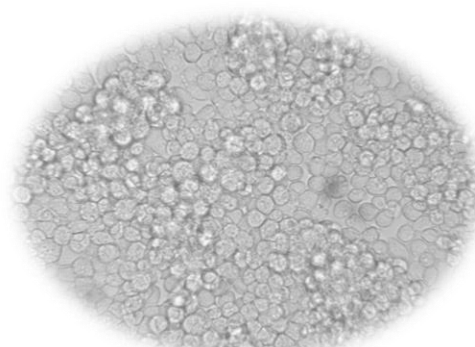
Generazione di Jag1-Fluc attraverso il sistema di espressione proteica Baculovirus- cellule di insetto



Western Blot



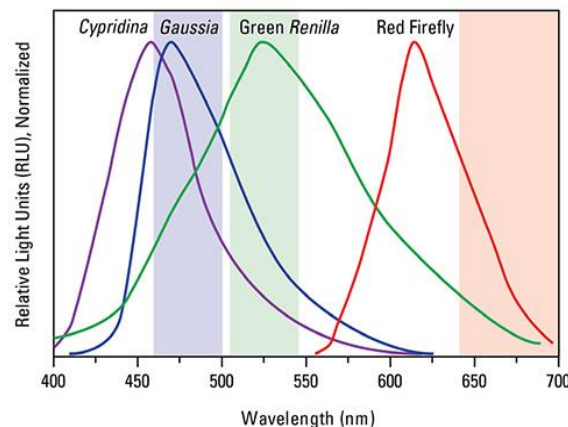
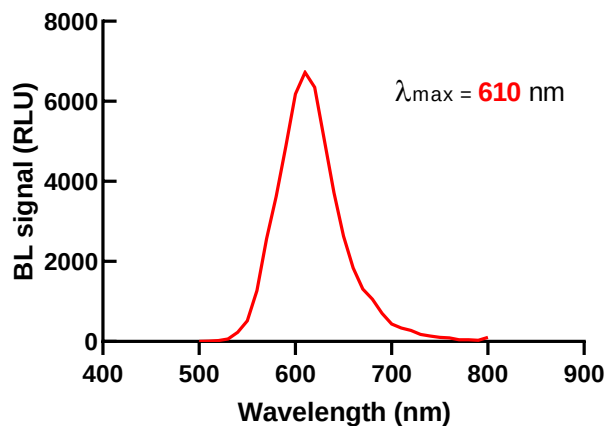
High Five Cells



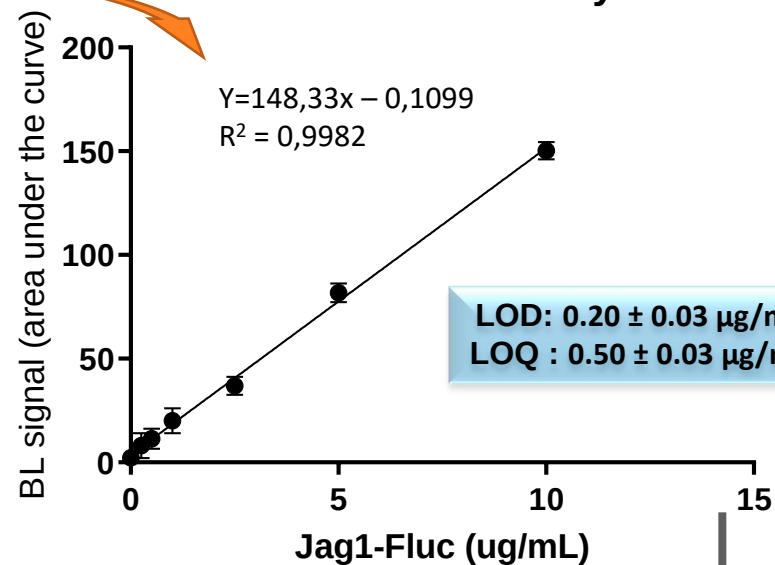
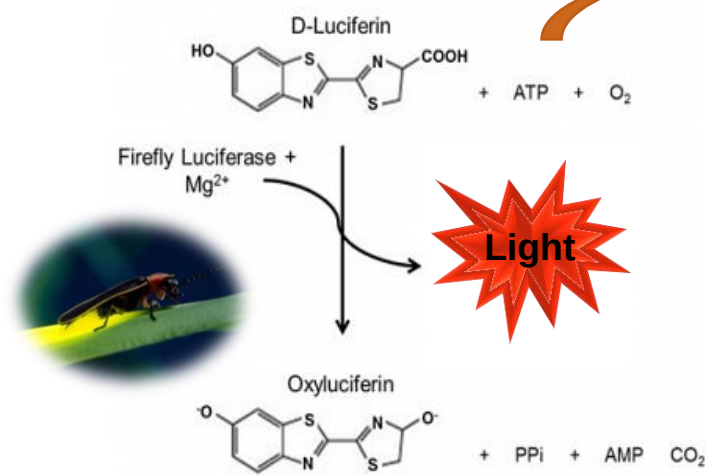
Sf9 cells

Sviluppo del metodo BL in un sistema cell-free

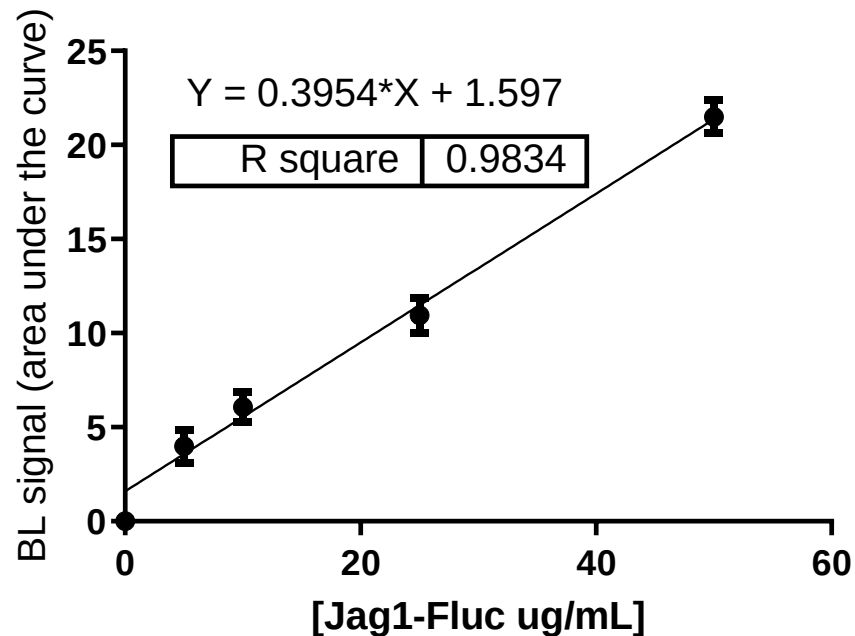
Jag1 Fluc Spectrum



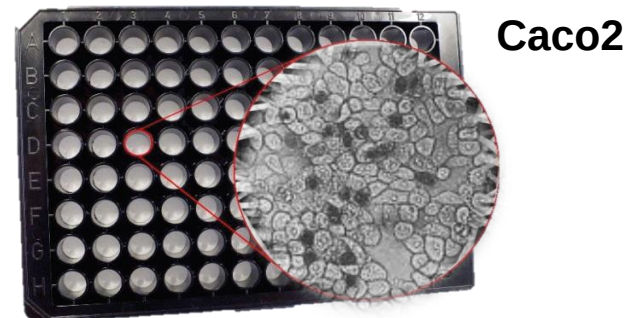
Cell-free bioassay



Costruzione della retta di calibrazione in cellule umane di adenocarcinoma del colon (Caco2) fissate



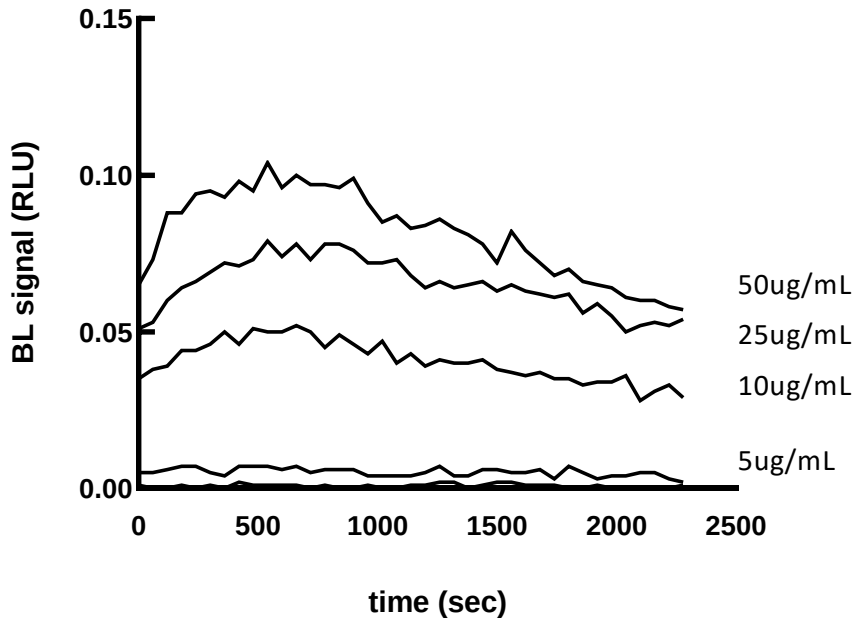
LOD: $0.8 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$
LOQ : $6.0 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$



