Corso di dottorato in Scienze Biomolecolari
PhD in Biomolecular Sciences
Ciclo 39 / Cycle 39
A.Y. 2023-2024

Reserved scholarships C and D

La prestigiosa Fondazione Pezcoller finanzia n. 2 borse di dottorato per progetti in ambito "Ricerca sul Cancro".
Le posizioni sono contraddistinte a bando dalle lettere C e D.

I vincitori di tali borse potranno scegliere il laboratorio ed il progetto di ricerca del loro percorso di dottorato tra quelli elencati di seguito.

Fellowships funded by the prestigious Pezcoller Foundation for cancer research projects (letters C and D)
Winners can choose their host laboratory from the list agreed upon with the Foundation's scientific committee, available below.

Principal Investigator	Project title
1 - Paola Bellosta	*Understanding the mechanisms leading to the upregulation of MYC and p53, upon nucleolar stress and ribosomal defects, new hallmarks of tumorigenesis induced by the downregulation of the nucleolar gene NOC1/CEBPz. New insights into tumor growth*
2 - Alessandra Bisio	*Modeling FLASH radiotherapy using protons beam for the treatment of breast cancer*
3 - Matthias Carl & Luca Tiberi	*Targeting PP2 compound induced apoptosis of cancer cells*
4 - Fulvio Chiacchiera	*Unveiling the epigenetic events dictating lineage commitment during hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma formation*
5 - Yari Ciribilli	*Unveiling the role of ETV7 in breast cancer immune evasion*
6 - Emilio Cusanelli	*Exploring the function of TERRA as trigger of the homologous recombination process and telomere maintenance of ALT cancer cells*
7 - Erik Dassi	*CAPTOR: Computational identification of Cancer-Altered Post-transcriptional Trees Of Regulation*
8 - Peter De Wulf	*Cell biological and therapeutic analysis of kinetochore-targeting anti-cancer compounds.*
9 - Alberto Inga, Erik Dassi & Lorenzo Montanaro	*The interplay between p53 and DKC1 on the production of snoRTs: a new class of noncoding RNAs in the pathology of breast cancer cells*
10 - Graziano Lolli	*Expanding the therapeutic repertoire of the newly identified kinase inhibitor CK2-TN03 for cancer treatment*

11 - Andrea Lunardi	*Bridging the gap between cold tumors and cancer immunotherapy*
12 - Alessandro Romanel & Gianluca Lattanzi	*Exploring the interaction landscape of germline and somatic coding variants in cancer*
13 - Toma Tebaldi	*Investigating the crosstalk between RNA modifications, RNA splicing and DNA repair to develop novel therapeutic approaches for leukaemia.*
14 - Alessio Zippo	*Epigenetic mechanisms driving dormancy in metastatic cancer cells*

Project 1

Understanding the mechanisms leading to the upregulation of MYC and p53, upon nucleolar stress and ribosomal defects, new hallmarks of tumorigenesis induced by the downregulation of the nucleolar gene NOC1/CEBPz. New insights into tumor growth

Laboratory:
Laboratory of Metabolism of Cell Growth and Neuronal Survival (https://www.cibio.unitn.it/657/laboratory-of-metabolism-of-cell-growth-and-neuronal-survival)

Principal Investigator: Paola Bellosta

Synthetic description of the activity and expected research outcome
Dysregulation of ribosome biogenesis and translational activity is associated with cancer initiation and progression and is also a hallmark of ribosomopathies, rare genetic diseases associated with a higher risk of cancer, caused by mutations in ribosomal proteins or components of the rRNA processing (Orsolic, Jurada et al. 2016, Truitt and Ruggero 2016, Aspesi and Ellis 2019, Penzo, Montanaro et al. 2019, Kang, Brajanovski et al. 2021). Despite the clear evidence of the impact of abnormalities in ribosome biogenesis on cancer, the mechanisms responsible are only beginning to be elucidated.
We recently identified and characterized NOC1 in flies (CEPBz in vertebrates), an evolutionary conserved nucleolar protein necessary in yeast for the maturation of the 60S ribosomal subunit (Milkereit, Gadal et al. 2001). We showed that NOC1 controls rRNA maturation and ribosomal function and is required for proper larval and organ development (Destefanis, Manara et al. 2022). Furthermore, the reduction of NOC1 results in MYC-dependent nucleolar stress and apoptosis accompanied by the transcriptional upregulation of p53. Our transcriptomic analysis on primary epithelial cells with reduced NOC1, shows the predominant upregulation of genes involved in DNA damage and proteotoxic stress, many of which are targets of p53. We also discovered that the reduction of NOC1 in epithelial cells during development induces cell competition (Destefanis, Manara et al. 2022), a mechanism induced by mutations in ribosomal proteins, where robust protein synthesis allows the best-fitted cells (winner) to expand at the expense of less-fitted (loser) that die by apoptosis, that we showed also driven by MYC levels (de la Cova, Abril et al. 2004). Cell competition is conserved in mammalian development and is now considered a fundamental aspect of the initial step of tumorigenesis (Destefanis, Manara et al. 2020).
In humans, CEBPz (or CBF2; CTF2; NOC1 OMIM-612828) acts as a transcription factor, and a function also conserved in flies (Shokri, Inukai et al. 2019). It is highly expressed in bone marrow myelopoietic and erythropoietic cells and patients with AML (Herold, Metzeler et al. 2014) and was detected in various cancers as deletions/amplifications and point mutations. (https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115816-CEBPZ/subcellular#img). Silencing CEBPz also results in defects in rRNA processing in Hela cells (Tafforeau, Zorbas et al. 2013), and our preliminary data demonstrates that siCEBPz in human cell lines increase the transcription of cmyc and p53, suggesting that the mechanisms that control their regulation, identified in flies for NOC1, are conserved in humans.
This project aims to characterize the function of NOC1/CEBPz using flies, fish, and human cells to analyze its gain and loss of function effects and relevance to tumorigenesis. We consider NOC1/CEBPz loss of function as a model to induce nucleolar stress; caused by a compromised rRNA processing, ultimately causing DNA damage and apoptosis, where the upregulation of MYC and p53 is a dangerous mark for tumor initiation. Conversely, a more specific task will understand the role of NOC1/CEBPZ overexpression in physiological conditions and tumors. We will use flies, fish, and human cells for i. genetically analyze in flies how NOC1 reduction, in combination with modulation of a short list of genes involved in DNA damage and proteotoxic stress, taken from our transcriptomic analysis, will affect nucleolar stress and cell competition phenotypes. ii. our transcriptomic analysis in reduced NOC1 cells reveals the modulation of a few genes associated with ribosomopathies. These diseases are well studied for their effect on hematopoiesis using zebrafish models for bone marrow defects. Considering the high level of CEBPz expression in human in bone marrow and related tumors, we will use zebrafish models to analyze if modulation of cebpz will affect hematopoiesis differentiation and p53 transcriptional activation, (Kobayashi, Kondo et al. 2019)(models available at CIBIO); and finally iii. we will perform a bioinformatic analysis using available databases (cBioPortal, Gent2, Gepia/kmplotter) to identify classes of tumors in which modulation of CEBPz maybe drive their clonal expansion. Further, human cell lines, or from-tumorspecific patients, will be characterized for target genes and pathways (identified in tasks i. and ii. and for defects in the rRNA processing and nucleolar stress).
Relevance for cancer: Mutations impairing rRNA processing, similar to dysregulation of RNA-Pol-I transcription, mimic oncogenic stress and are a causal factor in several pathologies including cancer, where MYC and p53 have a fundamental role (Orsolic, Jurada et al. 2016, Truitt and Ruggero 2016). The possibility of analyzing CEBPz function in different models (flies, fish, and human cells) allows us to rapidly identify and characterize its function in tumors and the relationship between MYC and p53.
This project could advance the discovery of novel translatable oncogenic stress mechanisms in tumors in which defective rRNA processing or abnormal rRNA transcription of nucleolar proteins will increase the risk of abnormal growth that develops in cancer.
Bibliography:
Aspesi, A. and S. R. Ellis (2019). "Rare ribosomopathies: insights into mechanisms of cancer." Nat Rev Cancer 19(4): 228-238.
de la Cova, C., M. Abril, P. Bellosta, P. Gallant and L. A. Johnston (2004). "Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition." Cell 117(1): 107-116.
Destefanis, F., V. Manara and P. Bellosta (2020). "Myc as a Regulator of Ribosome Biogenesis and Cell Competition: A Link to Cancer." Int J Mol Sci 21(11).

Destefanis, F., V. Manara, S. Santarelli, S. Zola, M. Brambilla, G. Viola, P. Maragno, I. Signoria, G. Viero, M. E. Pasini, M. Penzo and P. Bellosta (2022). "Reduction of nucleolar NOC1 leads to the accumulation of prerRNAs and induces Xrp1, affecting growth and resulting in cell competition." J Cell Sci 135(23).
Herold, T., K. H. Metzeler, S. Vosberg, L. Hartmann, C. Rollig, F. Stolzel, S. Schneider, M. Hubmann, E. Zellmeier, B. Ksienzyk, V. Jurinovic, Z. Pasalic, P. M. Kakadia, A. Dufour, A. Graf, S. Krebs, H. Blum, M. C. Sauerland, T. Buchner, W. E. Berdel, B. J. Woermann, M. Bornhauser, G. Ehninger, U. Mansmann, W. Hiddemann, S. K. Bohlander, K. Spiekermann and P. A. Greif (2014). "Isolated trisomy 13 defines a homogeneous AML subgroup with high frequency of mutations in spliceosome genes and poor prognosis." Blood 124(8): 1304-1311.
Kang, J., N. Brajanovski, K. T. Chan, J. Xuan, R. B. Pearson and E. Sanij (2021). "Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy." Signal Transduct Target Ther 6(1): 323.
Kobayashi, I., M. Kondo, S. Yamamori, J. Kobayashi-Sun, M. Taniguchi, K. Kanemaru, F. Katakura and D. Traver (2019). "Enrichment of hematopoietic stem/progenitor cells in the zebrafish kidney." Sci Rep 9(1): 14205.
Milkereit, P., O. Gadal, A. Podtelejnikov, S. Trumtel, N. Gas, E. Petfalski, D. Tollervey, M. Mann, E. Hurt and H. Tschochner (2001). "Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins." Cell 105(4): 499-509.
Orsolic, I., D. Jurada, N. Pullen, M. Oren, A. G. Eliopoulos and S. Volarevic (2016). "The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and emerging paradigms." Semin Cancer Biol 37-38: 36-50.
Penzo, M., L. Montanaro, D. Trere and M. Derenzini (2019). "The Ribosome Biogenesis-Cancer Connection." Cells 8(1).
Shokri, L., S. Inukai, A. Hafner, K. Weinand, K. Hens, A. Vedenko, S. S. Gisselbrecht, R. Dainese, J. Bischof, E. Furger, J. D. Feuz, K. Basler, B. Deplancke and M. L. Bulyk (2019). "A Comprehensive Drosophila melanogaster Transcription Factor Interactome." Cell Rep 27(3): 955-970 e957.
Tafforeau, L., C. Zorbas, J. L. Langhendries, S. T. Mullineux, V. Stamatopoulou, R. Mullier, L. Wacheul and D. L. Lafontaine (2013). "The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of PrerRNA processing factors." Mol Cell 51(4): 539-551.
Truitt, M. L. and D. Ruggero (2016). "New frontiers in translational control of the cancer genome." Nat Rev Cancer 16(5): 288-304.

