

Titolo: “Analisi del contributo della perdita di polarità in un modello neurogenico di tumore cerebrale”

Tutor: Dr. Dario de Biase

Progetto di ricerca

Il termine “tumori cerebrali” indica una vasta gamma di neoplasie classificate in base alla funzione delle cellule da cui esse hanno origine. In base a questo criterio, l’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) distingue circa 200 tipi di tumori cerebrali. Una sottoclasse importante è rappresentata dai gliomi; tra essi, il glioblastoma multiforme (GBM) è il più frequente e aggressivo, non deriva da precedenti lesioni a basso grado ma si sviluppa *de novo* (Louis et al 2007). Nonostante sia storicamente classificato come neoplasia di origine gliale, si sta facendo sempre più largo in letteratura l’idea che possa anche originare da cellule con proprietà staminali (Ohgaki et al 2004).

La lesione molecolare più comune nel GBM è l’inattivazione dell’oncosoppressore *PTEN*. È stato dimostrato come questa alteri uno specifico asse molecolare composto dalla atypical Protein Kinase C (aPKC) e dal determinante di polarità Lethal giant larvae 1 (Lgl1). La perdita di *PTEN* promuove l’attivazione di aPKC, che a sua volta inibisce Lgl, prevenendo così il differenziamento delle cellule staminali (Gont et al 2013; Gont et al 2014).

Lgl1 è un oncosoppressore la cui funzione è evolutivamente conservata (Grifoni et al.2004). Alterazioni della sua espressione si ritrovano in diversi tumori umani (Grifoni et al 2004, Schimanski et al 2005; Grifoni et al.2007). Il sistema nervoso di *Drosophila*, largamente utilizzato come modello per patologie cerebrali, è formato da differenti popolazioni staminali e tra queste i neuroblasti di tipo II hanno un lignaggio che comprende un intermedio utilizzato per espandere la popolazione di cellule progenitrici (Boone e Doe 2008; Ming e Song 2011).

Il nostro laboratorio ha dimostrato che l’asse PTEN/aPKC/Lgl è conservato in *Drosophila* (Paglia et al 2017) e che la sua alterazione nei neuroblasti di tipo II porta alla formazione di tumori cerebrali adulti altamente neurogenici che continuano a crescere nell’adulto e uccidono gli animali prematuramente, mostrando un comportamento maligno.

Su queste basi, abbiamo in progetto di sfruttare il modello precedentemente costruito per dissezionare il ruolo della perdita di polarità nel meccanismo di progressione tumorale. Effettueremo un’analisi per RNAseq dei tumori cerebrali ottenuti nel moscerino adulto in seguito alla alterazione della divisione asimmetrica dei neuroblasti di tipo II, per poi compararne il profilo di espressione con quello di colture primarie di GBM con alterazioni nell’asse PTEN/aPKC/Lgl. Lavorando in un quadro sperimentale meno complesso, speriamo di riuscire a isolare il contributo della perdita di polarità (con conseguente perturbazione della divisione asimmetrica delle cellule staminali) allo sviluppo di questa classe di tumori cerebrali, e di trovare alcuni target la cui manipolazione nel modello animale ci permetta di comprendere la funzione della polarità cellulare nella genesi e nella progressione dei gliomi.

Attività dell’assegnista e piano di formazione

L’assegnista dovrà occuparsi dell’allevamento dei moscerini, della loro manipolazione genetica e della raccolta dei campioni per l’RNAseq. Effettuerà l’estrazione dell’RNA e tutto il procedimento fino al sequenziamento su piattaforma Illumina. Parteciperà all’analisi bioinformatica dei dati ottenuti, validerà i target individuati tramite RT-qPCR e quindi procederà al loro silenziamento o sovra-espressione all’interno del medesimo sistema genetico, al fine di individuarne il ruolo nel processo di tumorigenesi. Valuterà la crescita e l’invasione grazie all’osservazione delle dimensioni e della distribuzione delle masse tumorali, e diverse caratteristiche di malignità tramite analisi di immunofluorescenza. Effettuerà inoltre saggi di vitalità e di capacità neuromotoria *in vivo*.

Qualora la comparazione dei profili di espressione dei tumori indotti sperimentalmente nel modello animale e delle cellule derivate da pazienti con GBM rivelasse alcuni target comuni di interesse, l'assegnista potrà, durante l'anno dell'assegno o in seguito, trascorrere un periodo presso il laboratorio del Prof. Ian Lorimer, "The Ottawa Hospital- Research Institute", dove si occuperà della manipolazione genetica delle linee cellulari umane e della loro iniezione intracranica in topi SCID. Questo permetterà di riscontrare eventuali modificazioni dei tratti fenotipici del tumore e di correlarle alla funzione dello specifico target.

Dal punto di vista della formazione, l'assegnista sarà da me convocato quindicinalmente per riportare e discutere i dati ottenuti e programmare le attività delle settimane entranti. L'assegnista si occuperà anche della presentazione dei dati durante i lab meeting e della preparazione di poster, presentazioni orali e lavori scientifici inerenti al progetto. Inoltre, l'assegnista potrà partecipare a Conferenze nazionali o internazionali sugli argomenti di pertinenza del Progetto.

Bibliografia

- Grifoni, D., Garoia, F., Schimanski, C. et al. The human protein Hugl-1 substitutes for *Drosophila* Lethal giant larvae tumour suppressor function in vivo. *Oncogene* (2004)
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* (2004)
- Carl C Schimanski, Gosta Schmitz et al. Reduced expression of Hugl-1, the human homologue of *Drosophila* tumour suppressor gene *lgl*, contributes to progression of colorectal cancer. *Oncogene* (2005)
- Grifoni, D., Garoia, F., Bellosta, P. et al. aPKC ζ cortical loading is associated with *Lgl* cytoplasmic release and tumor growth in *Drosophila* and human epithelia. *Oncogene* (2007)
- Paglia S. et al. Failure of the PTEN/aPKC/*Lgl* Axis Primes Formation of Adult Brain Tumours in *Drosophila*. *BMRI* (2017)
- Gont A. et al. PTEN loss represses glioblastoma tumor initiating cell differentiation via inactivation of *Lgl1*. *Oncotarget* (2013)
- Gont A. et al. Inhibition of glioblastoma malignancy by *Lgl1*. *Oncotarget* (2014)
- Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* (2007)
- Boone J.Q. and Doe C.Q. Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol* (2008)
- Ming G.L. and Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* (2011)