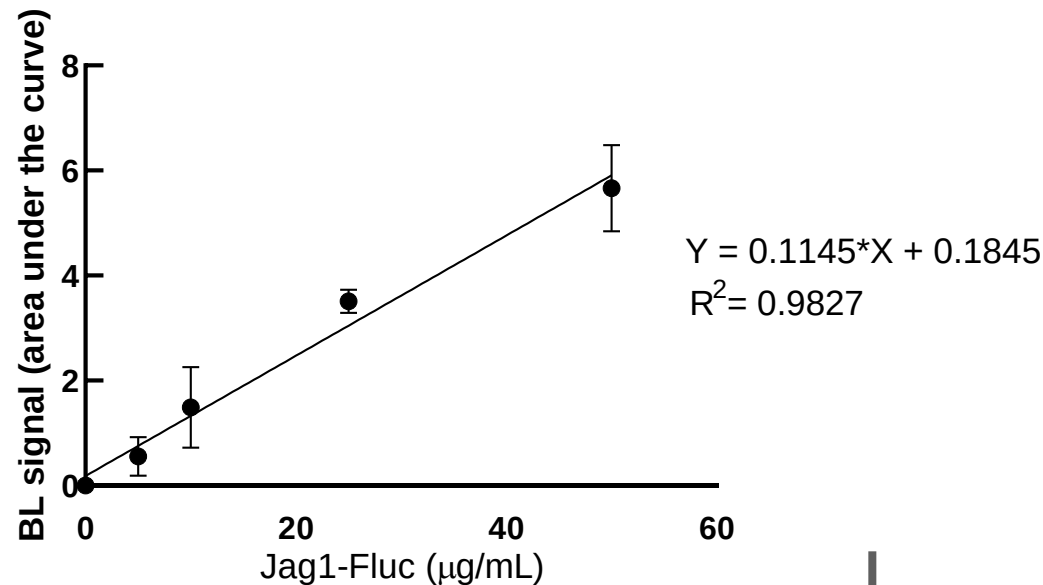
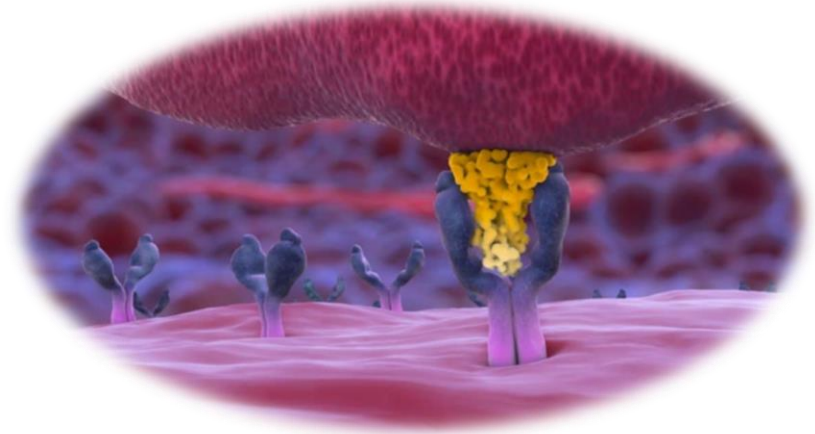
Varioskan



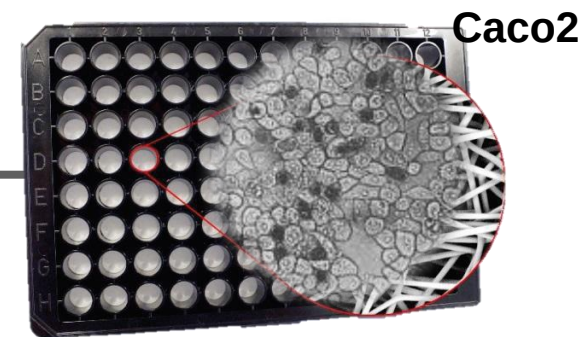
Costruzione della retta di calibrazione in "living cells" (Caco2)



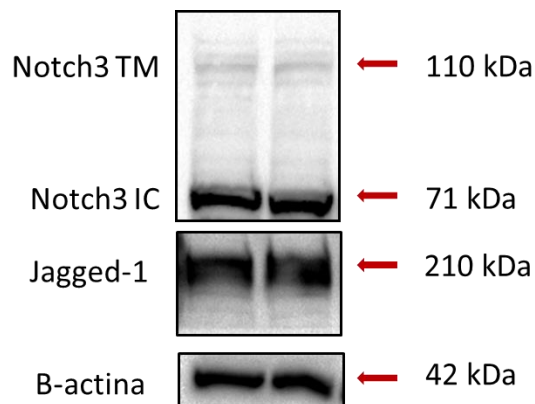
LOD: $0.4 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$
LOQ: $3.0 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$