Candidate's profile (skills and competencies)
MA in biology or biotechnology-related fields.
Knowledge of animal development and cancer genetics.
Precedent experience using Drosophila and Zebrafish models is appreciated but not required.
The candidate will work on multidisciplinary team-project learning from animal models (drosophila and Zebrafish) and cancer cell lines and collaborate with bioinformaticians for the tumor data analysis)

Project 2

Modeling FLASH radiotherapy using protons beam for the treatment of breast cancer

Studio della radioterapia FLASH con fascio di protoni per il trattamento del cancro al seno

Laboratory:
Laboratory of Radiobiology (https://www.cibio.unitn.it/1377/laboratory-of-radiobiology)

Principal Investigator: Alessandra Bisio

Synthetic description of the activity and expected research outcome
Proton therapy (PT) is established as an alternative to photon radiation therapy (RT) for the treatment of specific sites and lesions. Due to the inverse depth-dose profile offered by protons (the so-called Bragg peak), PT allows a significant sparing of healthy tissues surrounding the tumor (1). PT is also a candidate to play an important role in the context of the emerging ultra-high dose rate (UHDR) RT (radiation delivered in a fraction of a second >40-100 Gy/s), also named FLASH. The most attractive aspect of the so-called "FLASH effect" lies in the differential response obtained in tumor and healthy tissues. While the first seems to be unaffected by UHDR compared to conventional irradiation, a significant sparing of normal tissue was reported by different groups (2,3). However, there is a need to understand better the molecular mediators responsible for the response to FLASH radiotherapy.
While a comparably large amount of data is available for electron beam irradiation, data obtained with protons are scarce and limited to a few centers. This is mainly due to the limited number of available facilities equipped with a UHDR beam. Further, while the clinical perspective of electrons is limited to superficial lesions (e.g., skin cancers), protons would also allow exploiting UHDR effects for deep-seated tumors. Noteworthy, the Protontherapy Center in Trento has been recently equipped with a UHDR beam, making it the unique proton therapy center in Italy with this technology.
Based on these premises, this project aims to understand the molecular mechanisms underlying the biological responses to FLASH irradiation using both non-tumorigenic and tumorigenic cellular models derived from mammary tissue. We have selected breast cancer as

an oncological disease under study given its relevance for human society, since it has become the most diffused cancer in women worldwide, even surpassing lung cancer according to the last statistics (GLOBOCAN 2020). Moreover, radiotherapy is already commonly used for the treatment of this cancer, and proton therapy, especially FLASH proton therapy, might represent a safer clinical option for these cancer patients.
Experiments will be performed using both 2D and 3D (spheroids) cultures derived from three immortalized breast cell lines, the non-tumorigenic MCF10A, the scarcely aggressive luminal breast cancer-derived MCF7, and the highly aggressive triple-negative breast cancer HCC70. Spheroids have been proposed as the model of choice for the investigation of dose rate and fractionation effects in RT and have been recently employed for UHDR experiment (4) due to the possibility of using them to mimic the mild hypoxic condition of body tissues.
To better dissect the FLASH effect, we will compare conventional (CONV ~0.05 Gy/s) and FLASH (~80 and ~200 Gy/s) proton irradiation using different biological endpoints in our 2D and 3D (spheroids) cultures. It has been hypothesized that the differential tissue response between FLASH and CONV irradiation could be due to differences in DNA damage repair activity, oxygen depletion, immune response, and inflammation. To better evaluate these putative influencing factors of the FLASH effect, we wish to evaluate the following biological endpoints: a) survival curves, b) DNA damage/repair kinetics, c) cell lines redox status, d) profiling of secreted proteins (with a particular focus on inflammatory cytokines and chemokines) using Mass-Spectrometry, and e) and induction of cell death (apoptosis/necrosis) and senescence. Furthermore, we will perform spheroid shrinkage assays to mimic the tumor disaggregation upon CONV and FLASH proton therapy and oxygen depletion using the hypoxia-sensitive fluorescence methodology Image It-Hypoxia, as previously described (4). Moreover, spheroids from the three mammary cell models treated with CONV and FLASH proton therapy will be profiled for gene expression variations using RNA-seq with the aim to identify key pathways and transcriptional networks underpinning FLASH radiation response. Lastly, to verify if FLASH irradiation can be more effective in exerting anti-tumor immune responses, we will adopt a co-culture protocol of tumor spheroid with immune cells (T cells and NK cells isolated from PBMCs from healthy donors) recently established (5).
The costs for the implementation of these experiments will be supported by the INFN call FRIDA (FLASH Radiotherapy with hIgh Dose-rate particle beAm, coordinator Dr. Alessio Sarti) where the laboratory of Radiobiology at CIBIO Department led by me is responsible for the experiments focused on the identification of the molecular mediators underlying the “FLASH effect”.
Overall, deciphering the biological principles of FLASH proton therapy will contribute to defining innovative radiation-based therapeutic venues for the treatment of breast cancer.
References
1. Grau C et al, Mol Oncol (2020). doi: 10.1002/1878-0261.12677.
2. Friedl AA et al, Med Phys (2022). doi: 10.1002/mp.15184. Epub 2021 Sep 20.
3. Lin B et al, Front Oncol (2021). doi: 10.3389/fonc.2021.644400.
4. Khan et al, Int J Rad Oncol Biol Phys (2021). doi: 10.1016/j.ijrobp.2021.01.050.
5. Courau et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer (2019). doi: 0.1186/s40425-019-0553-9..

Descrizione sintetica dell’attività e dei risultati attesi
La protonterapia (PT) viene utilizzata come alternativa alla radioterapia classica con fotoni (RT) per il trattamento di specifici siti e lesioni tumorali. Grazie al profilo inverso profondità-dose offerto dai protoni (il cosiddetto picco di Bragg), la PT permette una significativa riduzione dell’esposizione dei tessuti sani che circondano il tumore (1). La PT si candida anche un avere un ruolo importante nel contesto dell’emergente RT a Ultra High Dose Rate (UHDR) (radiazioni erogate in una frazione di secondo >40-100 Gy/s), denominata FLASH. L’aspetto più interessante del cosiddetto “effetto FLASH” risiede nella risposta differenziale che si può ottenere nei tessuti tumorali e in quelli sani. Mentre i primi sembrano non essere influenzati dall’UHDR rispetto alla radioterapia convenzionale, una significativa riduzione degli effetti sui tessuti normali è stata riportata da diversi gruppi (2,3). Tuttavia, risulta necessario comprendere meglio i mediatori molecolari responsabili della risposta alla radioterapia FLASH.
Mentre è disponibile una quantità relativamente grande di dati per quanto riguarda l’irraggiamento con fascio di elettroni, i dati ottenuti con i protoni sono scarsi e limitati a pochi centri di ricerca. Ciò è dovuto principalmente al numero limitato di strutture disponibili dotate di un fascio UHDR. Inoltre, mentre la prospettiva di utilizzo clinico degli elettroni è limitata alle lesioni superficiali (ad esempio, i tumori della pelle), i protoni consentirebbero anche di sfruttare gli effetti UHDR per i tumori localizzati più profondamente. E’ rilevante sottolineare che il Centro di Protonterapia di Trento è stato recentemente dotato di un fascio UHDR, rendendolo l’unico centro di protonterapia in Italia con questa tecnologia disponibile.
Sulla base di queste premesse, questo progetto si propone di comprendere i meccanismi molecolari responsabili delle risposte biologiche al trattamento con protonterapia FLASH utilizzando modelli cellulari sia non-tumorigenici che tumorigenici derivati da tessuto mammario. Abbiamo selezionato il cancro al seno come malattia oncologica da studiare data la sua rilevanza per la società, poiché è diventato il cancro più diffuso nelle donne in tutto il mondo, superando anche il cancro del polmone secondo le ultime statistiche (GLOBOCAN 2020). Inoltre, la radioterapia è già comunemente utilizzata per il trattamento di questo tumore e la protonterapia, in particolare la protonterapia FLASH, potrebbe rappresentare un’opzione clinica più sicura per questi pazienti oncologici.
Gli esperimenti saranno condotti utilizzando colture sia 2D che 3D (sferoidi) derivate da tre linee di cellule mammarie immortalizzate: la non-tumorigenica MCF10A, la scarsamente aggressiva MCF7 derivata dal carcinoma mammario luminale e la altamente aggressiva di carcinoma mammario triplo negativo HCC70. Gli sferoidi sono stati proposti come modello preferenziale per ottimizzare la scelta della dose e per analizzare gli effetti del frazionamento con RT. Inoltre, sono stati recentemente impiegati per esperimenti con UHDR (4), grazie alla loro capacità di mimare più fedelmente la lieve ipossia fisiologica che caratterizza i tessuti corporei.

