



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Modulo richiesta assegno

TITOLO DEL PROGETTO Expanding the knowledge of PTEN-Associated Disease (E-PAD)			
TUTOR Daniela Turchetti			
ASSEGNO FINANZIATO DA PROGETTO COMPETITIVO <i>(barrare la casella corrispondente)</i>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
SE IL FINANZIAMENTO È COMPETITIVO L'ENTE FINANZIATORE	MIUR (PRIN 2022)		
PROGETTO/ATTIVITÀ A SCOPO COMMERCIALE <i>(es. sperimentazione profit)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO	
CARATTERISTICHE DEL PROGETTO <i>(biomedico/osservazionale/clinico-interventistico/multidisciplinare)</i>	Biomedico		
STATO DI APPROVAZIONE DEL PROGETTO DA PARTE DEL COMITATO ETICO <i>(se necessario per il tipo di studio barrare o evidenziare la casella corrispondente)</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ottenuto	<input type="checkbox"/> Da ottenere	
DESCRIZIONE DEL PROGETTO <i>(max 800 parole)</i>			
(1)obiettivi, (2)materiali e metodi, (3) risultati/impatto attesi, (4) attività formativa e (5) di ricerca dell'assegnista			
1. Obiettivi			
Obiettivo principale del progetto è quello di contribuire a colmare le lacune di conoscenza sulla patogenesi delle patologie associate a varianti del gene PTEN, identificando:			
<ul style="list-style-type: none">• Alterazioni di pathway/funzioni cellulari negli eterozigoti PTEN• Alterazioni associate a fenotipi o genotipi specifici• Eventi molecolari coinvolti nella carcinogenesi indotta da PTEN			
Obiettivo secondario del progetto è quello di studiare l'effetto di farmaci candidati, in particolare le statine, in cellule normali di pazienti con varianti PTEN, per valutarne un potenziale ruolo nel trattamento e prevenzione delle manifestazioni cliniche.			
2. Materiali e metodi			
Si tratta di uno studio prospettico, multicentrico nazionale, che coinvolge pazienti affetti da sindromi causate da varianti patogenetiche del gene PTEN, seguiti presso UO Genetica Medica- Turchetti f.f. dell'IRCCS AOU di Bologna Policlinico di Sant'Orsola. È prevista inoltre la collaborazione del Laboratorio di Biochimica del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FABIT) dell'Università di Bologna per lo svolgimento degli studi sul metabolismo bioenergetico delle cellule ottenute dai pazienti arruolati, dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma per l'arruolamento di pazienti e per l'analisi del profilo di espressione globale su campioni ematici e fibroblasti dei pazienti arruolati, e dell'Università degli Studi di Bari Aldo Moro per l'arruolamento di pazienti e per lo studio delle vie di proliferazione sui fibroblasti			



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

ottenuti da biopsie cutanee dei pazienti arruolati e sull'effetto, sulle cellule stesse, delle statine.

3. Risultati/impatto attesi

Questo studio porterà a comprendere le alterazioni funzionali nelle cellule normali dei portatori di varianti di PTEN, con particolare attenzione per i difetti metabolici. L'identificazione dei pathway che sono de-regolati come risultato dell'aploinsufficienza di PTEN consentirà di esplorare potenziali

La caratterizzazione dei tumori, infine, fornirà informazioni utili per orientare eventuali terapie a bersaglio molecolare.

4. attività formativa

L'assegnista durante il progetto si confronterà regolarmente con il gruppo di ricerca e acquisirà così conoscenze sulla predisposizione ereditaria ai tumori, sulla patogenesi di condizioni mendeliane, sulla carcinogenesi associata a PTEN e sulle alterazioni cellulari del metabolismo energetico e di altri pathway. Avrà inoltre occasione di partecipare a eventi formativi organizzati dal gruppo di ricerca, tra cui i seminari dell'UO di Genetica Medica, che si tengono a frequenza bimensile.

5. attività di ricerca

L'assegnista avrà l'opportunità di maturare competenze sia di ricerca di laboratorio, con particolare riguardo per i metodi di analisi del metabolismo energetico in cellule umane in vitro, sia di metodologia della ricerca in generale, con particolare riguardo per il monitoraggio e la valutazione degli esiti di un progetto biomedico.

DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DELL'ASSEGNISTA

(per i **nuovi** assegni: max 400 parole; competenze richieste, scansione temporale della formazione, scansione temporale dell'attività, obiettivi primari e secondari)

(per i **rinnovi**: max 600 parole – da integrare con la relazione dell'assegnista; formazione raggiunta, attività effettuata, obiettivi raggiunti/competenze acquisite, formazione ancora da acquisire (se pertinente), scansione temporale dell'attività durante il rinnovo)

- Gestione della documentazione e dei dati dei pazienti reclutati
- Supporto al coordinamento tra i centri partecipanti, con particolare riguardo per lo scambio dei campioni biologici
- Collaborazione attiva alla valutazione bioenergetica in fibroblasti di pazienti eterozigoti per varianti di PTEN, che verrà eseguita presso il Laboratorio di Biochimica del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologia (FABIT) dell'Università di Bologna (Prof.ssa Luisa Iommarini), di seguito dettagliata, che costituirà l'impegno più rilevante e richiede quindi competenze specifiche.