Valutazione della selettività di Jag1-Fluc in Caco2

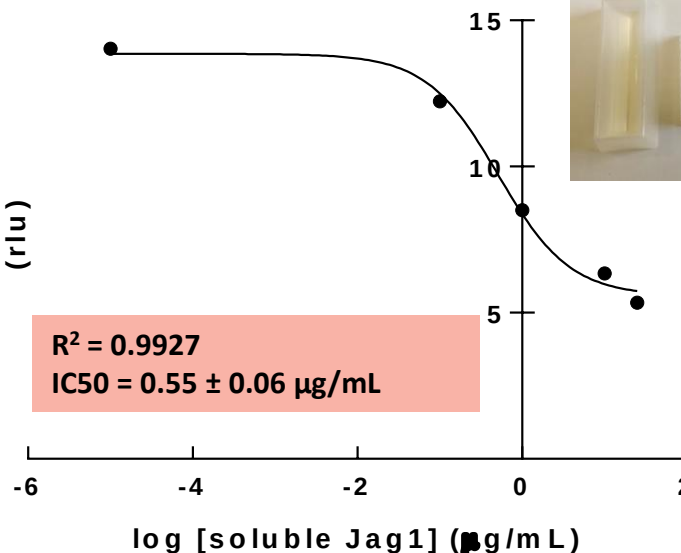


Caco2

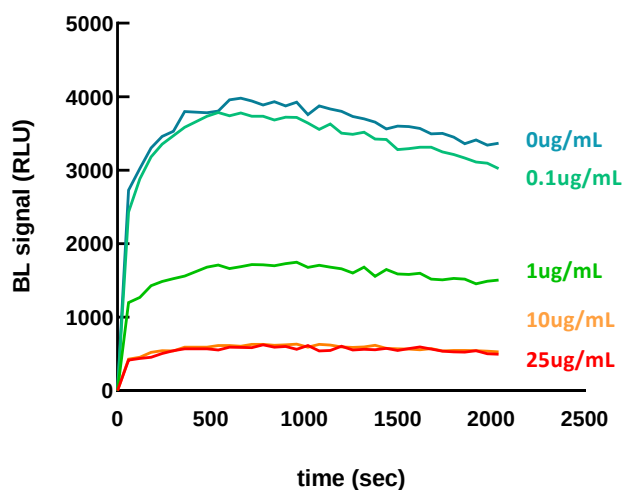


Soluble Jag1
then,
Jag1-Fluc

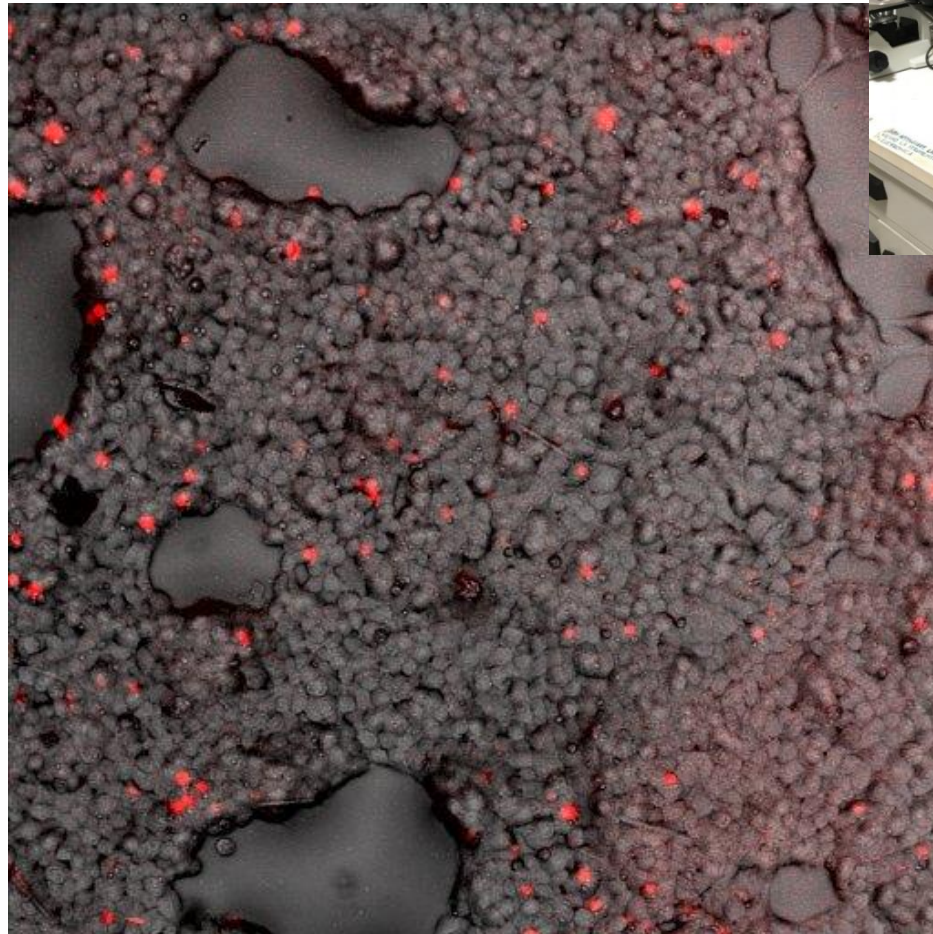
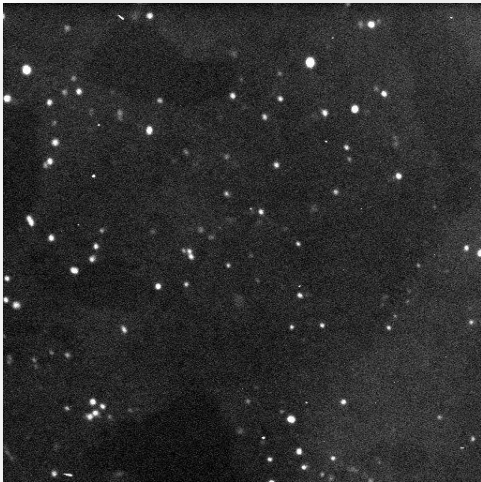
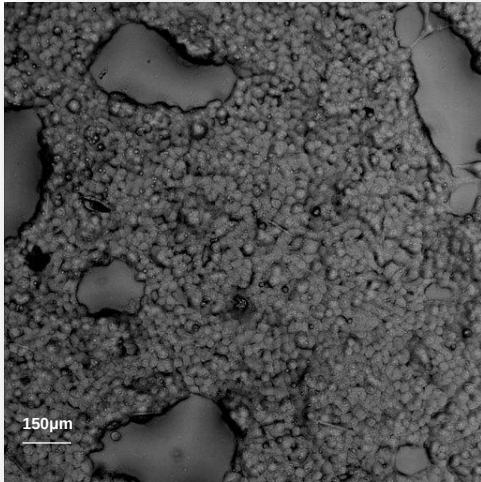
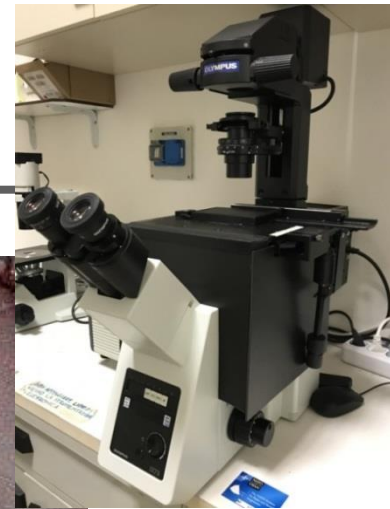
Relative BL signal
(rlu)



Varioskan

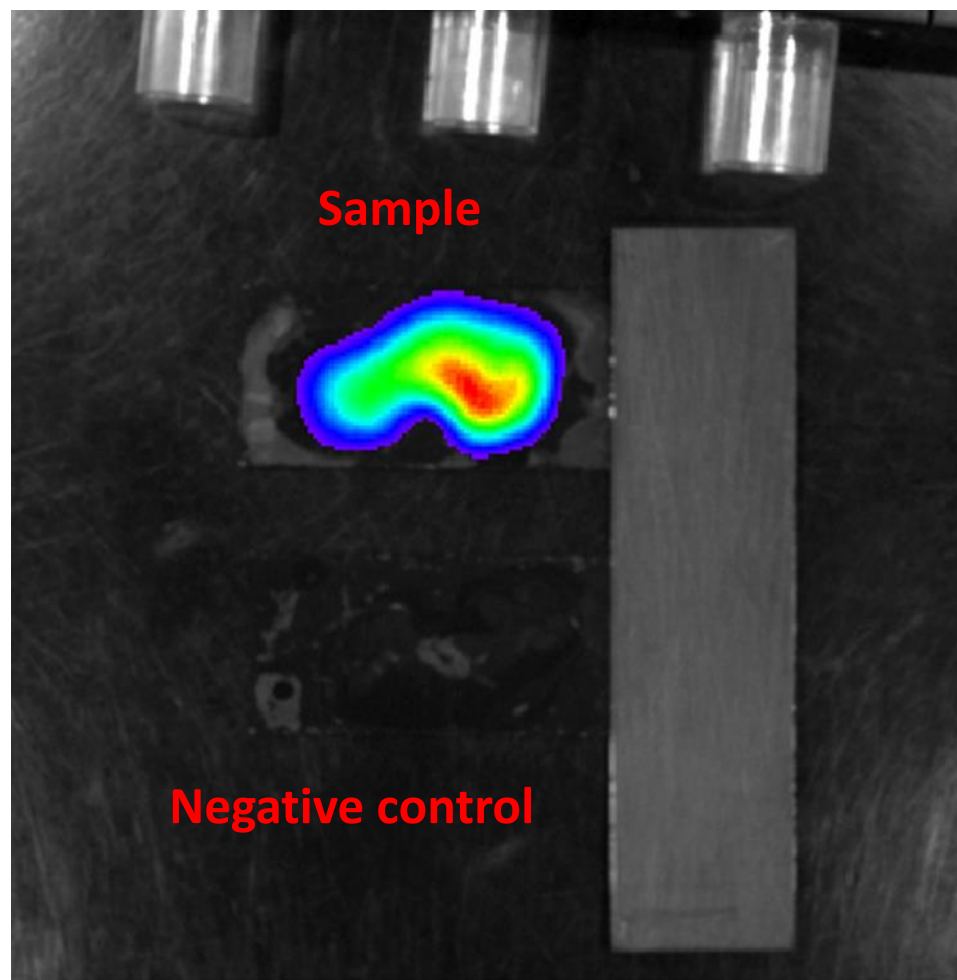


BL imaging su cellule umane di adenocarcinoma del colon (Caco2)

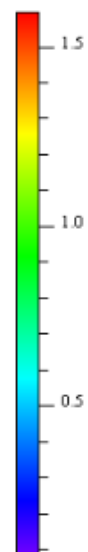


Jag1-Fluc binding with Notch 3 in Caco2 cells

BL imaging su campioni biotici

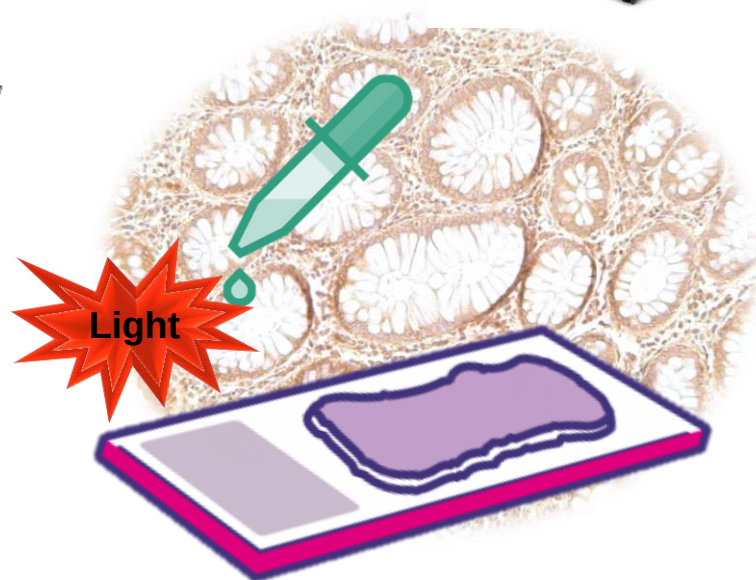


Luminescence



Radiance
(p/sec/cm²/sr)