Per meglio analizzare l'effetto FLASH, confronteremo il trattamento con protonterapia convenzionale (CONV ~0.05 Gy/s) e quello FLASH (~80 e ~200 Gy/s) studiando diversi processi biologici nelle nostre colture 2D e 3D (sferoidi). È stato ipotizzato che la risposta tissutale differenziale tra i due trattamenti FLASH e CONV potrebbe essere dovuta a differenze nell'attività di riparazione del danno al DNA, la deplezione di ossigeno, la risposta immunitaria e l'infiammazione. Per valutare meglio questi presunti fattori che potrebbero influenzare l'effetto FLASH, desideriamo valutare le seguenti risposte cellulari: a) curve di sopravvivenza, b) cinetica di danno/riparazione del DNA, c) stato redox delle linee cellulari, d) quantificazione delle proteine secrete (con una particolare attenzione alle citochine infiammatorie e alle chemochine) utilizzando la spettrometria di massa, ed e) l'induzione della morte cellulare (apoptosi/necrosi) e della senescenza.
Inoltre, eseguiremo saggi di riduzione della massa/volume degli sferoidi ("shrinkage") per mimare la disaggregazione del tumore in risposta alla protonterapia CONV e FLASH e la deplezione dell'ossigeno utilizzando la metodologia di fluorescenza sensibile all'ipossia Image It-Hypoxia, come descritto in precedenza (4). Inoltre, gli sferoidi dei tre modelli di cellule mammarie trattati con protonterapia CONV e FLASH saranno profilati per le variazioni di espressione genica utilizzando RNA-seq con l'obiettivo di identificare i pathway chiave e le reti trascrizionali alla base della risposta alle radiazioni FLASH.
Infine, per verificare se l'irraggiamento FLASH può essere più efficace nello stimolare le risposte immunitarie antitumorali, adotteremo un protocollo di co-coltura di sferoidi tumorali con cellule del sistema immunitario (cellule T ed NK isolate da PBMC da donatori sani) che è stato recentemente descritto (5).
I costi per la realizzazione di questi esperimenti saranno sostenuti dal progetto "FRIDA" (FLASH Radiotherapy with hIgh Dose-rate particle beAm, coordinatore Dr. Alessio Sarti) finanziato da INFN, dove il laboratorio di Radiobiologia del Dipartimento CIBIO da me diretto è responsabile degli esperimenti focalizzati sull'identificazione dei mediatori molecolari alla base dell'"effetto FLASH".
Nel complesso, la decifrazione dei processi biologici indotti dalla protonterapia FLASH contribuirà a definire strategie terapeutiche innovative basate sulle radiazioni per il trattamento del cancro al seno.

Referenze

1. Grau C et al, Mol Oncol (2020). doi: 10.1002/1878-0261.12677.
2. Friedl AA et al, Med Phys (2022). doi: 10.1002/mp.15184. Epub 2021 Sep 20.
3. Lin B et al, Front Oncol (2021). doi: 10.3389/fonc.2021.644400.
4. Khan et al, Int J Rad Oncol Biol Phys (2021). doi: 10.1016/j.ijrobp.2021.01.050.
5. Courau et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer (2019). doi: 0.1186/s40425-019-0553-9..

Candidate's profile (skills and competencies)
The candidate should be highly motivated and should have preferentially a background in molecular and cellular biology, like manipulation of mammalian cell lines in sterility, RNA, and protein analysis. Knowledge of radiobiology principles will be considered a plus. A fluent knowledge of the English language will be required.

Profilo del/la candidato/a
Il candidato dovrà essere altamente motivato e dovrebbe avere preferibilmente un background in biologia molecolare e cellulare, ad esempio: la manipolazione in sterilità di linee cellulari di mammifero, di RNA e analisi delle proteine. Costituirà titolo preferenziale la conoscenza dei principi della radiobiologia. E' richiesta una fluente conoscenza della lingua inglese.

Project 3

Targeting PP2 compound induced apoptosis of cancer cells

Bersagliare all'apoptosi delle cellule tumorali indotta dal composto PP2

Laboratory:
Laboratory of Translational Neurogenetics (https://www.cibio.unitn.it/744/laboratory-of-translational-neurogenetics)
Armenise-Harvard Laboratory of Brain Disorders and Cancer (https://www.cibio.unitn.it/495/armenise-harvard-laboratory-of-brain-disorders-and-cancer)

Principal Investigator: Matthias Carl & Luca Tiberi

Synthetic description of the activity and expected research outcome
Dysregulation of Src family protein kinase (SFK) signaling has been linked to various tumor types ranging from colon, lung and breast cancer to neuroblastoma. Indeed, SFKs are involved in the regulation of several cancer-associated features such as cell proliferation, migration, invasion and apoptosis. The pyrazolopyrimidine compound PP2 is a Src kinase signaling inhibitor, which, as an apoptosis promoting agent, is frequently reported to be a promising therapeutic drug for cancer treatment. However, the efficacy of the compound varies, its cell type specificity is not resolved and the pathway activated leading to apoptosis in the different cancer cell lines investigated is frequently unclear.

We have performed an in vivo high-throughput compound screen using zebrafish embryos and found that PP2 induces highly specific and continues cell death of a subset of proliferating neuronal precursors in the forebrain, named habenulae. In contrast, all other areas of the embryo appear unaffected by the treatment. We were able to narrow down the critical time of PP2 sensitivity of these cells to only two hours of development. After PP2 treatment, apoptosis in this defined area continues for at least another two days. Our discovery provides us with the unique opportunity to identify the molecular mechanism underlying PP2 induced apoptosis. Genome wide expression profiling will enable us to identify the specific molecules which facilitate PP2 interference with cell survival. In turn, we can apply our knowledge and screen PP2 sensitive and resistant cancer cell lines for the discovered molecules. In collaboration with Luca Tiberi (Armenise-Harvard Laboratory of Brain Disorders and Cancer), we aim to initially focus on neuro-related blastoma cells. We will investigate whether the defined genetic program established by our identified set of molecules allows for the targeted PP2 induced apoptosis of cancer cells. This will be achieved by Crispr/Cas9 mediated knock in or knock out strategies of genes dependent on the results obtained.
The proposed work can open possibilities to target PP2 mediated apoptosis of cancer cells and circumvent unwanted side-effects. Moreover, the identified molecular landscape for cell type specific PP2 induced cell death may be used as biomarker to support therapeutic options.
The project will involve a variety of state-of-the-art in vivo experimentation including confocal imaging, Crispr/Cas9 based gene knock out/knock in and HTS compound treatments alongside molecular techniques and in vitro work with cancer cell lines.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

La disregolazione della segnalazione delle protein-chinasi della famiglia Src (SFK) è stata collegata a diversi tipi di tumore, dal cancro del colon, del polmone e della mammella al neuroblastoma. Le SFK sono infatti coinvolte nella regolazione di diverse caratteristiche associate al cancro, come la proliferazione, la migrazione, l'invasione e l'apoptosi delle cellule. Il composto pirazolopirimidinico PP2 è un inibitore della segnalazione della Src chinasi che, in quanto agente che promuove l'apoptosi, è spesso indicato come un promettente agente terapeutico per il trattamento del cancro. Tuttavia, l'efficacia del composto varia, la sua specificità per tipo di cellula non è risolta e la via attivata che porta all'apoptosi nelle diverse linee cellulari tumorali studiate è poco chiara.
Abbiamo effettuato uno screening in vivo di composti ad alto rendimento utilizzando embrioni di pesce zebra e abbiamo scoperto che PP2 induce una morte cellulare molto specifica e continua di un sottogruppo di precursori neuronali proliferanti nel prosencefalo, chiamati habenulae. Al contrario, il trattamento non ha effetto ad altre aree dell'embrione. Siamo stati in grado di restringere il periodo critico della sensibilità di PP2 a queste cellule a sole due ore di sviluppo. Dopo il trattamento con PP2, l'apoptosi in quest'area definita continua per almeno altri due giorni. La nostra scoperta ci offre l'opportunità unica di identificare il meccanismo molecolare alla base dell'apoptosi indotta da PP2. Il profilo di espressione dell'intero genoma ci consentirà di identificare le molecole specifiche che facilitano l'interferenza di PP2 con la sopravvivenza cellulare. Potremo applicare le nostre conoscenze e sottoporre le molecole scoperte a screening linee cellulari tumorali sensibili e resistenti a PP2. In collaborazione con Luca Tiberi (Armenise-Harvard Laboratory of Brain Disorders and Cancer), intendiamo a concentrarci inizialmente sui blastomi neuro-correlati. Studieremo se il programma genetico definito dalla serie di molecole identificate consenta l'apoptosi indotta da PP2 delle cellule tumorali. Questo obiettivo sarà raggiunto mediante strategie di knock in o knock out di geni mediate da Crispr/Cas9, a seconda dei risultati ottenuti.
Il lavoro proposto può aprire la possibilità di mirare all'apoptosi mediata da PP2 delle cellule cancerose ed evitare effetti collaterali indesiderati. Inoltre, il panorama molecolare identificato per la morte cellulare indotta da PP2 specifica per ogni tipo di cellula può essere utilizzato come biomarcatore per supportare le opzioni terapeutiche.
Il progetto prevede una serie di sperimentazioni in vivo all'avanguardia, tra cui imaging confocale, knock out/knock in di geni basati su Crispr/Cas9 e trattamenti con composti HTS, oltre a tecniche molecolari e lavoro in vitro con linee cellulari tumorali.

Candidate's profile (skills and competencies)

1. A master's degree in conformity with the institutional regulations: An Italian "Laurea magistrale" instituted in conformity with Italian Ministerial Decree 270/2004, or a university degree of the previous regulations (Italian "Laurea specialistica " or "Diploma di Laurea"), or an equivalent degree obtained abroad (Master's degree) and recognized as equivalent to the Italian "Laurea magistrale" by the Admissions Committee for the sole purposes of admission to the Doctoral programme, also within the framework of international agreements.)
2. Preferred are students with experience in cancer biology and/or imaging and/or molecular biology and/or neurobiology.

Profilo del/la candidato/a

1. Laurea magistrale conforme all'ordinamento istituzionale: Laurea magistrale italiana istituita ai sensi del DM 270/2004, oppure titolo di studio universitario del previgente ordinamento (Laurea specialistica o Diploma di Laurea), ovvero titolo equipollente conseguito all'estero (Laurea Magistrale) e riconosciuto equipollente alla Laurea Magistrale italiana dalla Commissione Giudicatrice per il solo ai fini dell'ammissione al corso di dottorato, anche nell'ambito di accordi internazionali.)
2. Sono preferiti studenti con esperienza in biologia del cancro e/o imaging e/o biologia molecolare e/o neurobiologia.