Per indagare se la riduzione di PTEN nell'uomo possa essere associata a cambiamenti metabolici rilevanti, saranno analizzati fibroblasti in coltura ottenuti dalla biopsia cutanea di portatori di varianti che acconsentono a questo specifico sotto-studio. In primo luogo, saranno valutati il tasso di crescita e l'apoptosi. La proliferazione cellulare sarà misurata in un mezzo ad alto contenuto di glucosio utilizzando il sistema di analisi delle cellule vive IncuCyte (Sartorius). Lo stesso approccio sarà successivamente sfruttato per indagare la risposta a stimoli apoptotici che agiscono specificamente sulle vie estrinseche o intrinseche (rispettivamente Fas ligando e staurosporina) e l'effetto di un induttore di stress ossidativo mitocondriale, come il rotenone, utilizzando l'IncuCyte Cytotox Green Dye che etichetta le cellule in apoptosi. Saranno inoltre valutati marcatori di morte cellulare apoptotica come la condensazione della cromatina nucleare, il DNA laddering e l'attivazione della caspasi-3. Per valutare l'effetto dell'aploinsufficienza di PTEN sull'efficienza bioenergetica complessiva, la vitalità cellulare sarà determinata in diversi mezzi (mezzo a basso contenuto di glucosio o mezzo galattosio). In queste condizioni, il tasso di glicolisi è ridotto



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

costringendo le cellule a fare affidamento esclusivamente sulla catena respiratoria mitocondriale per sintetizzare ATP, evidenziando differenze nella fosforilazione ossidativa. Per valutare in dettaglio la competenza bioenergetica mitocondriale dei fibroblasti da pazienti, misureremo il tasso di consumo di ossigeno mitocondriale (OCR), il potenziale di membrana mitocondriale e il contenuto di ATP. L'OCR e l'efflusso di protoni (ECAR) saranno determinati utilizzando Seahorse XF Analyzer (Agilent). Le misurazioni simultanee di OCR ed ECAR possono essere combinate per valutare il tasso di produzione totale di ATP cellulare e la produzione di ATP mitocondriale e glicolitico, fornendo informazioni accurate sulla competenza energetica cellulare in tempo reale. Il potenziale della membrana mitocondriale sarà valutato utilizzando tetrametilrodamina-metil-estere (TMRM), un colorante fluorescente che viene accumulato dai mitocondri in cellule intatte e può essere rilasciato quando il potenziale diminuisce. Infine, il contributo del metabolismo glicolitico sarà determinato misurando la produzione di lattato e il consumo di glucosio come precedentemente riportato. Inoltre, è stato riportato che il difetto mitocondriale causato dall'aploinsufficienza di PTEN nell'ippocampo e nel cervelletto di topo è causato dalla deregolazione della funzione di p53. Infatti, p53 è noto per regolare i livelli di trascrizione della proteina di assemblaggio della citocromo C ossidasi 2 (SCO2), controllando così la respirazione mitocondriale. In questo contesto, studieremo i livelli di p53 e p21 nei fibroblasti aploinsufficienti per PTEN e nei relativi controlli e li correleremo con i livelli di SCO2 determinati tramite western blot e di complesso respiratorio IV allo stato stazionario determinati da Blue Native PAGE, seguiti rispettivamente dal saggio Western blot o In-Gel Activity (IGA). Questi esperimenti saranno condotti anche in presenza dell'inibitore p53 pifitrina- α bromidrato al fine di dimostrare che l'asse PTEN-p53 controlla la bioenergetica mitocondriale. Nel complesso, questi esperimenti dovrebbero fornire informazioni esaustive sullo stato metabolico delle cellule umane con mutazioni PTEN.

- Collaborazione alla caratterizzazione molecolare dei tumori insorti di pazienti eterozigoti per varianti di PTEN, che verrà eseguita presso il Laboratorio di Patologia Molecolare dell'Università di Bologna (Prof. Giovanni Tallini).
- Collaborazione all'analisi complessiva dei risultati.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Commissione proposta 3 commissari + 1 supplente	Daniela Turchetti
	Elena Bonora
	Luisa Iommarini
	Emanuele Panza

Scheda attività assistenziale (se prevista)

ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DELL'ASSEGNIATO/ N. ORE SETTIMANA (max 18 ore)
Non prevista
AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ

Si ricorda che, come previsto dagli Accordi sull'impiego nell'attività assistenziale dei Titolari di assegni di ricerca, sottoscritti tra l'Università di Bologna e le Aziende Ospedaliere di riferimento, una volta stipulato il contratto con il vincitore della selezione, il tutor deve consegnare alla Direzione Medica Ospedaliera la relativa modulistica, nella quale andranno riportate le attività qui segnalate.