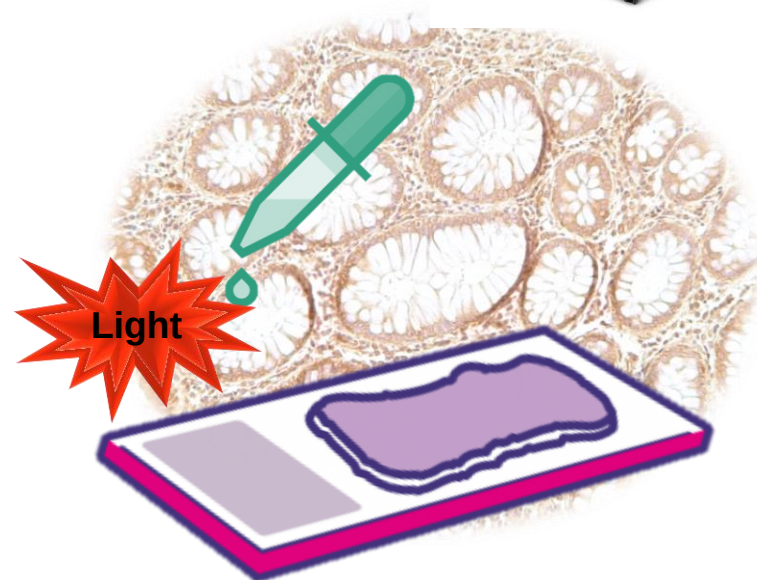
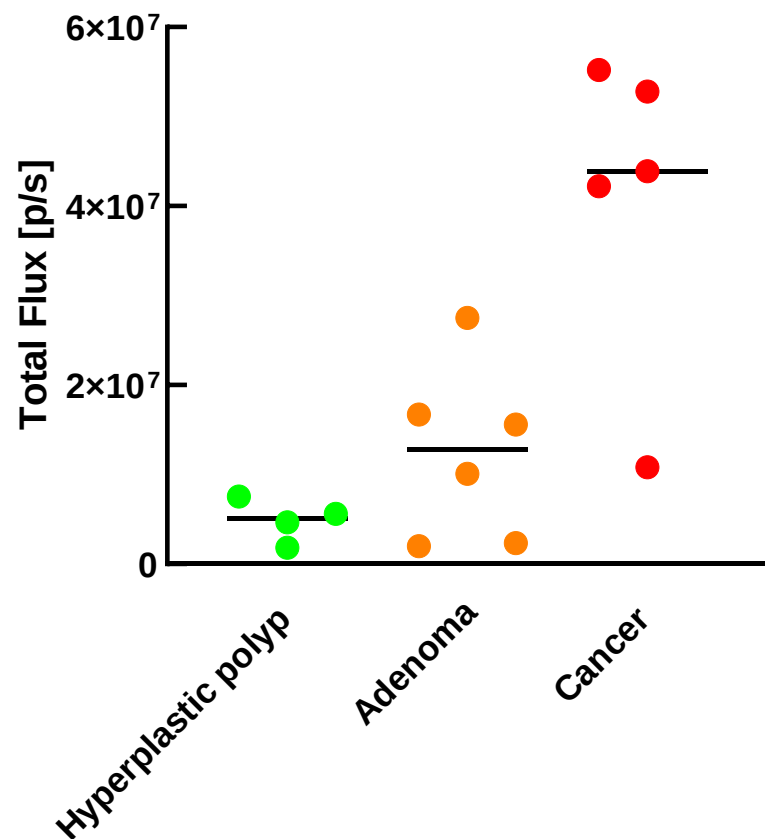
Color Scale
Min = 8.29e5
Max = 1.60e7



Erasmus MC
University Medical Center Rotterdam



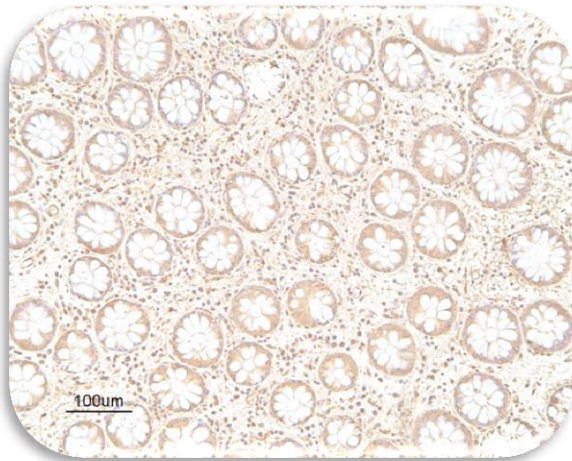
BL imaging su campioni bioptici



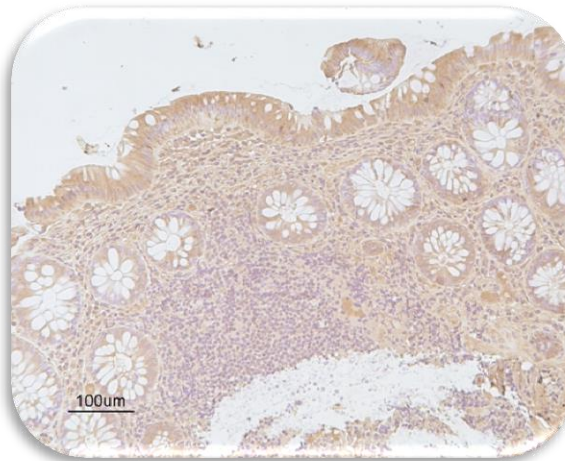
Erasmus MC
University Medical Center Rotterdam



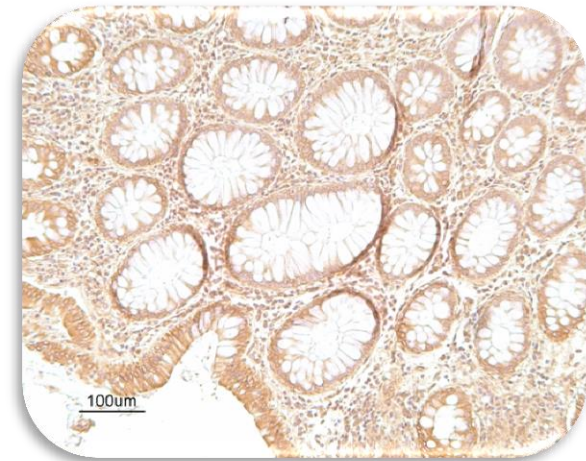
IHC su campioni biotici per Notch3



Polipo iperplastico



Polipo
adenomatoso con
displasia di basso
grado



Adenocarcinoma



Conclusioni e “work in progress”

- ✓ Abbiamo dimostrato la possibile applicazione della proteina ricombinante bioluminescente Jagged1-FLuc sia per la quantificazione che per l'imaging del Notch signaling su cellule Caco2 e su campioni biotici umani.
- ✓ Valuteremo se il legame di Jag1 con i recettori Notch sia rappresentativo e predittivo della progressione del cancro al colon nelle biopsie dei soggetti arruolati, quindi rilevante per applicazioni diagnostiche e terapeutiche.
- ✓ Valuteremo il possibile utilizzo di Jag1-Fluc nella «early detection» del cancro al colon su **esosomi** da biopsie liquide, estratti con un metodo miniaturizzato di Flow Field Fractionation (FFF).
- ✓ Analizzeremo la composizione degli acidi biliari fecali dei soggetti arruolati nello studio clinico attraverso HPLC-ESI MS/MS e valuteremo la possibile correlazione con l'attivazione di Notch.

Ringraziamenti

University of Bologna Bioanalytical Chemistry Lab.



