PROGRAMMA STM2016

RELAZIONE DELL'ATTIVITA' SVOLTA DALLA DOTT.SSA BATTISTA

24-01-2017/13-02-2017

TITOLO: Ruolo di HMGA1 nella regolazione di NUMB in cellule staminali di glioblastoma.

Background: Le cellule staminali sono le cellule preposte all'omeostasi tissutale, provvedendo alla sostituzione delle cellule morte ed al mantenimento dell'integrità del tessuto. In condizioni patologiche, le stesse cellule staminali si trasformano in cellule staminali neoplastiche (Cancer stem cells: CSCs) e danno origine a tumori. Le CSCs sono responsabili dell'inizio, della crescita, dell'invasione e della recidiva dei tumori, tra cui il glioblastoma. Questi due modi diversi di funzionare (omeostasi/neoplasia) sono in gran parte dettati dalla modalità con cui le cellule staminali si dividono. Esse, infatti, possono dividersi asimmetricamente o simmetricamente. Nel primo caso, una cellula staminale genera una cellula staminale figlia, identica alla cellula madre, ed una cellula che invece andrà incontro al differenziamento, ricostituendo le cellule differenziate del tessuto; nel secondo caso, invece, una cellula staminale produce due cellule figlie identiche alla cellula madre. Questi due modi diversi di dividersi devono essere strettamente regolati nel tempo e nello spazio; il processo di divisione simmetrica, infatti, mentre risulta indispensabile durante lo sviluppo, la crescita ed il riparo dei tessuti, può portare ad un aumento del pool di cellule suscettibili di mutazione, iperplasia e sviluppo di tumore. Al contrario, la divisione asimmetrica inibisce la crescita tumorale. E' stato dimostrato che le CSCs effettuano divisione simmetrica con maggior frequenza di cellule staminali normali, le quali, invece, si dividono più di frequente in maniera asimmetrica. Questa diversa capacità di dividersi secondo una modalità simmetrica o asimmetrica risulta (si manifesta/ si esplica) nel diverso andamento dell'efficienza di formazione delle sfere (Sphere Forming Efficiency o SFE) in passaggi seriali di cellule staminali normali e cellule staminali neoplastiche: per le prime, l'avvalersi di divisione asimmetrica risulterà in un valore di SFE che si manterrà costante nei passaggi successivi, mentre per le seconde, l'utilizzo di divisione simmetrica farà sì che, ad ogni passaggio, la SFE sarà maggiore del passaggio precedente.

Sono stati identificati molti geni che controllano la divisione simmetrica/asimmetrica e la polarità cellulare: essi sono stati dimostrati funzionare da oncogeni/oncosoppressori, rispettivamente.

La perdita della capacità di dividersi asimmetricamente assume una peculiare importanza nello sviluppo dei gliomi, compreso il glioblastoma (GBM). Questi tumori insorgono da cellule staminali neurali multipotenti o progenitori che, in condizioni normali, si dividono principalmente in maniera asimmetrica durante la neuro-gliogenesi che continua ad avvenire anche nell'adulto. La divisione asimmetrica consente a queste cellule da un lato di rinnovarsi e, dall'altro, di produrre cellule differenziate. Al contrario, è stato dimostrato che l'aumento di divisione simmetrica in precursori oligodendrocitari, favorendo il "self-renewal", può portare allo sviluppo di oligodendrogliomi. Pertanto, la modalità di divisione cellulare nelle cellule staminali e progenitrici normali cerebrali può avere un ruolo importante nello stabilire il potenziale tumorigenico ed il tipo di tumore che si formerà. Pertanto, la comprensione delle molecole e dei pathways coinvolti nella regolazione della modalità di divisione cellulare e che possano rappresentare bersagli molecolari per la prevenzione dei gliomi o per migliorare l'efficacia del trattamento, è di fondamentale importanza per la terapia oncologica.

