



**UNIVERSITÀ
DI SIENA**
1240

**Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare
Direttore: Prof.ssa Antonella Naldini
XXX ciclo**

RELAZIONE DEL PRIMO ANNO DI CORSO

Tutor:

Prof.ssa Antonella Naldini

Dottorando:

Dott. Criscuoli Mattia

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

Nel mio primo anno di dottorato di ricerca ho cercato di assimilare le tecniche messe a disposizione dal laboratorio e di sviluppare nuovi strumenti per la mia ricerca.

Il mio progetto di ricerca focalizza l'attenzione sullo studio della risposta cellulare all'ipossia e su come l'espressione della proteina adattatrice RAI ne influenza la risposta su varie linee cellulari sia di neuroblastoma (SKNMC wild type e trasfettate per la proteina p52RAI, e SKNBE) sia di globuli bianchi (Jurkat trasfettate per p52RAI).

INTRODUZIONE

L'ipossia è una condizione comune sia in fisiologia, come nello sviluppo embrionale e nei tessuti linfoidi, che in processi patologici come l'infiammazione, l'angiogenesi e la progressione tumorale. È quindi evidente che l'ipossia possa condizionare la risposta di cellule immunocompetenti (e quindi la modulazione del sistema immunitario), e di cellule tumorali e stromali, con importanti conseguenze nella progettazione di vaccini e di terapie antitumorali.

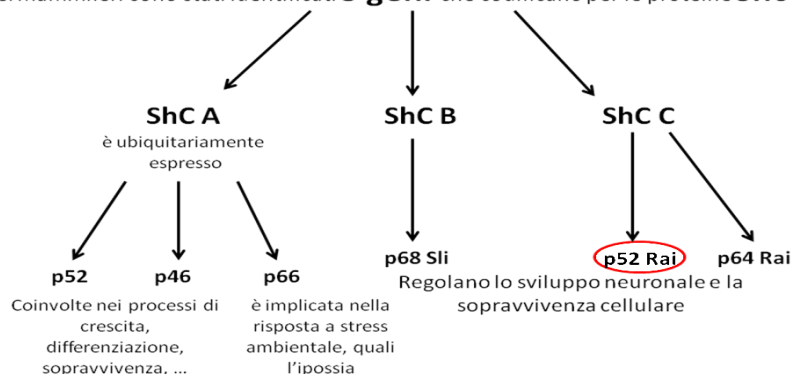
Il microambiente tumorale è un componente indispensabile nel processo di progressione neoplastica, in quanto può favorire la proliferazione delle cellule tumorali, la sopravvivenza e la migrazione. A causa della crescita incontrollata non accompagnata da un adeguato sviluppo vascolare, la maggior parte dei tumori solidi sono caratterizzati da aree con livelli di ossigeno inferiori rispetto ai tessuti normali. Così il microambiente ipossico presente nei tumori solidi non solo influenza la fisiologia delle cellule tumorali, ma anche le cellule stromali non-neoplastiche, quali macrofagi e fibroblasti e conferisce al tumore una maggior aggressività ed un aumentato potenziale metastatico. È stato inoltre dimostrato che le variazioni dell'ossigenazione dei tumori tra ipossia profonda e più moderata influenzano la risposta alle terapie; pertanto l'ipossia da un lato favorisce la cascata metastatica e dall'altro genera fenomeni di resistenza ai trattamenti antineoplastici. Capire le basi molecolari della risposta delle cellule tumorali a diminuite tensioni di ossigeno può fornire informazioni fondamentali per vincere la battaglia contro il cancro.

Le cellule rispondono tempestivamente ad una condizione ipossica avvertendo le variazioni di concentrazione dell'ossigeno. Questa risposta è mediata dall'attivazione di meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali che comportano l'espressione di numerosi geni, tra i quali quelli coinvolti nella regolazione del metabolismo e nella sopravvivenza cellulare. Per rispondere a questa condizione si attivano quindi numerosi fattori di trascrizione tra cui HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1).

Come accennato in precedenza, altro oggetto del mio studio è l'espressione della proteina adattatrice neuro-specifica RAI, membro della famiglia delle proteine adattatrici Sch.

Le proteine adattatrici Sch hanno un ruolo importante in molte vie di segnalazione in cui sono implicati diversi tipi di recettori quali i recettori per i fattori di crescita, per le citochine, recettori accoppiati a proteine G, recettori ormonali, recettori per l'antigene, ecc... In particolare le proteine adattatrici ShC sono immediato substrato delle tirosin chinasi e potrebbero avere un ruolo fondamentale nell'attivazione dei recettori tirosin chinasi coinvolti nella segnalazione ipossica, che coinvolge la stabilizzazione di HIF.

Nei mammiferi sono stati identificati **3 geni** che codificano per le proteine **Shc**



MATERIALI E METODI

Western Blot ed uso di ChemiDoc XRS (Biorad)

Estrazione di proteine e di acidi nucleici da colture cellulari

Dosaggio di proteine e DNA

Retrotrascrizione ed amplificazione di acidi nucleici (PCR)

Uso del microscopio ottico

Immunofluorescenza

qRT-PCR

CyQuant

RISULTATI

I risultati ad oggi ottenuti ci indicano che le cellule rispondono alla condizione di deficit di ossigeno mediante l'attivazione di HIF1 α riscontrabile già dopo 8 ore di trattamento ipossico: conseguentemente si ha l'aumento dell'espressione di BNIP3, che è downstream per HIF1 α , suggerendo che l'ipossia possa promuovere un programma di morte programmata. Tale ipotesi trova conferma nel clivaggio della proteina PARP e nell'aumentata attività della caspasi-3 (indice di apoptosi). Parallelamente l'espressione della proteina adattatrice RAI nelle medesime condizioni di ipossia induce un maggiore accumulo di HIF1 α che determina una maggiore espressione di BNIP3: contrariamente ai dati precedenti non si ha il clivaggio della proteina PARP. È proprio in questa direzione che focalizzeremo i nostri prossimi studi per capire se ciò influenza la sopravvivenza cellulare e con quali meccanismi.