Project 4

Unveiling the epigenetic events dictating lineage commitment during hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma formation

Caratterizzazione dei processi epigenentici che definiscono il destino cellulare durante la formazione dei carcinomi epatici e dei colangiocarcinomi intraepatici

Laboratory:
Laboratory of Stem Cells and Cancer Genomics (https://www.cibio.unitn.it/956/laboratory-of-stem-cells-and-cancer-genomics)

Principal Investigator: Fulvio Chiacchiera

Synthetic description of the activity and expected research outcome

Introduction

Liver tumours are among the most common cause of cancer-related death worldwide. Their incidence as well as mortality rate is steadily increasing with no curative options available for advanced tumours. Hepatocellular carcinoma (HCC) and intrahepatic cholangiocarcinoma (iCCA) represent the most common primary liver tumours. Cholangiocarcinomas are clinically silent, desmoplastic, and aggressive tumours difficult to be diagnosed at early stage. Studies that profiled the genetic and expression landscape of HCC and CCA have identified several oncogenic pathways that are deregulated and/or mutated in these patients. Among them mutations affecting the activity and composition of chromatin modifying complexes are particularly enriched. HCC and iCCA shared the same cell of origin, and several genomic alterations impacting the activity of chromatin modifying enzymes. Despite these similarities, the mechanisms involved in lineage commitment, responsible for HCC or iCCA development, are still largely unknown.

Aim

The aim of this project is to characterize the effects of concomitant mutations in different SWI/SNF complexes on liver homeostasis and investigate if a defined set of mutations might favour the development of iCCA rather than HCC.

Experimental approach

We will take advantage of different in vivo and in vitro models able to recapitulate the mutations observed in SWI/SNF subunits characterizing HCC and iCCA. By performing RNA-seq and ChIP-seq experiments we will characterize the transcriptional and epigenetic modifications involved in lineage determination during tumour formation. The use of single cell transcriptomics will shed light on the modifications imposed to tissue microenvironment that might indirectly contribute to reshape cell fate. The use of 3D organoids culture and primary samples from patients will help in translating the results obtained in a clinically relevant setting.

Expected results

The data obtained will help to clarify the alterations imposed to adult liver by the concomitant loss of different SWI/SNF complexes. By applying cutting edge technologies, we will be able to describe the molecular and cellular events favouring the formation of iCCA instead of HCC from the same normal cells. These data will have significant diagnostic and prognostic implications.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

Introduzione

I tumori del fegato sono tra le cause più comuni di morte correlata al cancro in tutto il mondo. La loro incidenza e il tasso di mortalità sono in costante aumento e ciò è dovuto a una serie di fattori tra cui l'assenza di terapie farmacologiche in grado di eradicare questo tipo di tumori, soprattutto a stadi avanzati. Il carcinoma epatico (HCC) e il colangiocarcinoma intraepatico (iCCA) rappresentano i più comuni tumori del fegato. I colangiocarcinomi sono tumori clinicamente silenti, desmoplastici e aggressivi difficili da diagnosticare in fase iniziale. Gli studi in cui sono state descritte l'insieme delle alterazioni genomiche e trascrizionali presenti in questi tumori hanno evidenziato alterazioni a carico di elementi cardine di diversi processi cellulari come responsabili del processo di trasformazione tumorale. Tra le diverse mutazioni identificate molte si sono rivelate alterare l'attività e la composizione di diversi complessi coinvolti nelle modificazioni epigenetiche. HCC e iCCA condividono la stessa cellula di origine e diverse alterazioni genomiche che influiscono sull'attività di complessi associati alla cromatina. Nonostante queste somiglianze, i meccanismi coinvolti nella determinazione del destino cellulare che sono coinvolti nello sviluppo di iCCA invece che HCC, sono ancora in gran parte sconosciuti.

Scopo

Lo scopo di questo progetto è caratterizzare gli effetti combinati di mutazioni in diversi complessi SWI/SNF sull'omeostasi epatica e indagare se una combinazione specifica di mutazioni possa favorire lo sviluppo di iCCA piuttosto che di HCC.

Approccio sperimentale

Ci avvarremo di diversi modelli in vivo e in vitro in grado di ricapitolare le mutazioni osservate nelle diverse subunità SWI/SNF che caratterizzano HCC e iCCA. Mediante esperimenti di RNA-seq e ChIPseq caratterizzeremo le modificazioni trascrizionali ed epigenetiche coinvolte nella determinazione del destino cellulare durante la formazione del tumore. L'uso della trascrittomica a singola cellula permetterà

di fare luce sulle modifiche imposte al microambiente tissutale che potrebbero indirettamente contribuire a riprogrammare il destino cellulare. L'uso della coltura di organoidi 3D e dei campioni primari dei pazienti fornirà in oltre la possibilità di tradurre i risultati ottenuti in un contesto clinicamente rilevante.

Risultati aspettati

I dati ottenuti aiuteranno a chiarire le alterazioni imposte al fegato adulto dalla concomitante perdita di diversi complessi SWI/SNF. Applicando tecnologie all'avanguardia, saremo in grado di descrivere gli eventi molecolari e cellulari che favoriscono la formazione di iCCA piuttosto che di HCC a partire dalla stessa cellula di origine. Questi dati avranno implicazioni diagnostiche e prognostiche significative.

Candidate's profile (skills and competencies)

We are looking for passionate and curious open-minded candidates able to take risks and willing to fail. A mental attitude tuned towards problem solving and to collaborative work is required. He/she should hold a master's degree in biology, biotechnology, medicine, or related fields. Experience in topics such as genomic and epigenomics, mouse genetics, or histology, is preferred but is not mandatory. Willingness to work in vivo and strong ethical values are mandatory.

Profilo del/la candidato/a

Cerchiamo persone appassionate e curiose, co una mentalità aperta ed in grado di assumersi rischi e sopportare i relativi possibili fallimenti. Un approccio mentale orientato alla capacità di risolvere problematiche di diverso genere e spiccate capacità collaborative sono caratteristiche indispensabili. Al momento dell'inizio del dottorato e necessario che il/la candidato/a abbia conseguito una laurea magistrale in scienze biologiche, biotecnologie, medicina o discipline affini. Esperienze in campi quali la genomica e l'epigenomica, mouse genetics, o analisi istologiche saranno valutate positivamente ma non sono indispensabili. La disponibilità a lavorare in vivo e un forte senso etico sono indispensabili.

Project 5

Unveiling the role of ETV7 in breast cancer immune evasion

Ruolo dell'oncoproteina ETV7 nell'evasione dal sistema immunitario

Laboratory:

Laboratory of Molecular Cancer Genetics (LMCG) (https://www.cibio.unitn.it/81/laboratory-of-molecular-cancer-genetics-lmcg)

Principal Investigator: Yari Ciribilli

Synthetic description of the activity and expected research outcome

Immunotherapy is a revolutionary treatment strategy for solid cancers; however, the success of this treatment is limited to a small group of cancer patients. Moreover, selecting patients who are most likely to benefit from immunotherapy is still a clinical challenge. Some types of cancer are more immunogenic than others; for example, melanoma or renal cell carcinoma are considered immunogenic and are more likely to respond to immunotherapy (1). Conventionally, breast cancer is not considered to be highly immunogenic and is known to have various traits to maintain this low immunogenicity (1). For instance, breast cancer often creates an immune suppressive microenvironment, making antigen presentation a difficult task, hence reducing the host immune response (2). On the other hand, some reports demonstrated that the immune system could be crucial in preventing breast cancer metastases (1). Notably, immune evasion has been recently recognized as one of the hallmarks of cancer and one of the most critical obstacles to successful immunotherapy. The defective MHC-I antigen-presenting pathway is indeed a common mechanism leading to reduced activity of T cells (3).

ETV7 is a poorly understood transcriptional repressor, up-regulated in many types of cancer, including breast cancer. We recently demonstrated that ETV7 is up-regulated upon the treatment with various DNA-damaging agents, and this increased expression led to the development of drug resistance (4). Interestingly, ETV7 is also an interferon (IFN)-stimulated gene. A recent study identified ETV7 as a negative regulator of the type I IFN response, hence reducing the innate antiviral response in a host organism (5). Moreover, we identified a set of Interferon-responsive genes significantly down-regulated by ETV7, leading to a remarkable increase in cancer stem cell-like population (6). Further, our recent study showed that ETV7 can reduce inflammatory responses (7). All these data suggest that ETV7 is an important regulator of the immune system; interestingly, our transcriptome analysis in MCF7 and T47D cells over-expressing ETV7 showed that ETV7 was able to repress a set of genes involved in the antigen- presenting pathway.

However, the role of ETV7 in breast cancer immunity is yet to be studied. We hypothesize that the increased expression of ETV7 in breast cancer cells alters the expression of genes essential for immune escape and leads to reduced cancer clearance by T cells and ineffective immunotherapy. Thus, the reversion of the ETV7-mediated changes could lead to novel therapeutic strategies for breast cancer. The main aims of this project will be to understand the role of ETV7 in breast cancer immune evasion via the down-regulation of the MHC-I antigen-presenting pathway and to evaluate how these ETV7-mediated immunomodulating mechanisms affect the efficacy of host immune response and immunotherapy. Moreover, we will analyze the immunoproteasome activity and immunopeptidome diversity in breast cancer cells over-