Tra i geni che regolano la divisione simmetrica/asimmetrica, Numb gioca un ruolo fondamentale in organismi diversi come *Caenorabditis elegans*, *Drosophila* e topo. Questa proteina, fondamentale nel mantenimento e nel differenziamento delle cellule staminali, è spesso alterata nei tumori: la sua perdita porta a forme aggressive e, nel GBM, è associata ad un fenotipo proneurale. NUMB è una proteina endocitica, regolata sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. Mentre la sua regolazione trascrizionale non è stata completamente caratterizzata, si sa che a livello post-traduzionale la fosforilazione da parte di aPKC ζ gioca un ruolo importante nel controllarne le interazioni e quindi la funzione. Tale fosforilazione porta alla sua dissociazione dalla membrana cellulare e risulta necessaria affinché NUMB possa localizzarsi asimmetricamente ed indurre divisione asimmetrica. La maggior fosforilazione di NUMB nelle cellule è stata inoltre dimostrata capace di inibire l'endocitosi della E-caderina (Sato et al., 2011), una proteina preposta alle interazioni cellula-cellula, di fondamentale importanza per la stabilirsi della polarità cellulare.

Nel mio gruppo mi sono occupata a lungo del ruolo della proteina HMGA1 nella cancerogenesi e nell'embriogenesi. Recentemente, abbiamo dimostrato che HMGA1 è molto espresso in CSCs da tumore al colon e da GBM e che il suo silenziamento aumenta

l'espressione di NUMB, la sua localizzazione asimmetrica, nonché la capacità delle cellule staminali di dare divisione asimmetrica, come evidenziato sia indirettamente, dalla riduzione della SFE in passaggi seriali, sia, direttamente, da "cell-paired assays".

La mia attività di ricerca presso l'MD Anderson di Houston è consistita nel chiarire il ruolo di HMGA1 nella regolazione di NUMB in cellule staminali neoplastiche di glioblastoma (BTSCs), in cui l'espressione di HMGA1 è stata silenziata mediante short hairpin RNA contro HMGA1 (BTSCshA1) o in cellule di controllo (BTSC#83C1).

In particolare, dato l'aumento di divisione asimmetrica in BTSC knockdown per HMGA1 e dato il ruolo che NUMB esercita su tale divisione, ho valutato l'espressione di NUMB e p-NUMB in estratti triton-solubile e triton-insolubile delle suddette linee.

Allo scopo di comprendere il meccanismo tramite il quale il silencing di HMGA1 indurrebbe un aumento delle divisioni asimmetriche, ho effettuato saggi di Western blot per valutare l'espressione e la localizzazione di NUMB, fosfo-NUMB ed aPKC ζ in estratti totali ed in estratti solubili ed insolubili in triton. NUMB si è confermato essere più espresso in estratti totali di cellule knockdown per HMGA1 rispetto a quelle di controllo. L'analisi degli estratti frazionati ha consentito di evidenziare che il silencing di HMGA1 induce uno spostamento di NUMB nella frazione triton-insolubile delle membrane. Inoltre, nelle cellule interferite per HMGA1 si osserva un drastico aumento della forma fosforilata di NUMB, sia negli estratti totali che in quelli solubili in triton, mentre è assente, come atteso, in tutti gli estratti insolubili in triton. Questi risultati sembrano suggerire che il knockdown di HMGA1 si associa ad una maggiore espressione di NUMB ed ad una sua maggior localizzazione a livello della membrana. Inoltre, dal momento che la fosforilazione di NUMB da parte di aPKC ζ media la sua localizzazione asimmetrica a livello della membrana (Smith et al., 2007), si può ipotizzare che la localizzazione asimmetrica di NUMB nelle cellule interferite per HMGA1 e l'aumento della divisione simmetrica, possano essere mediati da una maggiore fosforilazione di NUMB. Dal momento che aPKC ζ è la principale kinasi capace di fosforilare NUMB, sono andata a valutare l'espressione di aPKC ζ in BTSCs. L'espressione di aPKC ζ è risultata leggermente aumentata negli estratti totali e triton-insolubile di cellule BTSC interferite per HMGA1 rispetto a quelle di controllo, tale da non poter giustificare la diversa fosforilazione di NUMB in cellule di controllo e cellule interferite per HMGA1. L'attività di aPKC ζ è determinata da una serie di regolatori, tra cui CDC42, PAR3 e PAR6, e si esplica su una serie di target proteici, tra cui GSK3 β . Allo scopo di verificare l'attività di aPKC ζ , ho valutato la fosforilazione di GSK3 β . Analisi di Western blot hanno dimostrato che anche la fosforilazione di GSK3 β aumenta nelle BTSC interferite per

