**Progetto di Ricerca**

Titolo: “Phospholipid- dependent signal transduction in cancer cells aggressiveness”

**Tutor**: Prof.ssa Giulia Ramazzotti

**Base di partenza scientifica**

La trasduzione del segnale fosfoinositide(PI)-dipendente regola numerosi processi cellulari, quali la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, il rimodellamento della cromatina, il *trafficking* vescicolare e molti altri processi di omeostasi cellulare[1]. Le chinasi e le fostatasi che regolano il *pool* dei fosfoinositidi sono presenti sia a livello citosolico che a livello nucleare sottolineando come i fosfoinositidi possano regolare diverse funzioni cellulari in base alla loro specifica topografia[2]. Tra gli enzimi che partecipano al *signaling* lipidico, le Fosfolipasi C (PLC) sono coinvolte in una vasta gamma di funzioni quali crescita, proliferazione, sopravvivenza e migrazione che risultano essere alterate nel processo di carcinogenesi [3, 4,]. La famiglia delle PI-PLC comprende 13 isoforme suddivise in 6 classi in base alla loro struttura, tutte in grado di idrolizzare il fosfatidilinositolo 4,5 -bisfosfato [PI(4,5) P2] con rilascio di due secondi messaggeri: diacilglicerolo (DAG) e inositolo 1,4,5- trisfosfato (IP3). Il DAG a sua volta può stimolare diversi enzimi, mentre IP3 mobilita i depositi intracellulari di Ca2+. Il rilascio e l’uptake transienti di Ca2+ sono in grado di stimolare il metabolismo cellulare e costituiscono un segnale che favorisce la sopravvivenza cellulare, mentre un rilascio persistente di Ca2+ dal reticolo endoplasmatico determina un sovraccarico di Ca2+ mitocondriale con conseguente apoptosi[5]. Ne consegue che l’omeostasi del Ca2+ dipendente dall’attività delle PLC, svolge un ruolo fondamentale nel determinare il destino cellulare. Le diverse isoforme della PLC sono inoltre in grado di influenzare le principali vie oncogeniche coinvolte nel cancro, quali PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MAPK/ERK, e JAK/STAT.

Alterazioni nell’attività e nell’espressione di diverse isoforme di PLC sono state identificate in numerose neoplasie umane. Infatti la PLCβ è coinvolta nello sviluppo di tumori neuroendocrini e in disordini ematologici [6,7,8], la PLCγ è stata implicata nel cancro al seno, carcinoma al colon [9, 10], leucemia linfocitica e angiosarcoma [11], la PLCδ nel carcinoma esofageo a cellule squamose (ESCC) [12], infine la PLCε nel cancro allo stomaco [13] e al colon-retto (CRC) [14]. Tuttavia il ruolo svolto dalle diverse isoforme della PLC nel cancro rimane ancora non ben definito e spesso controverso. Ad esempio l’espressione della PLCε aumenta nel cancro allo stomaco ma diminuisce nel cancro al colon-retto. Inoltre studi recenti hanno descritto la PLCδ1 come *tumor suppressor* nel cancro al seno [6] e nell’ESCC [12].

Le DAG chinasi (DGK) rappresentano invece una famiglia di enzimi la cui attività è strettamente correlata dal punto di vista funzionale alle PLC. Questa famiglia è costituita da 10 membri (α, β, γ, δ, ε, ζ, η, θ, ι e κ) che partecipano al ciclo dei fosfoinositidi attraverso la fosforilazione del DAG e la conseguente produzione di acido fosfatidico (PA). A sua volta il PA regola l’attività di una serie di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, quali mTOR (mammalian target of rapamycin) [15], PIP5K (phosphatidylinositol-4-phosphate 5- chinasi), Ras-GAP (GTPase-activating protein), Raf-1 (rapidly accelerated fibrosarcoma -1) chinasi e le protein chinasi C (PKC atipiche) [16]. La conversione del DAG in PA rappresenta inoltre il primo passo per la risintesi del fosfatidilinositolo, determinando un incremento dei livelli di PI(4,5)P2[17]. Ne risulta che l’attività delle DGK è fondamentale per mantenere l’equilibrio tra i due lipidi bioattivi DAG e PA.

