

Titolo: Identificare e caratterizzare aptameri a RNA terapeutici che inibiscono la funzione di legame al RNA del fattore trascrizionale MYCN nel Neuroblastoma pediatrico.

Tutor: Prof. Giovanni Perini

Progetto

Il neuroblastoma (NB) è un tumore del sistema nervoso simpatico che contribuisce considerevolmente alla mortalità infantile per cancro, nonostante la complessa multimodalità dei trattamenti attuali [1]. L'oncogene MYCN codifica per un fattore di trascrizione che è un regolatore fondamentale di molti processi nello sviluppo, nella fisiologia e nell'oncogenesi. La sua aumentata attività nel NB, dovuta all'amplificazione e alla over-espressione genica, promuove la tumorigenesi, sostiene un fenotipo tumorale aggressivo e la progressione della malattia attraverso l'attivazione aberrante della trascrizione di centinaia di geni bersaglio. L'amplificazione di MYCN si riscontra in circa il 25% dei casi di NB con gravi implicazioni cliniche [2].

Nonostante MYCN sia un bersaglio difficile da trattare farmacologicamente, esso rimane il target più ambito a causa del suo ruolo fondamentale come principale causa dell'insorgenza del tumore [3]. Data l'espressione sregolata di MYCN nelle cellule di neuroblastoma (NB) e la sua elevata attività di legame all'RNA che potrebbe innescare la degradazione di numerosi mRNA, alcuni dei quali codificanti proteine con azione onco-soppressoria [4], ridurre e soprattutto inibire l'attività di legame all'RNA di MYCN, nei tumori i cui MYCN è altamente espresso MYCN, potrebbe rappresentare una promettente strategia per lo sviluppo di nuove terapie al fine di aumentare il tasso di sopravvivenza dei pazienti e in definitiva di debellare in modo definitivo la malattia.

All'interno di un progetto multicentrico, che intende bersagliare MYCN a livello trascrizionale, post-trascrizionale e proteico e di cui il tutor è responsabile di una Unità di Ricerca, l'attività dell'assegnista si occuperà di sviluppare strategie volte a inibire l'attività di legame all'RNA di MYCN. Nel dettaglio, l'attività sperimentale dell'assegnista si focalizzerà su tre obiettivi principali:

- 1) Identificazione e isolamento di aptameri con alta affinità per MYCN in grado di inibirne l'attività di legame all'RNA. Nel dettaglio, l'assegnista dovrà occuparsi dell'espressione e della purificazione del dominio di legame all'RNA di MYCN nel sistema Baculovirus. La proteina ricombinante ottenuta dovrà essere testata per il legame specifico ad un modello di RNA ricco in UG tramite la tecnica Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ed utilizzata per la selezione di aptameri ad alta affinità per il dominio di legame all'RNA di MYCN attraverso la tecnica del Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX). Infine il pool di aptameri selezionati verrà analizzato attraverso sequenziamento ed EMSA.

- 2) Validazione dell'efficacia terapeutica degli aptameri identificati. L'assegnista dovrà occuparsi di testare gli aptameri, precedentemente selezionati, in linee cellulari di NB co MYC amplificato o no-amplificato per valutarne gli effetti sulla crescita cellulare, formazione di colonie, migrazione, apoptosi, autofagia e morte cellulare. L'effetto degli aptameri sulla trascrizione genica e sull'accessibilità della cromatina verrà valutato attraverso RNA-seq e ATAC-seq. Infine, almeno un aptamero dovrà essere testato in colture cellulari 3D, in particolare in sferoidi o tumoroidi derivati da pazienti, e in studi futuri su modelli animali come il topo transgenico TH-MYCN e/o modelli di zebrafish.
- 3) Gli aptameri a RNA con proprietà antineoplastiche saranno infine incapsulati in nanoparticelle lipidiche anti-GD2 (aGD2-LNPs) ingegnerizzate per riconoscere in modo selettivo le cellule tumori di NB che esprimono nella matrice extracellulare il disialoganglioside GD2. L'attività antineoplastica degli aptameri sarà testata da sola o in combinazione con altri chemoterapici.

Piano di Formazione

L'assegnista avrà la possibilità di relazionarsi con ricercatori senior del laboratorio e lavorare in un ambiente stimolante e collaborativo, capace di accrescere le competenze professionali individuali. Inoltre avrà l'opportunità di interagire con altri gruppi di ricerca coinvolti nel progetto di cui sopra, guidati da Ricercatori con una lunga e solida esperienza nella biologia di MYCN e del NB.

L'attività, la crescita professionale e la produttività dell'assegnista sarà monitorata nel contesto di incontri programmati dal gruppo di ricerca a scadenze fisse, in cui l'assegnista presenterà i dati del proprio lavoro descrivendone le eventuali difficoltà incontrate, le modalità sperimentali con cui tali difficoltà sono state superate e i progressi nell'attività svolta. Compatibilmente con i vincoli di proprietà intellettuale definiti dall'Ateneo, l'assegnista sarà incoraggiato a presentare il proprio lavoro a workshop e conferenze sia nazionali e sia internazionali in modo da permettergli/le di confrontarsi con realtà distinte e di maggior respiro rispetto a quelle prettamente lavorative.

Il presente assegno sarà interamente autofinanziato usando fondi della Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma.

Referenze

[1] Qiu B, Matthy KK. Advancing therapy for neuroblastoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(8):515-533. doi:10.1038/s41571-022-00643-z

[2] Matthy KK, Maris JM, Schleiermacher G, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16078. Published 2016 Nov 10. doi:10.1038/nrdp.2016.78

[3] Zafar A, Wang W, Liu G, et al. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges [published correction appears in *Med Res Rev.* 2022 Jan;42(1):641. doi: 10.1002/med.21843]. *Med Res Rev.* 2021;41(2):961-1021. doi:10.1002/med.21750

[4] Papadopoulos D, Ha SA, Fleischhauer D, et al. The MYCN oncoprotein is an RNA-binding accessory factor of the nuclear exosome targeting complex. *Mol Cell.* 2024;84(11):2070-2086.e20. doi:10.1016/j.molcel.2024.04.007