Prof. Aldo Roda

Dr.ssa Patrizia Simoni

Dr.ssa Angela Punzo

Dr.ssa Alessia Silla

Dr. Emanuele Porru

Dr.ssa Rossana Comito



University of Ferrara Lab. of experimental cardiology

Prof.ssa Paola Rizzo

Prof. Antonio Pannuti



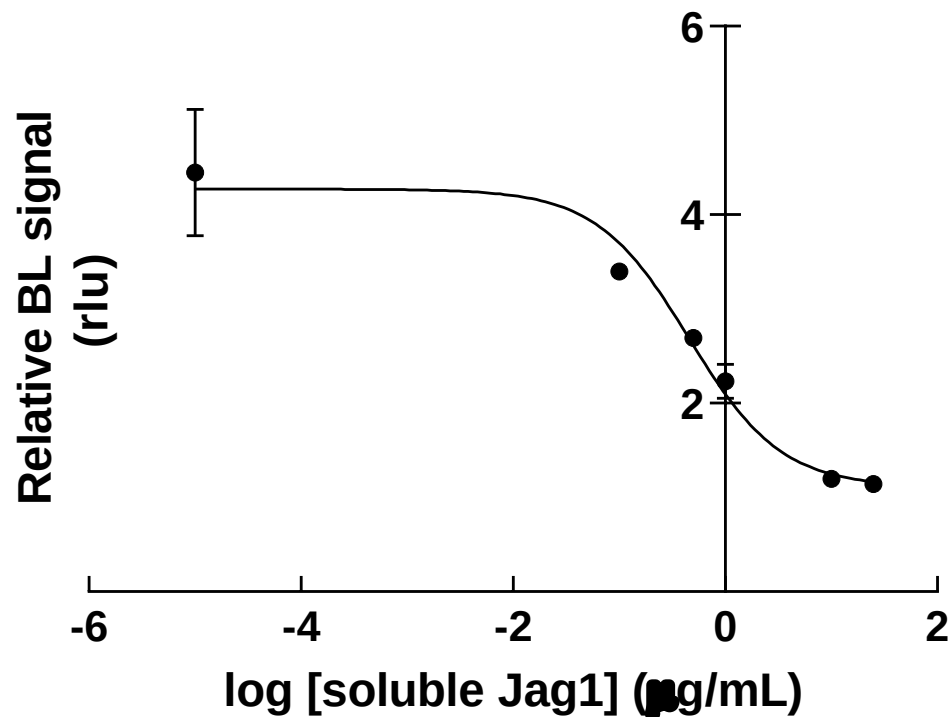
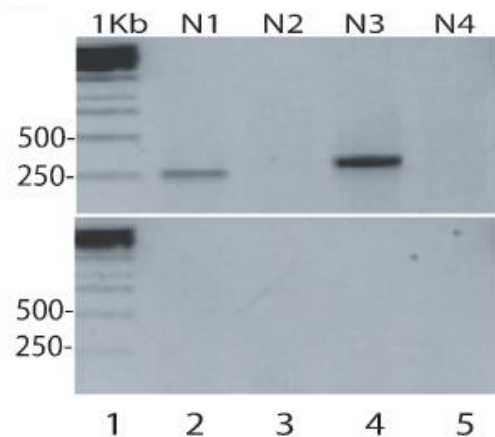
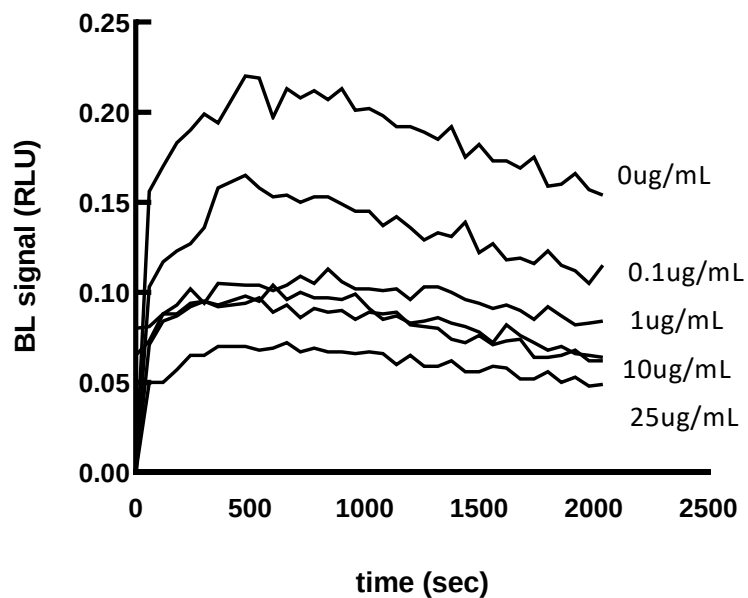
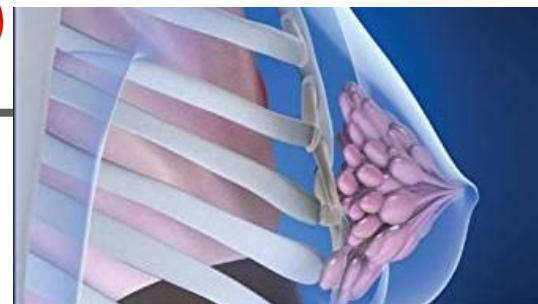
MINISTERO DELL'ISTRUZIONE,
DELL'UNIVERSITÀ E DELLA RICERCA

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

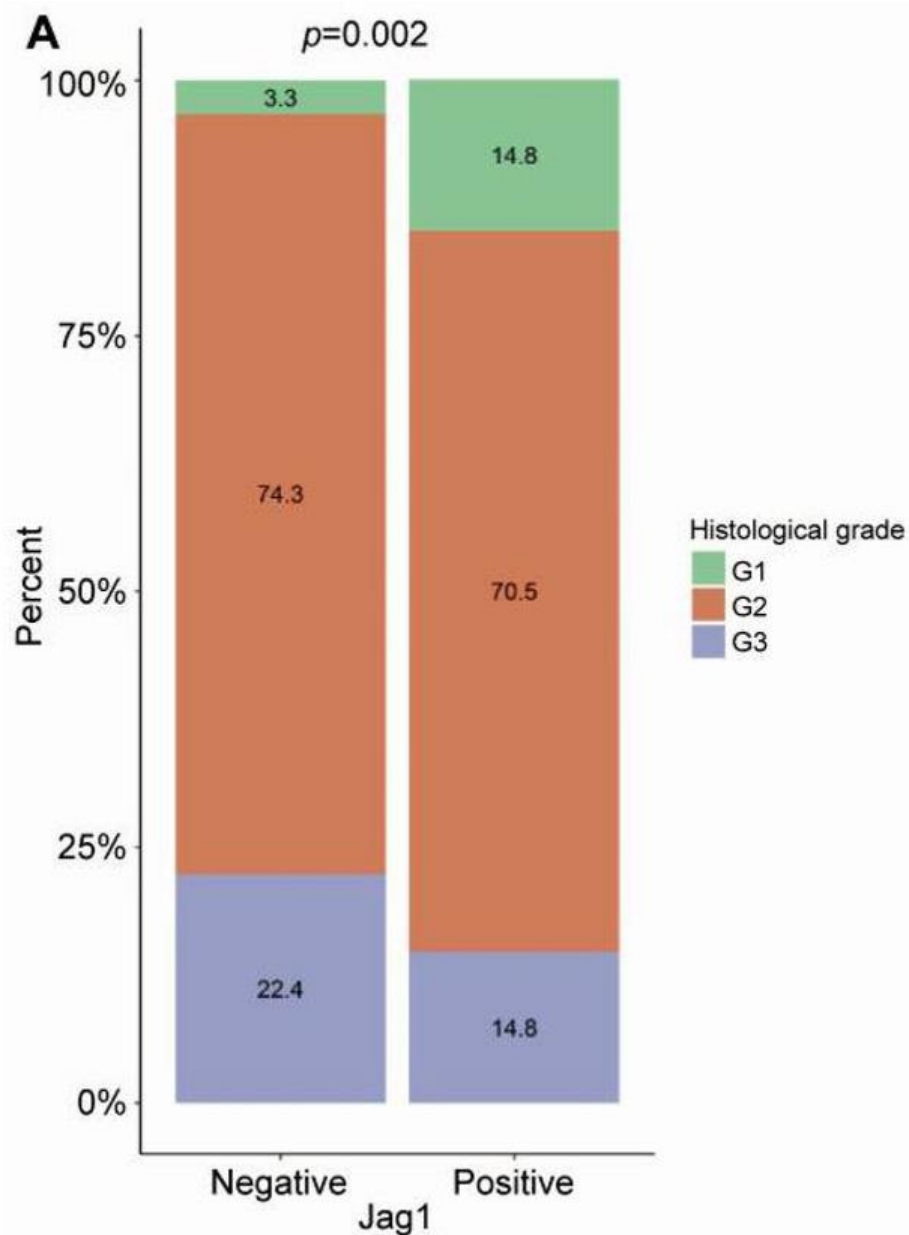
UNIBO. ALMA IDEA



Valutazione della selettività di Jag1-Fluc in cellule umane di tumore al seno ER+ (MCF7)