Diversi studi hanno evidenziato il coinvolgimento delle diverse isoforme di DGK nello sviluppo e nella progressione del cancro[18–20]. Infatti sono state individuate mutazioni a carico del gene codificante per la DGKα che favoriscono lo sviluppo del cancro al pancreas[18] e la progressione del carcinoma epatocellulare (HCC) attraverso l’attivazione della via della MAP chinasi (MAPK)[21]. Nel CRC, la DGKγ agisce da *tumor suppressor*, mentre la DGKζ promuove la progressione tumorale [20, 22]. Inoltre, la DGKε e DGKδ sono in grado di regolare la crescita e la proliferazione di linee cellulari tumorali cervicali [23, 24], mentre nelle cellule di glioblastoma e HCC sono state evidenziate alterazioni epigenetiche a carico della DGKι [25, 26].

Anche per quanto riguarda le DGK la comprensione delle funzioni cellulari regolate da questi enzimi nel cancro non è ancora esaustiva, sottolineando l’importanza di comprendere meglio il ruolo di entrambe le famiglie di enzimi coinvolti nella trasduzione del segnale, PLC e DGK, per identificare i meccanismi che portano ad un incremento della crescita tumorale e alla sua disseminazione, oltre a provvedere nuovi strumenti per la stratificazione dei pazienti e per l’identificazione di nuovi potenziali bersagli terapeutici.

**Obiettivo della ricerca**

Obiettivo di questo progetto è definire i mediatori del *signaling* lipidico correlati ad una maggiore aggressività delle cellule tumorali, per raggiungere una visione globale del coinvolgimento delle vie di trasduzione del segnale nell’incremento di invasività, mobilità e capacità di formare metastasi delle cellule neoplastiche.

Il progetto descritto ha lo scopo di individuare le isoforme di PLC e DGK maggiormente coinvolte in questi processi patologici, definendo l’importanza delle loro variazioni sia a livello trascrizionale che proteico. La valutazione degli effetti dell’overespressione e silenziamento di queste molecole target permetterà di comprenderne meglio l’importanza per poi definire come le variazioni identificate vadano ad alterare l’attività di enzimi coinvolti nella trasduzione del segnale a valle.

Successivamente, l’obiettivo consisterà nell’individuare molecole bersaglio la cui modulazione permetta di ripristinare la fisiologia della crescita cellulare, una riduzione della capacità invasiva e della mobilità delle cellule neoplastiche. In questo modo, le PLCs, le DGKs e i mediatori appartenenti a queste vie di trasduzione del segnale potrebbero essere utilizzati, nei pazienti sia come markers diagnostico-prognostici permettendo di stratificare la terapia in base al paziente e alla forma tumorale, sia come bersagli molecolari per un’eventuale terapia specifica personalizzata basata sulla regolazione delle stesse molecole.

**Piano di Attività di Formazione dell’Assegnista**

L’assegnista, per poter eseguire la fase sperimentale del progetto intitolato “Phospholipid- dependent signal transduction in cancer cell aggressiveness”, dovrà essere in possesso di alcune tecniche fondamentali:

* Coltura di linee cellulari e cellule primarie e loro trasduzione.
* Creazione di cloni stabili.
* Coltura batterica e estrazione di DNA plasmidico.
* Estrazione di RNA e DNA da cellule cresciute in monostrato.
* Estrazione di proteine nucleari e citoplasmatiche da cellule cresciute in monostrato per analisi in Western Blotting.
* Preparazione di campioni per immunofluorescenza.
* Real Time PCR.
* Allestimento saggi di vitalità.

L’obiettivo primario del percorso formativo sarà l’integrazione dell’assegnista nel progetto di ricerca, ed è quindi necessario che apprenda o approfondisca le seguenti tecniche:

• Allestimento saggi di proliferazione con BrdU.

• Allestimento saggi di adesione alla matrice extracellulare.

• Allestimento saggi di migrazione (Transwell Cell Migration Assay).

• Allestimento saggi di formazione di colonie (Soft Agar Colony formation Assay).