expressing ETV7. For the execution of this project, we will use both 2D and 3D-culture systems with human cell lines stably over-expressing ETV7 or knock-out for ETV7 as well as more complex 3D cancer cells and immune cells (T cells and macrophages) co-culture models.
In the last part of the project, with the help of the already established collaboration (7) with the Unit of Pathologic Anatomy at Santa Chiara Hospital in Trento (Drs. Barbareschi and Bertalot, two experienced pathologists), we will analyze by immunohistochemistry the correlation between ETV7 protein levels with specific clinical characteristics (immune cells' infiltration, subtype and quality of infiltrated immune cells) and the levels of selected newly identified ETV7 immune response-related targets in a selected local cohort of breast cancer patients (a large collection with > 10 years of follow-up, Trentino Biobank). We predict to establish the role of ETV7 in immune evasion via mediating antigen-presenting pathway. Furthermore, we will determine the effect of ETV7 on T cell-mediated tumor killing and immunotherapy and suggest potential new strategies for improving cancer immunotherapy.
Overall, this project will shed light on the interaction between cancer cells and immune cells, which is essential in acknowledging the complex processes happening in the human organism. Finally, this study will give more knowledge about the functions of ETV7, commonly up-regulated in cancer but still poorly described oncoprotein, which is beneficial for a better understanding of breast cancer progression.
References
1. Bayraktar, S., et al. J Carcinog. 2019 May 23;18:2. doi: 10.4103/jcar.JCar_2_19.
2. Del Alcazar, G., et al. Cancer Immunol Res. 2020 Apr; 8(4): 422–427. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0786 3. Dhatchinamoorthy, K., et al. Front Immunol. 2021 Mar 9;12:636568. doi: 10.3389/fimmu.2021.636568.
4. Alessandrini, F., et al. Neoplasia. 2018 Aug;20(8):857-870. doi: 10.1016/j.neo.2018.06.008.
5. Froggatt, H. M., et al. Sci Signal. 2021 Jul 13;14(691):eabe1194. doi: 10.1126/scisignal.abe1194.
6. Pezzè, L. et al. Cell Death Dis. 2021 Jul 27;12(8):742. doi: 10.1038/s41419-021-04005-y.
7. Meskyte, E. M., et al. Cell Death Dis. 2023 Apr 12;14(4):263. doi: 10.1038/s41419-023-05718-y.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi
L'immunoterapia è considerata una strategia terapeutica rivoluzionaria per i tumori solidi; tuttavia, il successo di questo trattamento è limitato a un piccolo gruppo di pazienti oncologici. Inoltre, selezionare i pazienti che hanno maggiori probabilità di beneficiare dell'immunoterapia è ancora una sfida a livello clinico. Infatti, alcuni tipi di cancro sono più immunogenici di altri; ad esempio, il melanoma o il carcinoma renale sono considerati immunogeni e hanno maggiori probabilità di rispondere all'immunoterapia (1). Convenzionalmente, il cancro al seno non è considerato altamente immunogenico ed è noto che presenta diverse caratteristiche atte a mantenere questa bassa immunogenicità (1). Ad esempio, il cancro al seno genera spesso un microambiente immunosoppressivo, rendendo la presentazione dell'antigene un compito difficile, riducendo quindi la risposta immunitaria dell'ospite (2). D'altra parte, alcuni studi hanno dimostrato come il sistema immunitario possa essere cruciale nella prevenzione delle metastasi del cancro al seno (1). In particolare, l'evasione dalle risposte immunitarie è stata recentemente riconosciuta come uno dei segni distintivi del cancro e uno degli ostacoli più critici per il successo dell'immunoterapia. Infatti, un meccanismo comune che porta a una ridotta attività delle cellule T è rappresentato da una via di presentazione dell'antigene MHC-I difettosa (3).
ETV7 è un repressore trascrizionale poco conosciuto, sovraespresso in molti tipi di cancro, incluso il cancro al seno. Abbiamo recentemente dimostrato che ETV7 è indotto in seguito al trattamento con vari agenti che danneggiano il DNA, e questa maggiore espressione è stata associata allo sviluppo della resistenza a farmaci chemioterapici (4). È interessante notare che ETV7 è anche un gene indotto dagli interferoni (IFN). Uno studio recente ha identificato ETV7 come regolatore negativo della risposta IFN di tipo I, riducendo quindi la risposta antivirale innata dell'organismo ospite (5). Inoltre, il nostro laboratorio ha identificato una serie di geni responsivi all'interferone significativamente repressi da ETV7, determinando un notevole aumento della popolazione di cellule staminali del cancro (6). Inoltre, un altro nostro recente studio ha dimostrato che ETV7 può ridurre le risposte infiammatorie (7). Tutti questi dati suggeriscono che ETV7 è un importante regolatore del sistema immunitario; è interessante notare che la nostra analisi del trascrittoma nelle cellule MCF7 e T47D che sovraesprimono ETV7 ha mostrato che ETV7 è in grado di reprimere un pannello di geni coinvolti nella via di presentazione dell'antigene.
Tuttavia, il ruolo di ETV7 nell'immunità del cancro al seno deve ancora essere studiato. Sulla base delle premesse citate qui sopra, ipotizziamo che l'aumentata espressione di ETV7 nelle cellule del carcinoma mammario alteri l'espressione dei geni essenziali per l'evasione dal sistema immunitario e porti a una ridotta rimozione del cancro da parte delle cellule T e ad una ridotta efficacia dell'immunoterapia. Pertanto, la reversione delle spracitate risposte mediate da ETV7 potrebbe portare a nuove strategie terapeutiche per il cancro al seno. Gli obiettivi principali di questo progetto sono focalizzati alla comprensione del ruolo di ETV7 nell'evasione immunitaria del carcinoma mammario attraverso la down-regolazione della via di presentazione dell'antigene MHC-I e valutare come questi meccanismi immunomodulatori mediati da ETV7 influenzino l'efficacia dell'immunoterapia e delle risposte immunitarie. Inoltre, analizzeremo l'attività dell'immunoproteasoma e le diversità nell'immunopeptidoma nelle cellule di carcinoma mammario che sovraesprimono ETV7. Per l'esecuzione di questo progetto, utilizzeremo sistemi di coltura 2D e 3D con linee cellulari umane che sovraesprimono stabilmente ETV7 o che sono delete per ETV7, nonché modelli 3D più complessi di cocultura con cellule tumorali e cellule del sistema immunitario (cellule T e macrofagi).
Nell'ultima parte del progetto, con l'ausilio della già consolidata collaborazione con l'Unità di Anatomia Patologica dell'Ospedale Santa Chiara di Trento (Dott. Barbareschi e Bertalot, due esperti patologi) (7), analizzeremo mediante immunoistochimica la correlazione tra i livelli della proteina ETV7 con diverse caratteristiche cliniche specifiche (infiltrazione di cellule immunitarie, sottotipo e qualità delle cellule immunitarie infiltrate) ed i livelli dei bersagli identificati di ETV7 coinvolti nella risposta immunitaria in una coorte locale selezionata di pazienti con carcinoma mammario (una vasta collezione con > 10 anni di follow-up, Biobanca Trentino).

Prevediamo di determinare il ruolo di ETV7 nell'evasione dal sistema immunitario attraverso la repressione della via di presentazione dell'antigene. Inoltre, determineremo l'effetto di ETV7 sulla citotossicità delle cellule tumorali mediata dalle cellule T e sull'immunoterapia e proporremo potenziali nuove strategie per migliorare l'immunoterapia.
Questo progetto farà luce sull'interazione tra le cellule tumorali e quelle del sistema immunitario, che è essenziale per riconoscere i complessi processi che avvengono nell'uomo. Infine, questo studio fornirà maggiori conoscenze sulle funzioni di ETV7, comunemente sovraespresso nel cancro ma ancora poco descritto come oncoproteina, che potrà rivelarsi importante per una migliore comprensione della progressione del cancro al seno.

Referenze

1. Bayraktar, S., et al. J Carcinog. 2019 May 23;18:2. doi: 10.4103/jcar.JCar_2_19.
2. Del Alcazar, G., et al. Cancer Immunol Res. 2020 Apr; 8(4): 422–427. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0786
3. Dhatchinamoorthy, K., et al. Front Immunol. 2021 Mar 9;12:636568. doi: 10.3389/fimmu.2021.636568.
4. Alessandrini, F., et al. Neoplasia. 2018 Aug;20(8):857-870. doi: 10.1016/j.neo.2018.06.008.
5. Froggatt, H. M., et al. Sci Signal. 2021 Jul 13;14(691):eabe1194. doi: 10.1126/scisignal.abe1194.
6. Pezzè, L. et al. Cell Death Dis. 2021 Jul 27;12(8):742. doi: 10.1038/s41419-021-04005-y.
7. Meskyte, E. M., et al. Cell Death Dis. 2023 Apr 12;14(4):263. doi: 10.1038/s41419-023-05718-y.

Candidate's profile (skills and competencies)
The candidate should be highly motivated and have a strong background in molecular and cellular biology, like the manipulation of mammalian cell lines in sterility, RNA and protein analysis, and qPCR measurements. Working in a group and personal skills are welcomed. A fluent knowledge of the English language will be required, as the host institution is mainly international.

Profilo del/la candidato/a
Il candidato dovrebbe essere altamente motivato e avere un forte background in biologia molecolare e cellulare, come la manipolazione in sterilità di linee cellulari di mammifero, analisi di RNA e proteine ed esperimenti di qPCR. La capacità di lavorare in gruppo rappresenta un valore aggiunto. E' richiesta una fluente conoscenza della lingua inglese, in quanto l'istituto ospitante è prevalentemente internazionale..

Project 6

Exploring the function of TERRA as trigger of the homologous recombination process and telomere maintenance of ALT cancer cells

Studiare la funzione di TERRA quale induttore del processo di ricombinazione omologa e del mantenimento dei telomeri in cellule tumorali ALT

Laboratory:
Laboratory of Cell Biology and Molecular Genetics (https://www.cibio.unitn.it/501/laboratory-of-cell-biology-and-molecular-genetics)

Principal Investigator: Emilio Cusanelli

Synthetic description of the activity and expected research outcome
Cancer cells achieve replicative immortality by expressing the enzyme telomerase or by activating alternative telomere lengthening mechanisms, known as ALT, which rely on homologous recombination (HR). ALT mechanisms are prevalent in specific cancer types, including pediatric glioblastoma, gliomas, and osteosarcomas[1] which display rapid progression and high rates of mortality[2]. The identification of novel therapeutic targets for the treatment of ALT cancers is thus urgently needed. An important limit in this regard is the lack of information on the molecular mechanisms that trigger ALT. The DNA RECQ helicase Bloom (BLM), a subunit of the BTR complex, is crucially implicated in the HR process of ALT telomeres[3,4]. Furthermore, the HR process of ALT telomeres is known to occur at PML bodies, small nuclear bodies where telomeres and the BTR complex localize in ALT cells, forming APBs (ALT-associated PML bodies)[5]. Nevertheless, the mechanisms that regulate APBs formation and BLM activity at telomeres in ALT cells remain unknown. ALT cancer cells display heightened levels of telomere replication stress which promotes HR. Such replication stress is fueled by the presence of telomeric R-loops formed by the telomeric repeat-containing RNA TERRA[6]. Indeed, one of the hallmarks of ALT is increased telomere transcription and induced expression of the long noncoding RNA TERRA. TERRA molecules are important regulators of telomere biology, and they are essential to the HR at ALT telomeres. Indeed, TERRA deregulation abolishes ALT leading to cancer cell death[7,8]. Nevertheless, the mechanisms of TERRA-mediated regulation of ALT remain to be elucidated, and whether TERRA transcripts trigger ALT is unknown. Preliminary evidence from our lab indicates that TERRA interacts with both BLM and PML proteins. Furthermore, we observed that induction of ALT in telomerase-positive human cancer cells increases telomeric localization of TERRA and PML bodies formation at very early stages of ALT activation.
This PhD project aims at dissecting the function of TERRA in ALT induction. Our hypothesis is that TERRA molecules trigger ALT by promoting the formation of APBs through interaction with PML, BLM and telomeres. The presence of R-loops at chromosome ends will then