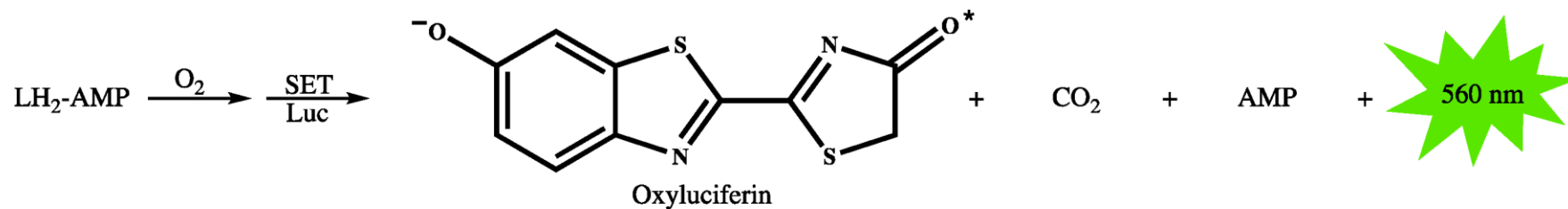
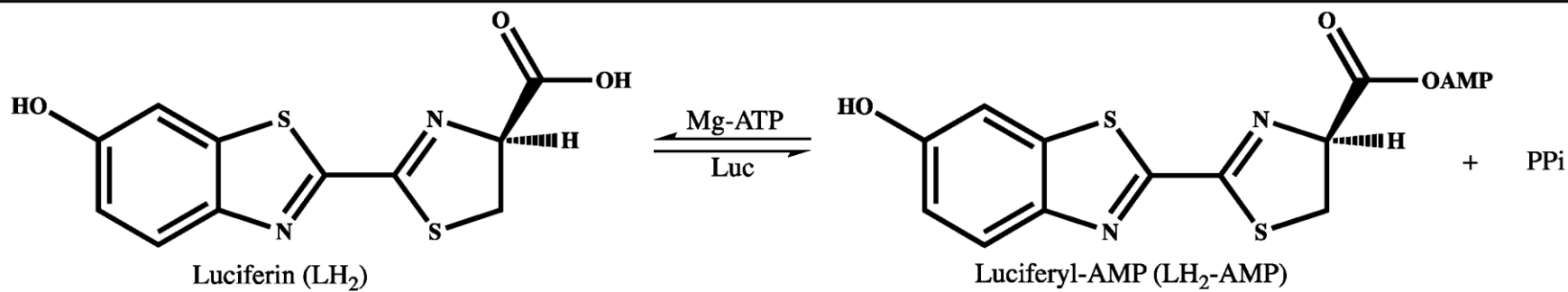


IC₅₀: 0.45 ± 0.05 ug/mL

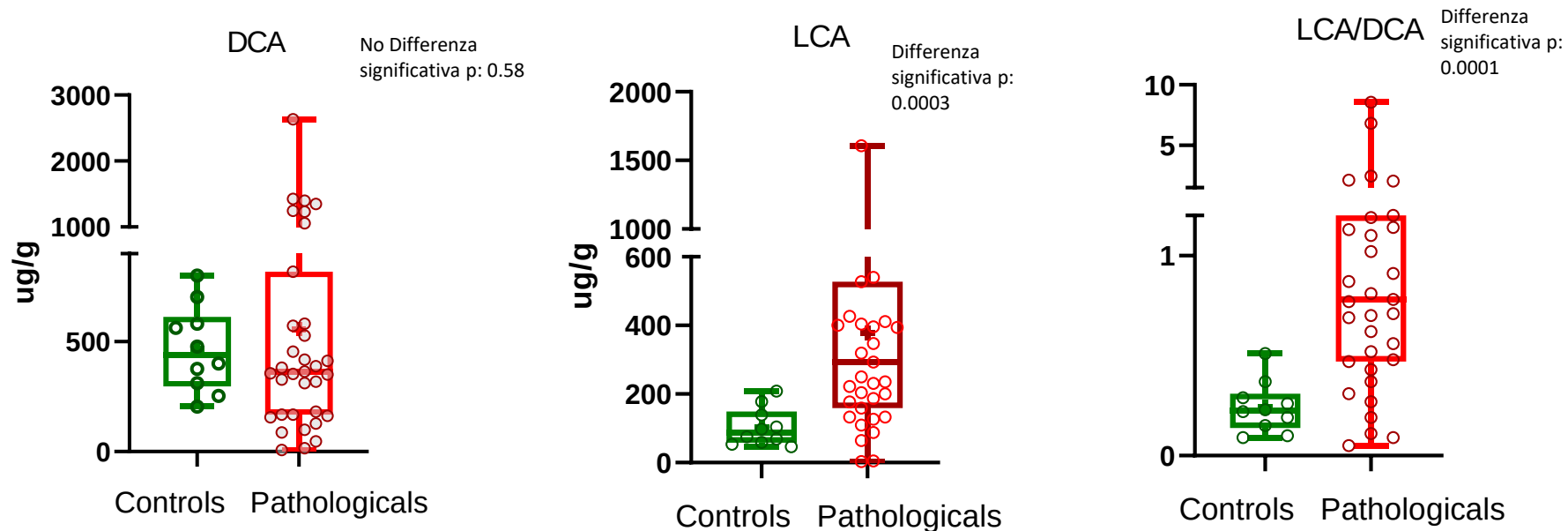


Jag1 IHC expression was significantly associated with histological grade ($p=0.002$). Jag1-positive tumors were more frequently of G1 histological grade compared to Jag1-negative tumors (14.8% vs. 3.3%).

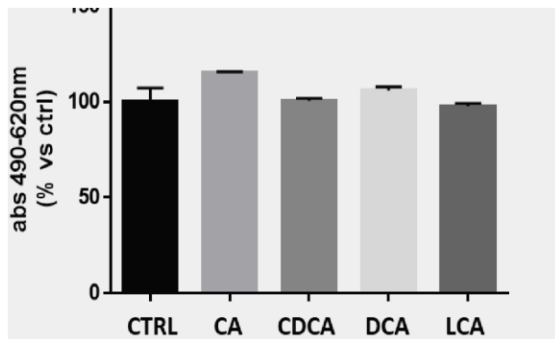
Rallis G et al. Anticancer Research 2019, 39 (4) 2129-2138.



Dosaggio degli acidi biliari secondari nei soggetti ALMA0118 (HPLC-ESI MS/MS)



1. Dosaggio spettrofotometrico della lattato deidrogenasi (LDH) per valutare la citotossicità cellulare



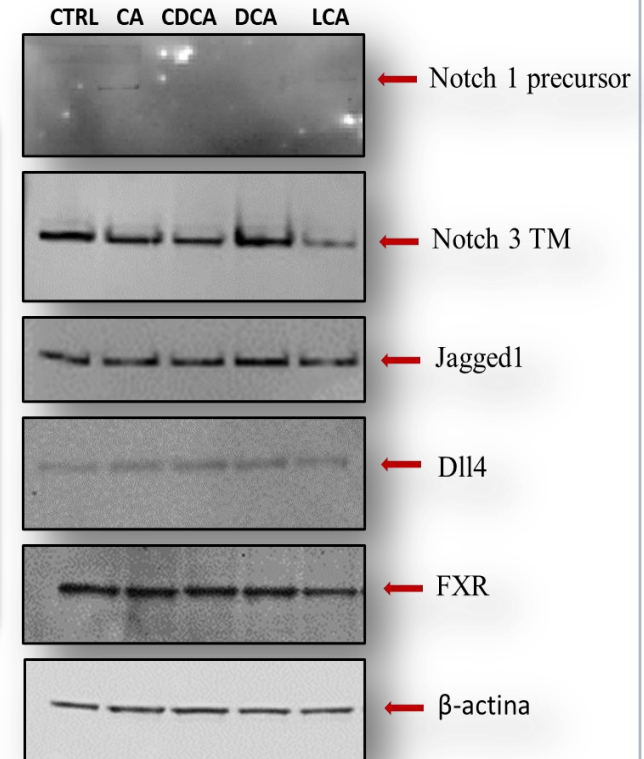
Il trattamento con i BAs CA, CDCA, DCA e LCA (10 μ M per 24h) **non è citotossico** per le cellule.