• Analisi di immagine mediante software dedicati.

**Bibliografia**

[1.] Balla, T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.* **93,** 1019–137 (2013).

[2.] Cocco, L., Follo, M. Y., Manzoli, L. & Suh, P.-G. Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease. *J. Lipid Res.* **56,** 1853–60 (2015).

[3.] Liu, W.; Cai, M. J.; Zheng, C. C.; Wang, J. X.; Zhao, X. F. Phospholipase Cγ1 Connects the Cell Membrane Pathway to the Nuclear Receptor Pathway in Insect Steroid Hormone Signaling. *J. Biol. Chem.*, **2014**, *289* (19), 13026–13041.

[4.] Stallings, J. D.; Tall, E. G.; Pentyala, S.; Rebecchi, M. J. Nuclear Translocation of Phospholipase C-Δ1 Is Linked to the Cell Cycle and Nuclear Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280* (23), 22060–22069.

[5.] Missiroli, S., Danese A., Iannitti T., Patergnani S., Perrone M., Previati M., Giorgi C., Pinton P. Endoplasmic reticulum-mitochondria Ca 2+ crosstalk in the control of the tumor cell fate Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. , 2017. 1864(6): p. 858-64.

[6.] Shao, Q.; Luo, X.; Yang, D.; Wang, C.; Cheng, Q.; Xiang, T.; Ren, G. Phospholipase Cδ1 Suppresses Cell Migration and Invasion of Breast Cancer Cells by Modulating KIF3A-Mediated ERK1/2/β- Catenin/MMP7 Signalling. *Oncotarget*, **2017**, *8* (17), 29056–29066.

[7.] Follo, M. Y.; Manzoli, L.; Poli, A.; McCubrey, J. A.; Cocco, L. PLC and PI3K/Akt/MTOR Signalling in Disease and Cancer. *Adv. Biol. Regul.*, **2015**, *57*, 10–16

 [8.] Ramazzotti, G.; Faenza, I.; Fiume, R.; Billi, A. M.; Manzoli, L.; Mongiorgi, S.; Ratti, S.; McCubrey, J. A.; Suh, P.-G.; Cocco, L.; et al. PLC-Β1 and Cell Differentiation: An Insight into Myogenesis and Osteogenesis. *Adv. Biol. Regul.*, **2017**, *63*, 1–5.

[9.] Arteaga, C. L.; Johnson, M. D.; Todderud, G.; Coffey, R. J.; Carpenter, G.; Page, D. L. Elevated Content of the Tyrosine Kinase Substrate Phospholipase C-Γ1 in Primary Human Breast Carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1991**, *88* (23), 10435–10439.

[10.] Nomoto, K.; Tomita, N.; Miyake, M.; Xhu, D. B.; LoGerfo, P. R.; Weinstein, I. B. Expression of Phospholipases Gamma 1, Beta 1, and Delta 1 in Primary Human Colon Carcinomas and Colon Carcinoma Cell Lines. *Mol Carcinog*, **1995**, *12* (3), 146–152.

[11.] Koss, H.; Bunney, T. D.; Behjati, S.; Katan, M. Dysfunction of Phospholipase Cγ in Immune Disorders and Cancer. *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd December 1, 2014, pp 603–611.

[12.] Fu, L.; Qin, Y. R.; Xie, D.; Hu, L.; Kwong, D. L.; Srivastava, G.; Sai, W. T.; Guan, X. Y. Characterization of a Novel Tumor-Suppressor Gene PLCδ1 at 3p22 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.*, **2007**, *67* (22), 10720–10726.

[13.] Chen, J.; Wang, W.; Zhang, T.; Ji, J.; Qian, Q.; Lu, L.; Fu, H.; Jin, W.; Cui, D. Differential Expression of Phospholipase C Epsilon 1 Is Associated with Chronic Atrophic Gastritis and Gastric Cancer. *PLoS One*, **2012**, *7* (10), e47563.