Tra i risultati più significativi ottenuti fino ad ora vi sono i dati riguardanti le risposte metaboliche all'ipossia. La diminuita disponibilità di ossigeno ha provocato oltre all'accumulo di HIF-1 α , un aumento dell'espressione di trasportatori del glucosio (GLUT-1 e GLUT-3), dei trasportatori di lattato (MCT1 e MCT4) e delle anidrasi carboniche (CAIX e CAXII).

Tale up-regolazione è associata ad un maggiore assorbimento di glucosio, ad una maggiore produzione di lattato e a glicolisi anaerobica. Ancor più interessante in questo contesto è che quando la RAI è over-espressa, tali effetti sono risultati significativamente aumentati durante il trattamento ipossico.

Partecipazione a convegni e meeting:

- IX Conferenza Scientifica annuale ITT (Istituto Toscano Tumori)

Contributi a convegni:

- Mattia Criscuoli, Irene Filippi, Fabio Carraro, Giuliana Pelicci, Antonella Naldini

“Pro-angiogenic signaling in neuroblastoma: interplay between HIF-1 α and Shc C adaptor protein”

Presentazione orale

Workshop SIICA “Angiogenesi: basi molecolari ed implicazioni terapeutiche V” Certosa di Pontignano, Siena (25-27 Maggio 2015)

- Mattia Criscuoli, Irene Filippi, Fabio Carraro, Giuliana Pelicci, Antonella Naldini

“Tumor microenvironment and hypoxia in neural cancer cells: role of HIF-1 α and Shc C adaptor protein”

Poster

Cancer Bio-Immunotherapy XIII NIBIT meeting in Siena (8-10 Ottobre 2015)

FIRME

Antonella Naldini

Mattia Criscuoli

Pro-angiogenic signaling in neuroblastoma: interplay between HIF-1 α and Shc C adaptor protein.

Mattia Criscuoli¹, Irene Filippi¹, Fabio Carraro¹, Giuliana Pelicci², Antonella Naldini¹

¹Department of Molecular and Developmental Medicine Cellular and Molecular Physiology Unit, University of Siena, Italy

²European Institute of Oncology, Department of Experimental Oncology, Milano, Italy

Tissue hypoxia results in adaptive alterations of gene expression through the activation of HIF-1 α , which controls the expression of several mediators involved in cell metabolism and survival, apoptosis, cell migration/invasion, as well as angiogenesis. We have previously showed that p66Shc, a member of the family of Shc-like adaptor proteins, may play an important role in downstream hypoxic signalling, involving HIF-1 α protein accumulation and VEGF expression, with important implications for the regulation of the angiogenic process by T cells (Naldini et al, J Leukoc Biol. 2010). Rai (Shc C or N-Shc) is a neuron-specific member of the same family and its depletion in cancer stem/progenitor cells causes significant decrease in cell migration and invasion (Ortensi et al, Stem Cells 2012). In our study, we investigated the effect of hypoxia in a human neuroblastoma cell line, SKNMC, where Rai is not constitutively expressed. As expected, hypoxia resulted in accumulation of HIF-1 α , along with an upregulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3), lactate transporters (MCT1 and MCT4) and carbonic anhydrases (CAIX and CAXII). Such upregulation was associated with an increased glucose uptake, lactate production and anaerobic glycolysis, as confirmed by ATP-assay.

More interestingly, hypoxic treatment resulted in an increased VEGF expression. Such effects were significantly enhanced in SKNMC transfectants, where RAI was overexpressed.

The overall results indicate that Rai may play a role similar to that exerted by p66Shc in the angiogenic process and may be helpful to a better understanding of the biological pathways responsible for neuroblastoma initiation and progression.

Tumor microenvironment and hypoxia in neural cancer cells: role of HIF-1 α and Shc C adaptor protein.

Mattia Criscuoli¹, Irene Filippi¹, Carlo Aldinucci¹, Fabio Carraro¹, Giuliana Pelicci², Antonella Naldini¹

¹Department of Molecular and Developmental Medicine Cellular and Molecular Physiology Unit, University of Siena, Italy

²European Institute of Oncology, Department of Experimental Oncology, Milano, Italy

The tumor microenvironment is characterized by hypoxic areas which result in adaptive alterations of gene expression through the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . We have previously shown that the adaptor protein p66Shc may play an important role in downstream hypoxic signalling, involving HIF-1 α protein accumulation (Naldini et al, J Leukoc Biol. 2010). RAI, another member of the Shc family (Shc C), is neuron-specific and its depletion in cancer stem/progenitor cells causes significant decrease in cell migration and invasion (Ortensi et al, Stem Cells 2012). In our study, we investigated the effect of hypoxia in human neural cancer cell lines. As expected, hypoxia resulted in HIF-1 α accumulation, along with an upregulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3), lactate transporters (MCT1 and MCT4) and carbonic anhydrases (CAIX and CAXII). Such upregulation was associated with an increased glucose uptake, lactate production and anaerobic glycolysis. More interestingly, when RAI was overexpressed, such effects were significantly enhanced by hypoxic treatment.

The overall results indicate that HIF-1 α and RAI may interact in the modulation of the adaptive response to an hypoxic microenvironment. Our data may be helpful to a better understanding of the biological pathways responsible for of neural cancer initiation and progression.