fuel HR once ALT mechanisms are installed. These hypotheses will be explored using cytologic approaches (RNA FISH, DNA FISH, IF, live cell imaging) and biochemistry approaches such as Co-IP, ChIP, RT-qPCR, western blot performed on ALT human cancer cell lines as well as telomerase-positive human cancer cells in which a telomerase-to-ALT switch will be induced by depletion of the histone chaperones ASF1a/b, as previously described in literature[9] and reproduced in our laboratory. The PhD student will also investigate the involvement of R-loops in ALT induction, APBs formation and the HR process, by performing experiments of R-ChIP, CO-FISH and by depleting R-loops in ALT cells through RNaseH1 overexpression. The lab has expertise in the abovementioned approaches[10]. Thanks to the financial support of an ongoing research grant from AIRC (MFAG2019) our lab has been able to optimize a protocol to induce ALT from telomerase-positive cancer cells9 and to deplete TERRA using antisense oligonucleotides (manuscript in preparation). These tools will be applied to verify the role of TERRA as a trigger of ALT and to define the mechanisms of TERRA-mediated regulation of HR in ALT cancer cells.
Importantly, there will be the opportunity to validate the results in a multicellular model organism which is crucially important for the study of ALT. Indeed, C. elegans is the only multicellular organism that survives telomerase inactivation by developing ALT mechanisms[11]. To date no studies on TERRA in C. elegans are available from literature. We are currently investigating TERRA in C. elegans in collaboration with the laboratory of Dr. Verena Jantsch at the Max F. Perutz Laboratories in Vienna that has a longstanding expertise with the use of C. elegans and with the study of the BTR complex[12]. We are currently culturing these organisms also in our laboratory. Our results indicate that ALT strains express higher levels of TERRA than wild type strains (manuscript under review). Moreover, by studying TERRA expression in germ cells we observed that TERRA levels and its localization at telomeres are highest during pachytene, a stage of meiosis when HR is ongoing. Notably, the meiotic recombination complex is crucially involved in ALT[13].
Therefore, for this project we will have all the tools in hand and the required expertise to study the function of TERRA in ALT induction and regulation in human cancer cell lines and to confirm whether these roles are conserved in a multicellular model organism which is at the forefront of ALT research.

References:

1) Kang MH et al., Pediatric Blood & Cancer 2011; 56:239–249.
2) Jeitany M et al., International Journal of Cancer 2015; 136:1546–1558.
3) Zhang J-M et al., Molecular Cell 2021; 81:1027-1042.
4) Min J et al., Genes & Development 2019; 33:814-827.
5) Loe TK et al., Genes & Development 2020; 34:650-662.
6) Arora R et al., Nature Communications 2014; 5:5220.
7) Silva B et al., Nature Communications 2021; 2:3760.
8) Petti E et al., Nature Communications 2019; 10:1001.
9) O'Sullivam RJ et al., Nature Structure Molecular Biology 2014; 21:167-174.
10) Savoca V et al., Cell Reports 2023; 42:112406.
11) Cheng et al., PNAS 2012; 109(20):7805-7810.
12) Dello Stritto et al., Nucleic Acids Research 2022; 50(10):5652-5671
13) Cho et al., Cell 2014; 159:108-121.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

L'immortalità delle cellule tumorali dipende dall'attività dell'enzima telomerasi oppure dall'attivazione di meccanismi alternativi di allungamento dei telomeri noti come ALT, che avvengono grazie ad un processo di ricombinazione omologa tra i telomeri. I meccanismi ALT sono prevalenti in alcune tipologie di cancro come glioblastomi pediatrici, gliomi ed osteosarcomi che mostrano un'elevata aggressività ed un alto grado di mortalità. Per questo motivo risulta urgente il bisogno di identificare nuovi target terapeutici per il trattamento dei tumori ALT.
A questo proposito, un limite importante è imposto dalla mancanza di informazioni sui meccanismi che inducono ALT. L'enzima DNA RECQ elicasi Bloom (BLM), subunità del complesso BTR, svolge un ruolo essenziale nel processo di ricombinazione omologa ai telomeri in cellule tumorali ALT[3,4]. Questo processo si pensa avvenga in piccoli organelli nucleari detti corpi PML dove, nelle cellule ALT, sono localizzati i telomeri e la proteina BLM, formando così i corpi APBs (corpi PML associati ad ALT)[5]. Purtroppo, i meccanismi che regolano la formazione degli APBs e l'attività di BLM in cellule ALT non sono ancora noti.
Le cellule tumorali ALT mostrano elevati livelli di stress replicativo ai telomeri che promuove il meccanismo di ricombinazione omologa. Lo stress replicativo è indotto dalla presenza di strutture R-loop ai telomeri formate dal long noncoding RNA telomerico TERRA[6]. Infatti, una delle principali caratteristiche delle cellule ALT è proprio l'elevata espressione dell'RNA TERRA che agisce come importante regolatore della ricombinazione omologa ai telomeri. I targeting molecolare e la conseguente down-regolazione di TERRA inibiscono infatti ALT portando alla morte delle cellule tumorali[7,8]. Ciononostante, non è ancora chiaro quali siano i meccanismi utilizzati dai trascritti TERRA per regolare ALT, ed in particolare non è noto se l'espressione di TERRA sia in grado di indurre ALT. Evidenze preliminari del nostro laboratorio indicano che i trascritti TERRA interagiscono con le proteine BLM e PML. Inoltre, abbiamo osservato che durante l'induzione di ALT in cellule tumorali umane telomerasi- positive la localizzazione di TERRA ai telomeri e la formazione dei corpi PML aumentano durante stadi precoci dell'attivazione del meccanismo ALT.
Questo progetto PhD si prefigge di capire le funzioni di TERRA nell'attivazione di ALT. La nostra ipotesi è che TERRA sia in grado di indurre ALT promuovendo la formazione dei corpi APBs attraverso la sua interazione con le proteine PML e BLM e con i telomeri. Successivamente, la presenza delle strutture R-loops ai telomeri induce il meccanismo di ricombinazione omologa quando il meccanismo ALT è attivo. Queste

ipotesi saranno esplorate utilizzando approcci citologici (RNA FISH, DNA FISH, IF, live cell imaging) e biochimici, come Co-IP, ChIP, RT-qPCR, western blot, che verranno effettuati su linee cellulari tumorali umane ALT ed in cellule tumorali telomerasi-positive dopo induzione di ALT mediante il targeting molecolare delle proteine ASF1a/b, come descritto in letteratura[9] e riprodotto nel nostro laboratorio. Lo studente PhD studierà inoltre il coinvolgimento degli R-loops nell'induzione di ALT, la formazione degli APBs ed il processo di ricombinazione omologa mediante esperimenti di R-ChIP, CO-FISH ed abbassando i livelli di R-loops nelle cellule mediante espressione dell'enzima RNaseH1. Il laboratorio ha l'expertise negli approcci sopracitati[10]. Grazie al supporto finanziario di un grant AIRC (MFAG2019) il nostro laboratorio ha inoltre potuto ottimizzare i protocolli di induzione di ALT da cellule tumorali telomerasi positive[9] e di targeting molecolare per la down-regolazione dei trascritti TERRA nelle cellule mediante oligonucleotidi atiseso (manoscritto in preparazione). Gli strumenti sopracitati verranno quindi applicati in questo progetto per verificare il ruolo di TERRA quale attivatore del processo ALT e per definire i meccanismi con cui TERRA regola la ricombinazione omologa dei telomeri in cellule tumorali ALT.
Inoltre, durante questo progetto si avrà la possibilità di validare i risultati in un organismo modello multicellulare di principale importanza nello studio di ALT. Infatti, l'organismo C. elegans è l'unico organismo multicellulare in grado di sopravvivere all'inattivazione del gene della telomerasi sviluppando un meccanismo ALT[11]. Ad oggi non sono presenti studi su TERRA in C. elegans nella letteratura scientifica. Il nostro gruppo sta però studiando TERRA in C. elegans in collaborazione con il laboratorio della Dr.ssa Verena Jatsch al Max. F. Perutz Laboratories di Vienna, che studia da moltissimo tempo l'organismo C.elegans ed in particolare il complesso BTR[12].
In questo momento stiamo inoltre crescendo questi organismi anche nel nostro laboratorio. I nostri risultati indicano che i ceppi ALT esprimono livelli più elevati di TERRA rispetto ai ceppi parentali (manoscritto in revisione). In aggiunta, studiando l'espressione di TERRA nelle cellule germinali abbiamo osservato che i livelli di TERRA e la sua localizzazione ai telomeri sono elevati durante la fase di pachitene, uno stadio della meiosi in cui avviene la ricombinazione omologa. Proprio il complesso di ricombinazione meiotica è coinvolto in modo cruciale nel meccanismo ALT[13].
Per i motivi citati sopra, per questo progetto si avranno a disposizione tutti gli strumenti e gli expertise per studiare la funzione di TERRA nel processo di induzione e regolazione di ALT in cellule tumorali umane e per confermare i risultati ottenuti in un organismo modello multicellulare ideale per lo studio dei processi ALT.

References:

1) Kang MH et al., Pediatric Blood & Cancer 2011; 56:239–249.
2) Jeitany M et al., International Journal of Cancer 2015; 136:1546–1558.
3) Zhang J-M et al., Molecular Cell 2021; 81:1027-1042.
4) Min J et al., Genes & Development 2019; 33:814-827.
5) Loe TK et al., Genes & Development 2020; 34:650-662.
6) Arora R et al., Nature Communications 2014; 5:5220.
7) Silva B et al., Nature Communications 2021; 2:3760.
8) Petti E et al., Nature Communications 2019; 10:1001.
9) O'Sullivam RJ et al., Nature Structure Molecular Biology 2014; 21:167-174.
10) Savoca V et al., Cell Reports 2023; 42:112406.
11) Cheng et al., PNAS 2012; 109(20):7805-7810.
12) Dello Stritto et al., Nucleic Acids Research 2022; 50(10):5652-5671
13) Cho et al., Cell 2014; 159:108-121.