2. Western Blot

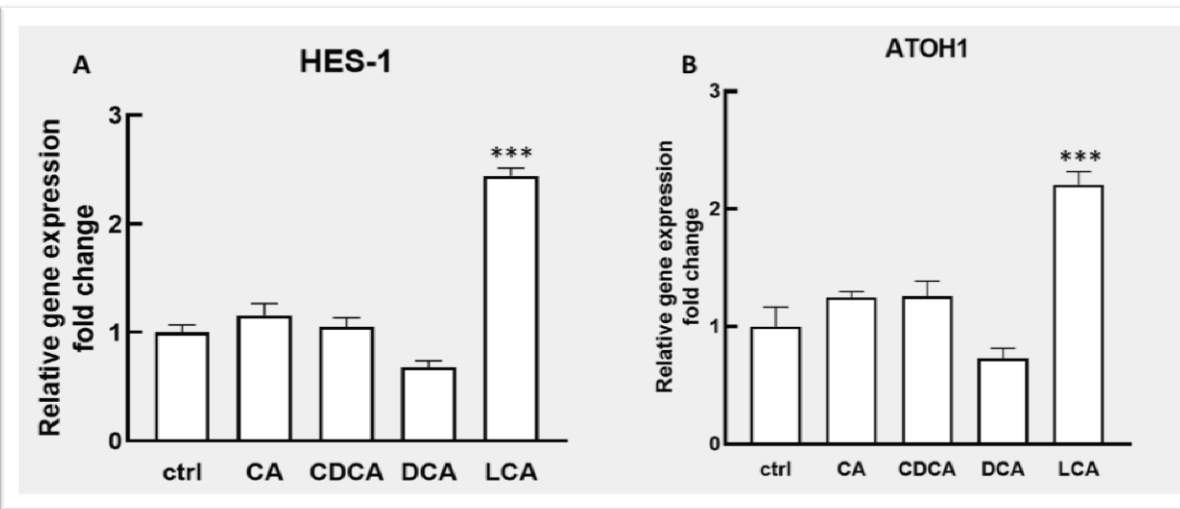
Il trattamento con DCA e LCA modula l'attivazione di **Notch3** in maniera opposta:

- **LCA riduce Notch3 trans-membrana**
- **DCA aumenta Notch3 trans-membrana**

→ Il trattamento con **LCA** riduce **FXR**.



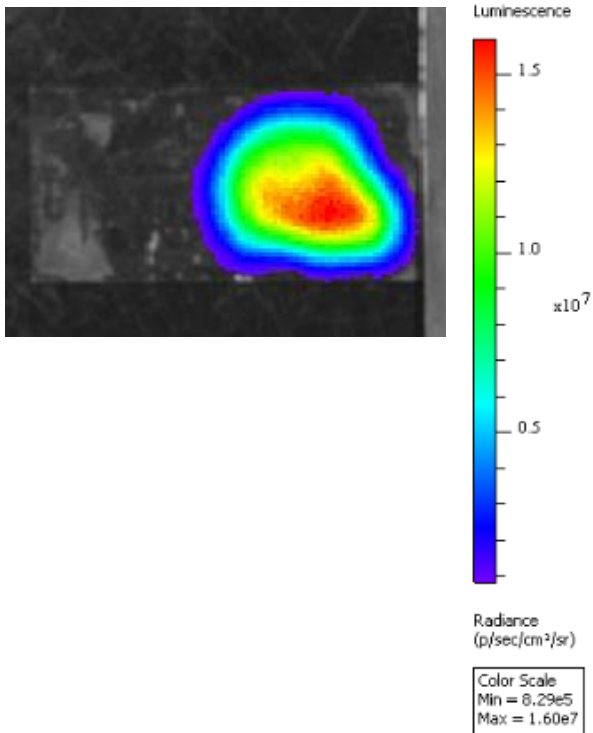
3. Real-Time PCR



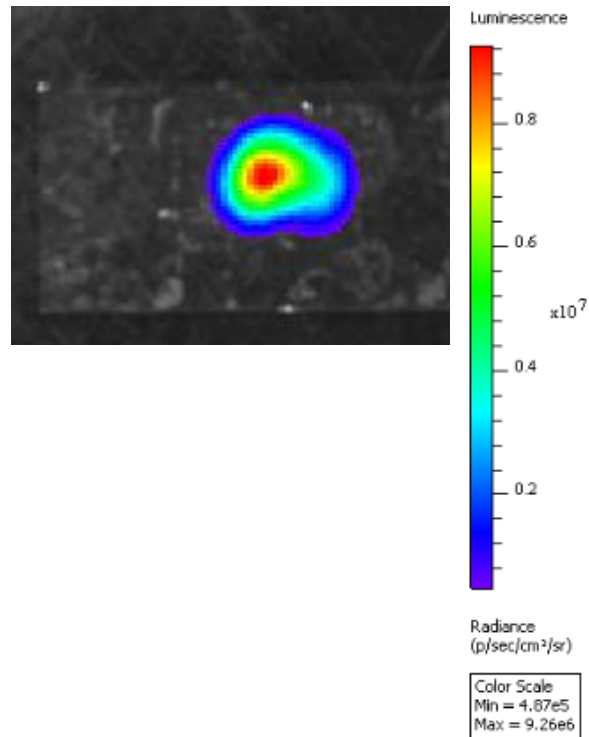
Il trattamento con **LCA induce** l'espressione dei geni target della segnalazione di Notch: **Hes1 e Atoh1**.

