

RELAZIONE ASSEGNO di RICERCA

Verona, 13 Luglio 2015

Assegnista: **Giulio Innamorati**

Assegno di ricerca svolto presso:

il Dipartimento di Chirurgia dell' Università degli Studi di Verona

Responsabile Scientifico : Prof. Claudio Bassi

Durata Assegno di Ricerca: 1 Agosto 2014 - 31 Luglio 2015

Trasduzione del segnale mediata da G proteine eterotrimeriche in cellule staminali adulte/fetali e precursori tumorali nel pancreas

In ogni cellula dell'organismo, le G proteine eterotrimeriche giocano un ruolo fondamentale nel mediare il segnale dei principali sensori cellulari (Recettori accoppiati a proteine G/GPCR). Le cellule staminali non fanno eccezione. Considerando che oltre il 50 % dei farmaci ha come target queste vie di signaling, nuovi approcci terapeutici potrebbero essere sviluppati agendo anche con molecole già utilizzate dalla clinica. In particolare, approfondire il signaling in cellule staminali adulte e tumorali permetterebbe di sviluppare farmaci altamente specifici per terapie rigenerative e antitumorali.

Prestigiose riviste scientifiche hanno recentemente pubblicato articoli in cui vengono descritte mutazioni attivatrici di Gαs in neoplasie originate in tutto l'apparato gastroenterico. Su questo tema stiamo completando una review che analizza il signaling di Gs con particolare riferimento alla via del segnale attivata da Wnt e dal suo recettore Frizzled.

Dopo aver scoperto l'espressione ectopica della proteina G eterotrimERICA Gα15 nel carcinoma pancreatico, ne abbiamo studiato l'espressione in lesioni preneoplastiche. Risultati preliminari suggeriscono che Gα15 non compaia in stadi molto immaturi. Questi dati sono stati ottenuti con ibridizzazione in situ dato che, purtroppo, anche gli anticorpi commercializzati nell'ultimo anno così' come quelli commercializzati in precedenza non risultano sufficientemente sensibili/specifici nel rilevare l'espressione della proteina espressa dal pancreas trasformato.

Studi di espressione con RT-PCR sono stati invece mirati a misurare la presenza di mRNA codificante per Gα15 nel siero umano proseguendo uno studio in cui si dimostrava una correlazione con la presenza di carcinoma pancreatico. Abbiamo osservato positività non solo in

pazienti affetti da carcinoma ma anche in pazienti affetti da pancreatite cronica. In base ai dati ottenuti, l'mRNA di $G\alpha 15$ risulterebbe dunque poco appropriato quale marcatore specifico. Ulteriori esperimenti di ibridizzazione in situ daranno maggiori informazioni al riguardo.

In una seconda linea di ricerca abbiamo continuato la caratterizzazione di cellule mesenchimali fetal derivate da placenta umana. Si tratta di cellule staminali multipotenti in cui abbiamo rivelato la presenza di più isoforme di recettori per la sfingosina-1-fosfato sulla loro membrana plasmatica. Studiandone la funzione, abbiamo dimostrato che parte del segnale è mediato dall'attivazione di $G\alpha i$ (verso MAPKs) e probabilmente parte è mediata da $G\alpha q$ (verso PKD).

Oltre ad una parziale caratterizzazione del signaling attivato, abbiamo intrapreso una serie di esperimenti atti a svelare effetti funzionali prodotti dall'attivazione dei recettori. Risultati preliminari rivelano che sfingosina-1-fosfato induce proliferazione tuttavia, in combinazione con trattamenti che promuovono la concentrazione di cAMP (PTX e IBMX), abbiamo osservato il risultato opposto, ossia un sensibile aumento della morte cellulare. Contiamo di approfondire questo interessante meccanismo di regolazione della densità cellulare.

Inoltre, abbiamo osservato una ridotta motilità cellulare in seguito a stimolazione prolungata coerente con recenti risultati presenti in letteratura ottenuti con altre cellule, in particolare precursori linfocitari.

Infine abbiamo osservato che un precondizionamento con sfingosina-1-fosfato favorisce il differenziamento in osteociti.

Approfondendo questi aspetti funzionali speriamo di poter offrire strumenti utili all'utilizzo di cellule mesenchimali di placenta a fini terapeutici.

Parte del lavoro è stato descritto in due articoli che stiamo per spedire:

- “*Pleiotropic Effects of Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Human Placenta Mesenchymal Stem Cells*”: submitted.
- “*The curious case of neoplasias involving gain of function GNAS mutations*” in preparation

Pleiotropic Effects of Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Human Placenta Mesenchymal Stem Cells

ABSTRACT

Cell therapy based on fetomaternal cells derived from chorion is a promising opportunity for regenerative medicine. A better understanding of endogenous stimuli regulating placenta derived mesenchymal stem cells could provide critical tools to promote engraftment in the appropriate tissues, control cells expansion and determine lineage commitment.

In these cells, we identified the presence of more than one isoform of G protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. Sphingosine-1-phosphate signaling was mediated by $G\alpha i$

and other G proteins and modulated the activity of multiple kinases, such as ERK1/2, p38 and protein kinase D1.

At a functional level, sphingosine-1-phosphate inhibited placenta derived mesenchymal stem cells migration and promoted proliferation when administered alone. However, if combined with a cAMP phosphodiesterases inhibitor, IBMX, sphingosine-1-phosphate produced the opposite result and reduced cell viability. The latter effect was relatively specific as it was not observed by activating analogous G proteins with bradykinin, or by inducing cell death via a cAMP independent pathway. A better understanding of sphingosine-1-phosphate downstream signaling could reveal novel keys to control cell fate, particularly throughout adipogenic and neurogenic in vitro differentiation or other protocols implying increased intracellular cAMP concentration. More in general, acting selectively on sphingosine-1-phosphate receptor subtypes could help to fully exploit the therapeutic potential of placenta derived stem cells.

The curious case of neoplasias involving gain of function GNAS mutations

ABSTRACT

Mutations that trigger the constitutive activity of the alpha subunit of the heterotrimeric Gs protein are found associated to a number of highly specific pathological molecular phenotypes. Among these diseases, the McCune Albright syndrome with fibrous dysplasia, pituitary tumor, thyroid adenoma hyperfunctioning adrenal tumors and Leydigomas. Recently the list grew to include a number of tumors, particularly in the gastrointestinal tract.

The phenotype is only observed when the somatic mutation occurs in a subset of organs.

For some organs, the diagnosis is already well described (IPMN, parosteal osteosarcoma) for others it falls in a larger clinical definition with a smaller prevalence. From thyroid to pancreas most lesions are benign, but may prelude to very aggressive forms of cancer. Here we suggest the possibility that it may represent a transversal neoplastic phenotype. Which similarities are shared by tumors carrying this mutation?

Should they be treated in as such? Is there a common context that allows the mutation to develop?

Assegista: Giulio Innamorati



Responsabile Scientifico : Prof. Claudio Bassi