[14.] Danielsen, S. A.; Cekaite, L.; Ågesen, T. H.; Sveen, A.; Nesbakken, A.; Thiis-Evensen, E.; Skotheim, R. I.; Lind, G. E.; Lothe, R. A. Phospholipase C Isozymes Are Deregulated in Colorectal Cancer - Insights Gained from Gene Set Enrichment Analysis of the Transcriptome. *PLoS One*, **2011**, *6* (9).

[15.] Purow, B. Molecular Pathways: Targeting Diacylglycerol Kinase Alpha in Cancer. Clin. Cancer Res., 2015, 21 (22), 5008–5012.

[16.] Topham, M. K. Signaling Roles of Diacylglycerol Kinases. Journal of Cellular Biochemistry. 2006; 97(3) 474-484.

[17.] Shulga, Y. V.; Topham, M. K.; Epand, R. M. Regulation and Functions of Diacylglycerol Kinases. Chemical Reviews. 2011, 111 (10): 6186-6208.

[18.] Carter, H.; Samayoa, J.; Hruban, R. H.; Karchin, R. Prioritization of Driver Mutations in Pancreatic Cancer Using Cancer-Specific High-Throughput Annotation of Somatic Mutations (CHASM). Cancer Biol. Ther., 2010, 10 (6), 582–587.

[19.] Jung, I. Y.; Kim, Y. Y.; Yu, H. S.; Lee, M.; Kim, S.; Lee, J. CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DGK Improves Antitumor Activities of Human T Cells. Cancer Res., 2018, 78 (16), 4692–4703.

[20.] Kai, M.; Yamamoto, E.; Sato, A.; Yamano, H.; Niinuma, T.; Kitajima, H.; Harada, T.; Aoki, H.;Maruyama, R.; Toyota, M.; et al. Epigenetic Silencing of Diacylglycerol Kinase Gamma in Colorectal Cancer. Mol. Carcinog., 2017, 56 (7.

[21.] Takeishi, K.; Taketomi, A.; Shirabe, K.; Toshima, T.; Motomura, T.; Ikegami, T.; Yoshizumi, T.;Sakane, F.; Maehara, Y. Diacylglycerol Kinase Alpha Enhances Hepatocellular Carcinoma Progression by Activation of Ras-Raf-MEK-ERK Pathway. J. Hepatol., 2012, 57 (1), 77–83.

 [22.] Cai, K.; Mulatz, K.; Ard, R.; Nguyen, T.; Gee, S. H. Increased Diacylglycerol Kinase ζ Expression in Human Metastatic Colon Cancer Cells Augments Rho GTPase Activity and Contributes to Enhanced Invasion. BMC Cancer, 2014, 14 (1), 208.

[23.] Crotty, T. M.; Nakano, T.; Stafforini, D. M.; Topham, M. K. Diacylglycerol Kinase δ Modulates AktPhosphorylation through Pleckstrin Homology Domain Leucine-Rich Repeat Protein Phosphatase 2 (PHLPP2). J. Biol. Chem., 2013, 288 (3), 1439–1447.

[24.] Yasuda, S.; Kai, M.; Imai, S. I.; Takeishi, K.; Taketomi, A.; Toyota, M.; Kanoh, H.; Sakane, F. Diacylglycerol Kinase η Augments C-Raf Activity and B-Raf/C-Raf Heterodimerization. J. Biol. Chem., 2009, 284 (43), 29559–29570.

[25.] Etcheverry, A.; Aubry, M.; Idbaih, A.; Vauleon, E.; Marie, Y.; Menei, P.; Boniface, R.; Figarella-Branger, D.; Karayan-Tapon, L.; Quillien, V.; et al. DGKI Methylation Status Modulates the Prognostic Value of MGMT in Glioblastoma Patients Treated with Combined Radio-Chemotherapy with Temozolomide. PLoS One, 2014, 9 (9), e104455.

[26.] Revill, K.; Wang, T.; Lachenmayer, A.; Kojima, K.; Harrington, A.; Li, J.; Hoshida, Y.; Llovet, J. M.; Powers, S. Genome-Wide Methylation Analysis and Epigenetic Unmasking Identify Tumor Suppressor Genes in Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology, 2013, 145 (6):1424-35.e1-25.