BL Imaging on human biopsies

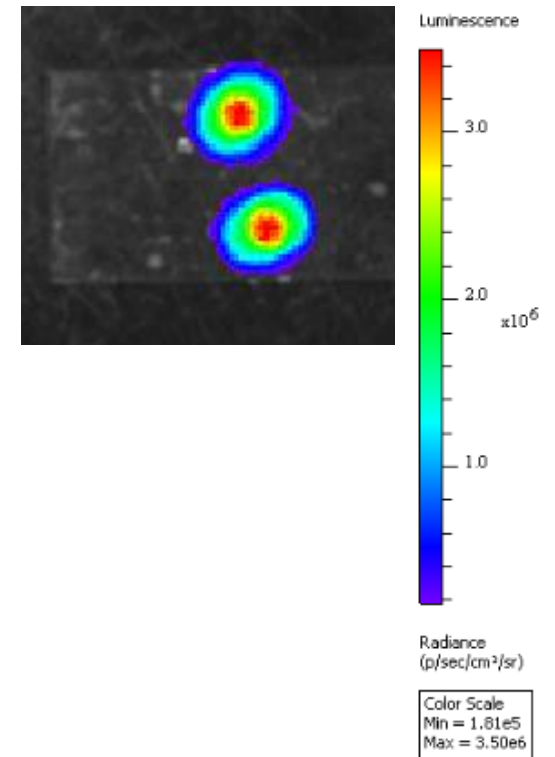
Cancer



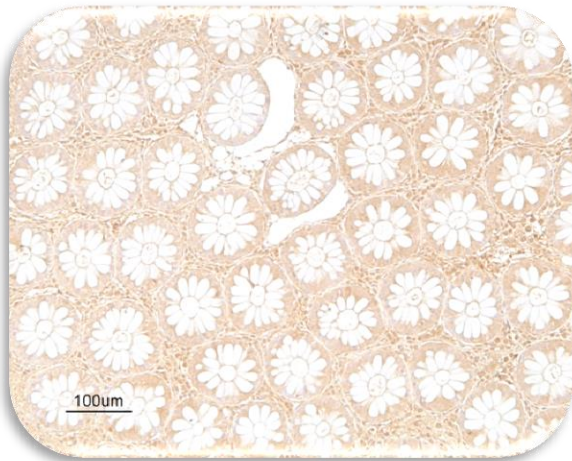
Adenoma



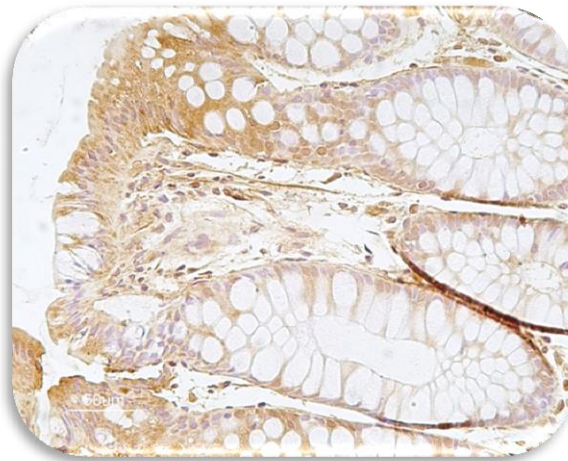
Hyperplastic polyp



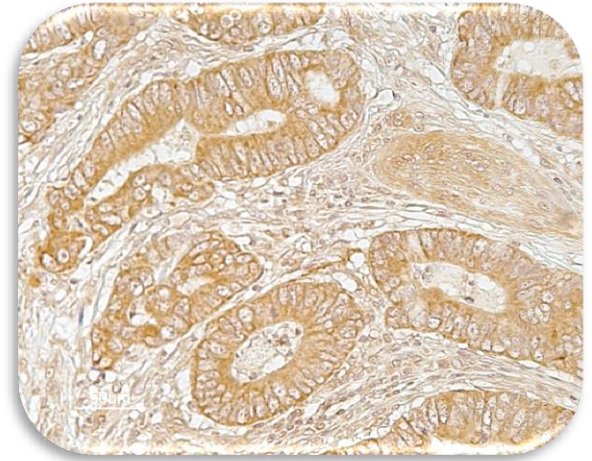
IHC su campioni biotici per Jagged1



Polipo iperplastico



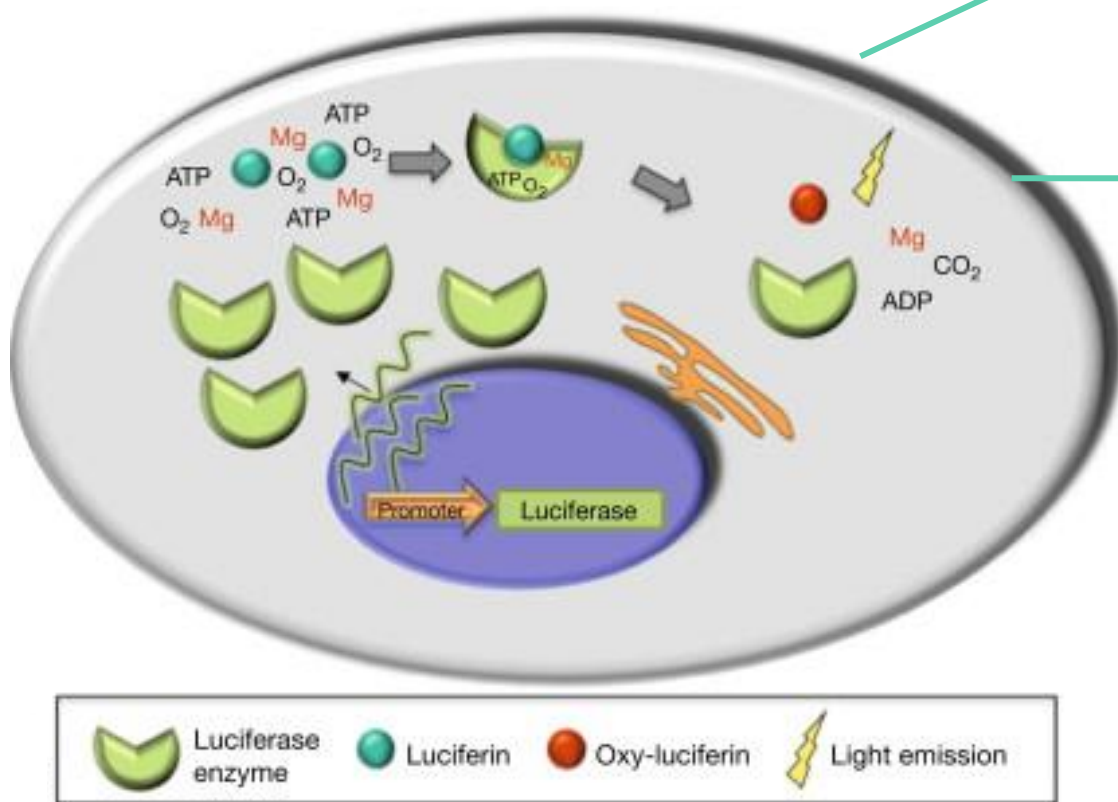
Polipo
adenomatoso con
displasia di basso
grado



Adenocarcinoma

Bioluminescenza

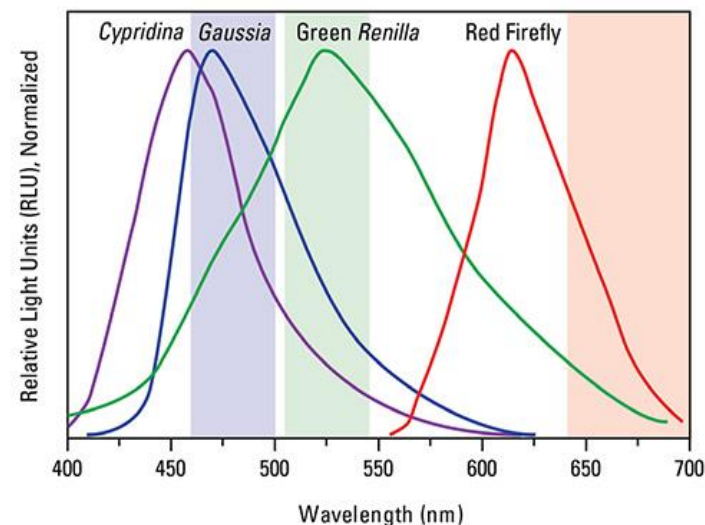
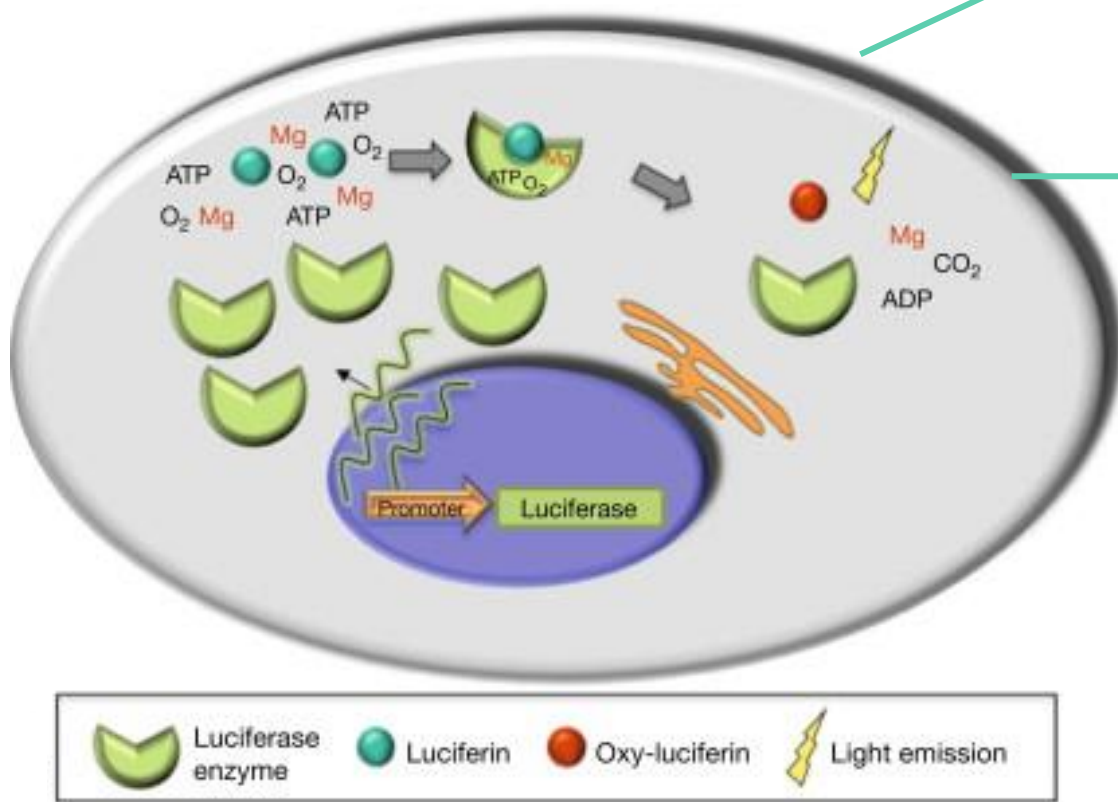
La bioluminescenza è un fenomeno nel quale la luce viene prodotta da un organismo vivente attraverso una reazione biochimica, fenomeno che coinvolge enzimi o fotoproteine.



- ✓ Elevato rapporto segnale/rumore
- ✓ Utilizzabili per studi quali e quantitativi
- ✓ Strumentazione semplice
- ✓ Non sono necessarie sorgenti di fotoeccitazione esterna e di selettori di lunghezze d'onda

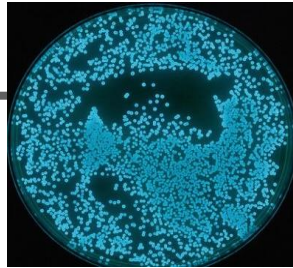
Bioluminescenza

La bioluminescenza è un fenomeno nel quale la luce viene prodotta da un organismo vivente attraverso una reazione biochimica, fenomeno che coinvolge enzimi o fotoproteine.



Branchini B ... Roda A. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23(5), 2451

Bioluminescenza



IVaC

Aristotele

XVI secolo

Ulisse Aldrovandi



1602

Pubblicazione del libro «De Animalibus Insectis»



XIX secolo

Dubois

XX secolo

Harvey, Stevens,
McElroy, Hastings

XXI secolo

Osamu Shimomura,
Martin Chalfie, Roger Y.
Tsien



2008

Premio Nobel per la Chimica per *"The discovery and development of the green fluorescent protein"*