HMGA1 rispetto alle cellule di controllo, supportando l'ipotesi di una maggiore attivazione di aPKC ζ . Nelle stesse cellule, l'espressione dell'attivatore di aPKC ζ , CDC42, è risultata aumentata sia in qRT-PCR che Western blot, fornendo un meccanismo possibile di attivazione. D'altra parte, analisi di qRT-PCR hanno dimostrato l'aumento di PAR3 e la diminuzione di PAR6B nelle cellule interferite per HMGA1 rispetto alle cellule di controllo, giustificando ulteriormente l'aumento dell'attività di aPKC ζ e suggerendo per HMGA1 un ruolo di regolatore dell'espressione di geni di polarità cellulare.

Questi risultati suggeriscono che l'aumento di divisioni asimmetriche determinato dal silenziamento di HMGA1 è verosimilmente dovuto all'aumento della fosforilazione di NUMB, dovuta all'aumentata attività di aPKC ζ .

Preparazione di costrutti CRIPR/CAS9 per HMGA1.

La scoperta delle sequenze procariotiche CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) nel batterio *Streptococcus pyogenes* ha fornito un mezzo straordinario per targettare sequenze genomiche allo scopo di spegnere l'espressione del gene d'interesse. Il sistema usa una nucleasi, associata a CRISPR (Cas9), complessata a piccoli RNA che fungono da guida (gRNA), capace di tagliare in maniera sequenza-specifica in qualsiasi regione genomica.

Nei nostri esperimenti precedentemente condotti abbiamo usato vari tipi di vettori e di sistemi (shRNA, costrutti antisense ecc.) che consentivano di abbassare l'espressione di HMGA1, ma non di spegnerla completamente. Questo porta ad una ridotta possibilità di valutare gli effetti del silenziamento del gene in questione, ottenendo dei fenotipi che possono variare a seconda dell'entità del silenziamento.

Durante il periodo di permanenza all'MD Anderson mi sono avvalsa di "expertise" presenti nel laboratorio del prof. Draetta all'MD Anderson, per la preparazione di 3 costrutti CRISPR/CAS9 diretti contro il gene HMGA1 umano. A tal fine, sono state fatte sintetizzare tre coppie di oligonucleotidi, specifici per 3 regioni diverse del gene HMGA1, che funzionassero da guida per la CAS9. Gli oligonucleotidi sono stati fosforilati ed "annealati" mediante PNK; sono stati quindi ligati al vettore lentiCRISPRv2, digerito con BsmBI. I 3 prodotti di ligation sono stati usati per trasformare batteri competenti, a loro volta piastrati su piastre agar-ampicillina. Tre colonie batteriche per ogni costrutto sono state amplificate ed il DNA è stato sequenziato per verificarne la correttezza della sequenza clonata.

Fatta eccezione di un solo costrutto, tutte le sequenze sono risultate corrette.

Pertanto, un plasmide per ciascuna delle 3 guide oppure un plasmide vuoto, è stato trasfettato in cellule 293, mediante PEIplus transfection reagent. Dopo 24, il mezzo di coltura è stato cambiato, con l'aggiunta di puromicina (2 μ g/ml). Dopo 3 giorni dalla trasfezione, il DNA genomico è stato estratto e l'avvenuto targeting del gene HMGA1 è stato valutato per PCR, mediante l'uso di primers specifici, capaci di distinguere il gene integro da quello tagliato. Le analisi di PCR hanno dimostrato che 2 costrutti sono stati capaci di tagliare il gene HMGA1. Per il terzo costrutto, la quantità di DNA estratta dalle cellule non è risultata sufficiente per eseguire l'analisi: tale costrutto andrà pertanto ritrasfettato e la sua efficacia rivalutata per PCR.