Candidate's profile (skills and competencies)

1. A master's degree in conformity with the institutional regulations: An Italian "Laurea magistrale" instituted in conformity with Italian Ministerial Decree 270/2004, or a university degree of the previous regulations (Italian "Laurea specialistica " or "Diploma di Laurea"), or an equivalent degree obtained abroad (Master's degree) and recognized as equivalent to the Italian "Laurea magistrale" by the Admissions Committee for the sole purposes of admission to the Doctoral programme, also within the framework of international agreements.)
2. Preferred are students with experience in cancer biology and/or imaging and/or molecular biology and/or neurobiology.

Profilo del/la candidato/a

Il candidato dovrà avere un chiaro interesse per le tematiche del progetto ed esperienza nelle tecniche di base di biologia molecolare come western blot, Co-IP, RT-qPCR ed in metodologie applicate a colture cellulari. Esperienza di ricerca sugli argomenti del progetto (biologia dei telomeri, RNA e cancro) verrà considerata positivamente

Project 7

CAPTOR: Computational identification of Cancer-Altered Post-transcriptional Trees Of Regulation

Laboratory:
Laboratory of RNA Regulatory Networks (https://www.cibio.unitn.it/1096/rna-regulatory-networks)

Principal Investigator: Erik Dassi

Synthetic description of the activity and expected research outcome

Post-transcriptional regulation of gene expression (PTR) is widely altered in cancer. This regulatory layer determines cell phenotypes by acting on key cellular processes, from splicing to the control of RNA stability and translation (1). Thousands of RNA-binding proteins (RBPs) and non-coding RNAs (ncRNAs) (2, 3) implement this regulatory layer through a multitude of mechanisms. RBPs, in particular, form a complex network of cooperative and competitive interactions with far-reaching consequences for physiology and pathology (4, 5). However, PTR's contribution to tumor onset and progression is still broadly unappreciated. While many algorithms identifying oncogenic alterations to transcriptional regulation exist, we still lack a computational framework identifying such aberrations in post-transcriptional networks.

Addressing this knowledge gap could allow exploiting PTR mechanisms to develop novel, highly specific therapeutic strategies for cancer. Towards this goal, the proposed project will implement the CAPTOR algorithm (Cancer-Altered Post-transcriptional Trees Of Regulation). CAPTOR will trace PTR mechanisms and determine those that could cause altered expression of specific genes in the cancer of interest.

The Dassi lab has previously developed an array of resources to map post-transcriptional regulation, including AURA2, a comprehensive database of post-transcriptional regulation (6), and QUADRatlas, a database of RNA G-quadruplexes (RG4) and RG4-binding proteins (7). The two databases contain >3M binding sites for 1200 human RBPs and ncRNAs. Furthermore, they map >100000 cis-elements to their respective position on the mRNA, including AU-rich elements, RNA G-quadruplexes, RNA modification sites, and more. They thus integrate a substantial and constantly updated set of post-transcriptional events that the community can exploit to infer potential regulatory mechanisms affecting their genes of interest. Therefore, the PhD candidate will have access to all that is needed to identify PTR mechanisms in the context of interest. Coupling these extensive resources with cancer genomic, transcriptomic, and proteomic data (such as the ones from the TCGA consortium) will allow identifying alterations of PTR programs in the analyzed tumors.

The PhD candidate will integrate PTR annotations and cancer omics data, using a network-based approach to prioritize aberrations and identify candidates to develop new therapeutic strategies. Then, CAPTOR will be applied to the broad set of TCGA tumor samples and implement a freely accessible online platform allowing researchers to explore the identified alterations to PTR mechanisms. This project will thus accelerate their translation into the clinic. Finally, to demonstrate the effectiveness of CAPTOR, the PhD candidate will apply it to pancreatic adenocarcinoma (PDAC), one of the most lethal cancers. PDAC is a cancer in which RBPs are often altered, and is an increasingly frequent disease with a mere 5% survival rate (8, 9). The lack of effective cures calls for innovative treatment options that PTR strategies could offer. We will thus validate the identified PTR alterations to determine their effect on cell proliferation and invasion in this tumor. To foster a multidisciplinary training, the PhD candidate will be given the opportunity to participate in the experimental validation, which will be conducted with the help of the PI's collaborators. The fellow will also benefit from an extensive network of collaborators, including computational and molecular biology labs, and the TRANSLACORE (Translational control in Cancer European Network) COST action, of which the PI is an active member and working group leader.

This project will thus provide a much-needed computational strategy to identify altered post-transcriptional regulation in cancer. It will thus improve our understanding of the biology of this lethal disease. Furthermore, it will demonstrate a new, disruptive approach to designing cancer therapies by exploiting post-transcriptional regulation.

References

1. Corbett,A.H. (2018) Post-transcriptional regulation of gene expression and human disease. Curr. Opin. Cell Biol., 52, 96–104.
2. Gerstberger,S, et al (2014) A census of human RNA-binding proteins. Nat. Rev. Genet., 15, 829–845.
3. Bartel,D.P. (2018) Metazoan MicroRNAs. Cell, 173, 20–51.
4. Quattrone,A. and Dassi,E. (2019) The Architecture of the Human RNA-Binding Protein Regulatory Network. iScience, 21, 706–719.
5. Dassi,E. (2017) Handshakes and Fights: The Regulatory Interplay of RNA-Binding Proteins. Front Mol Biosci, 4, 67.
6. Dassi,E, et al (2014) AURA 2: Empowering discovery of post-transcriptional networks. Translation (Austin), 2, e27738.
7. Bourdon,S, et al (2023) QUADRatlas: the RNA G-quadruplex and RG4-binding proteins database. Nucleic Acids Res., 51, D240–D247.
8. Bailey,P, et al (2016) Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. Nature, 531, 47–52.
9. Shin,S, et al (2022) Translational alterations in pancreatic cancer: a central role for the integrated stress response. NAR Cancer, 4, zcac031.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

La regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica (PTR) è frequentemente alterata nel cancro. Questo livello di regolazione dell'espressione genica determina i fenotipi cellulari agendo su processi chiave, dallo splicing al controllo della stabilità e della traduzione dell'RNA (1). Migliaia di proteine leganti l'RNA (RBP) e RNA non codificanti (ncRNA) (2, 3) implementano questo livello di regolazione attraverso una moltitudine di meccanismi. Le RBP, in particolare, formano una complessa rete di interazioni cooperative e competitive con conseguenze di vasta portata per la fisiologia e la patologia (4, 5). Tuttavia, il contributo della regolazione post-trascrizionale all'insorgenza e alla progressione dei tumori è ancora ampiamente sottovalutato. Sebbene esistano molti algoritmi che identificano alterazioni oncogeniche della regolazione trascrizionale, manca ancora uno strumento computazionale che identifichi tali aberrazioni nelle reti post-trascrizionali. Affrontare questo gap di conoscenza potrebbe consentire di sfruttare i meccanismi PTR per sviluppare nuove strategie terapeutiche altamente specifiche per il cancro.

A tal fine, il progetto proposto implementerà l'algoritmo CAPTOR (Cancer-Altered Post-transcriptional Trees Of Regulation). CAPTOR traccerà i meccanismi post-trascrizionali e determinerà quelli che potrebbero causare un'espressione alterata di geni specifici nel cancro di interesse.
Il laboratorio Dassi ha precedentemente sviluppato una serie di risorse per mappare la regolazione post-trascrizionale, tra cui AURA2, un database completo di eventi di regolazione post-trascrizionale (6) e QUADRatlas, un database di RNA G-quadruplex (RG4) e proteine leganti RG4 (7). I due database contengono >3 milioni di siti di legame per 1200 RBP e ncRNA umani. Inoltre, mappano >100000 elementi cis nella rispettiva posizione sull'mRNA, inclusi elementi AU-rich, RNA G-quadruplex, RNA modifications e altro. Integrano quindi un insieme sostanziale e costantemente aggiornato di eventi post-trascrizionali che la comunità può sfruttare per dedurre potenziali meccanismi regolatori che influenzano i loro geni di interesse. Pertanto, il dottorando avrà accesso a tutto ciò che è necessario per identificare i meccanismi PTR nel contesto di interesse. L'accoppiamento di queste vaste risorse con i dati genomici, trascrittomici e proteomici del cancro (come quelli del consorzio TCGA) consentirà di identificare le alterazioni dei programmi PTR nei tumori analizzati.
Il dottorando integrerà le annotazioni PTR e i dati di omiche del cancro, utilizzando un approccio basato sui network per dare priorità alle aberrazioni e identificare i candidati per sviluppare nuove strategie terapeutiche. Quindi, CAPTOR verrà applicato all'ampia gamma di campioni tumorali TCGA e verrà implementata una piattaforma online liberamente accessibile che consentirà ai ricercatori di esplorare le alterazioni identificate nei meccanismi PTR. Questo progetto accelererà così la loro traduzione nella clinica. Infine, per dimostrare l'efficacia di CAPTOR, il dottorando lo applicherà all'adenocarcinoma pancreatico (PDAC), uno dei tumori più letali. Il PDAC è un cancro in cui le RBP sono spesso alterate ed è una malattia sempre più frequente con un tasso di sopravvivenza di appena il 5% (8, 9). La mancanza di cure efficaci richiede opzioni terapeutiche innovative che le strategie PTR potrebbero offrire. Convalideremo quindi le alterazioni post-trascrizionali identificate per determinare il loro effetto sulla proliferazione cellulare e l'invasione in questo tipo di tumore. Per favorire una formazione multidisciplinare, al dottorando sarà data la possibilità di partecipare alla validazione sperimentale, che sarà condotta con l'ausilio dei collaboratori del PI. Il dottorando beneficerà inoltre di un'ampia rete di collaboratori, inclusi laboratori di biologia molecolare e computazionale, e della COST action TRANSLACORE (Translational control in Cancer European Network), di cui il PI è membro attivo e working group leader.
Questo progetto fornirà quindi una strategia computazionale per identificare la regolazione post-trascrizionale alterata nel cancro. Migliorerà così la nostra comprensione della biologia di questa malattia letale. Inoltre, dimostrerà un nuovo approccio dirompente alla progettazione di terapie antitumorali sfruttando la regolazione post-trascrizionale.
Bibliografia.
1. Corbett,A.H. (2018) Post-transcriptional regulation of gene expression and human disease. Curr. Opin. Cell Biol., 52, 96–104.
2. Gerstberger,S, et al (2014) A census of human RNA-binding proteins. Nat. Rev. Genet., 15, 829–845.
3. Bartel,D.P. (2018) Metazoan MicroRNAs. Cell, 173, 20–51.
4. Quattrone,A. and Dassi,E. (2019) The Architecture of the Human RNA-Binding Protein Regulatory Network. iScience, 21, 706–719.
5. Dassi,E. (2017) Handshakes and Fights: The Regulatory Interplay of RNA-Binding Proteins. Front Mol Biosci, 4, 67.
6. Dassi,E, et al (2014) AURA 2: Empowering discovery of post-transcriptional networks. Translation (Austin), 2, e27738.
7. Bourdon,S, et al (2023) QUADRatlas: the RNA G-quadruplex and RG4-binding proteins database. Nucleic Acids Res., 51, D240–D247.
8. Bailey,P, et al (2016) Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. Nature, 531, 47–52.
9. Shin,S, et al (2022) Translational alterations in pancreatic cancer: a central role for the integrated stress response. NAR Cancer, 4, zcac031.

Candidate's profile (skills and competencies)
The Tutor has an established track record of experience in applying RNA computational biology to the study of cancer and tools development. An ideal candidate profile is a master student with a strong background in quantitative biology or computer science, solid knowledge of programming and algorithms, and experience in the analysis of high-throughput transcriptomics datasets.

Profilo del/la candidato/a
Il candidato deve avere una buona conoscenza dell'analisi del sequenziamento dell'RNA e dell'integrazione dei dati provenienti da diversi sistemi omici. L'esperienza in colture cellulari è un plus, ma non un requisito indispensabile.

Project 8

Cell biological and therapeutic analysis of kinetochore-targeting anti-cancer compounds.

Analisi biologiche cellulari e terapeutiche di composti anti-tumorali che bersagliano il cinetocore

Laboratory:
Laboratory of Chromosome Segregation Biology (https://www.cibio.unitn.it/510/laboratory-of-chromosome-segregation-biology)

Principal Investigator: Peter De Wulf

Synthetic description of the activity and expected research outcome

This project will study a new class of patented, first-in-class, anti-mitotic compounds that inhibit the binding of kinetochores to the mitotic spindle.

Following chromosome replication in eukaryotes, a kinetochore hierarchically assembles from ~100 proteins on the centromere region of each chromosome and its replicate (named sister chromatids), which are held together (paired) by cohesin ring complexes. Both kinetochores then bind (bi-orient) the sister chromatids to the microtubules (MT) of the mitotic spindle, which extend from both centrosomes. The spindle assembly checkpoint (SAC), which localizes to the kinetochore-MT interface, monitors sister chromatid-spindle bi-orientation. Only when ALL sister chromatids are correctly aligned to the spindle in the cellular mid-zone will the cohesin complexes be cleaved. The latter event allows the chromatids to be segregated between the two daughter cells. Specifically, each kinetochore will keep its underlying chromatid firmly attached to the MTs, which then depolymerize to move each chromatid and its sister in opposite direction into both daughter cells. The latter thus obtain the exact replicate of the mother's chromosome content (ploidy). Even when only one single sister chromatid pair is not correctly bi-oriented will the SAC arrest mitosis and the chromosome segregation process, allowing all sister chromatids to establish correct binding to the spindle. If not corrected, the SAC will keep the cells halted, which will ultimately be eliminated by apoptosis.

For four decades, compounds that target the spindle (either by stabilizing or inhibiting MT polymerization) have been successfully used as anti-cancer drugs. Indeed, as they prevent sister chromatid-spindle binding or chromosome segregation, they activate the SAC and subsequently trigger apoptosis. Cancer cells, which are characterized by uncontrolled and aggressive cell division, are highly sensitive to these drugs. Unfortunately, these compounds also target the MTs inside neurons such that patients treated with anti-MT drugs suffer from debilitating neurological toxicity. Though anti-mitotic drugs have proven useful in the clinic, a new generation of drugs must be developed that avoid targeting the MTs but rather inhibit kinetochores. Such compounds would not be neurotoxic (kinetochores do not exists in neurons) while still targeting with elevated affinity the aggressively dividing cancer cells.

In collaboration with the labs of Profs. Minucci and Silvestri, we have developed compounds that target subunit Ndc80 of the conserved outer kinetochore NDC80 complex. This complex further comprises proteins Nuf2, Spc24, and Spc25. The NDC80 complex performs three roles at kinetochores: it is an essential structural component of kinetochore, it physically attaches the kinetochore and underlying sister chromatid pair to the mitotic spindle, and recruits the SAC. By drug-targeting Ndc80 we prevent kinetochores from binding to the spindle MTs, while keeping the kinetochore and spindle structures intact and maintaining SAC proficiency. As such, our compounds will prevent sister chromatid attachment to the spindle and trigger the SAC, resulting in a mitotic arrest, and ultimately cell death.

This PhD project will study our compounds via three layers of investigation: cell biological and functional studies, chemical design and pharmacological analyses, and anti-cancer research. These lines of research will be performed in parallel.

First, together with Prof. Silvestri we will continue to optimize the chemical structure and pharmacological properties of our compounds to maximize their activity and stability in the human body. Their anti-kinetochore activity will be quantified in human cells, and used in iterative, computational and chemical structure-activity optimization studies.

Second, we will use our compounds to study unknown kinetochore and cell cycle activities in human and yeast cells. For example, how will dividing cells respond to our compounds once the chromosome segregation process is occurring with chromosomes detaching from the spindle MTs? Will kinetochore proteins mutationally/structurally adapt in response to our compounds to still allow for kinetochore-spindle binding? Etc.

Third, in collaboration with the National Cancer Institute (USA) we will map which cancers are most sensitive to our compounds. Present results have already revealed that leukemia is highly sensitive to our molecules. Based on the obtained anti-cancer activity profile, we will test the compounds in mouse xenograft models. These experiments will be performed together with Prof. Minucci's lab.

Given the multi-dimensional character of this project, the PhD student will have the chance to work in and learn many scientific methods from the three labs involved.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

Questo progetto studierà una nuova classe di composti anti-mitotici, brevettati, e primi nella loro categoria, che inibiscono il legame dei cinetocori al fuso mitotico.

Negli eucarioti, dopo la replicazione cromosomica, un cinetocore (composto da ~100 proteine) si assembla gerarchicamente sulla regione centromerica di ciascun cromosoma e il suo replicato (chiamati cromatidi fratelli), che sono tenuti insieme (accoppiati) da complessi di anelli di coesione (coesine). Entrambi i cinetocori legano (bi-orientano) i cromatidi fratelli ai microtubuli (MT) del fuso mitotico, che si estendono da entrambi i centrosomi. Il punto di controllo dell'assemblaggio del fuso (spindle assembly checkpoint, SAC), che si localizza nell'interfaccia cinetocore-MT, monitora il bi-orientamento degli attacchi tra MT e cromatidio fratello. Solo quando TUTTI i cromatidi fratelli sono allineati correttamente dal nella zona mediana cellulare, i complessi di coesione saranno scissi consentendo la segregazione dei cromatidi tra le due cellule figlie. Nello specifico, ogni cinetocore manterrà il suo cromatidio saldamente attaccato alle estremità dei MT, che poi si depolimerizzano per spostare ogni cromatidio in direzione opposta e in ugual modo in entrambe le cellule figlie. Queste ultime ottengono così il corretto contenuto cromosomico della madre (ploidia). Quando una singola coppia di cromatidi fratelli non è correttamente bi-orientata, il SAC arresta la mitosi e il processo di segregazione cromosomica, consentendo a tutti i cromatidi fratelli di legarsi correttamente al fuso. Se questo non avviene, il SAC manterrà le cellule bloccate, che verranno poi eliminate tramite morte per apoptosi.

Per quarant'anni, i composti che bersagliano il fuso (stabilizzando o inibendo la polimerizzazione dei MT) sono stati usati con successo come farmaci anti-cancro. Infatti, poichè prevengono il legame tra fuso e cinetocore, e quindi, la segregazione cromosomica, attivano il SAC e di conseguenza inducono l'apoptosi. Le cellule tumorali, che sono caratterizzate da divisione cellulare incontrollata, sono altamente sensibili a questi composti. Sfortunatamente, questi composti bersagliano anche i MT dei neuroni, inducendo così una debilitante tossicità neurologica nei pazienti trattati con questi farmaci. Sebbene questi composti anti-mitotici siano utilizzati in clinica, si ha la necessità di sviluppare una nuova generazione di farmaci che evitino di colpire i MT ma piuttosto inibiscano i cinetocori. Tali composti non sarebbero neurotossici (i neuroni differenziati non assemblano i cinetocori) ma bersaglierebbero aggressivamente le cellule tumorali in divisione.
In collaborazione con i laboratori dei Profs. Minucci e Silvestri, abbiamo sviluppato composti che mirano alla subunità Ndc80 del complesso esterno conservato del cinetocore NDC80. Questo complesso comprende inoltre le proteine Nuf2, Spc24 e Spc25. Il complesso NDC80 svolge tre ruoli nei cinetocori: è una componente strutturale essenziale del cinetocore, attacca fisicamente il cinetocore ai cromatidi fratelli, e recluta il SAC. Con un composto anti-Ndc80 impediamo che i cinetocori si leghino ai MT del fuso, mentre manteniamo le strutture del fuso e del cinetocore intatte e il SAC competente. Per tanto, i nostri composti impediranno l'attacco tra MT e cromatidio e innescheranno il SAC, con conseguente arresto mitotico e infine morte cellulare.
Visto il carattere multi-dimensionale del progetto, lo/a studente/ssa di dottorato avrà la possibilità di lavorare ed imparare diverse tecniche in ognuno dei tre laboratori coinvolti.

Candidate's profile (skills and competencies)
M.Sc. degree in the biological (cell biology, molecular biology, physiology, genetics), biotechnological, oncological, chemical or pharmacological sciences.

Profilo del/la candidato/a
Laurea magistrale specialistica in scienze biologiche (biologia cellulare, biologia molecolare, fisiologia, genetica), biotecnologiche, oncologiche, chimiche o scienze farmaceutiche.

Project 9

The interplay between p53 and DKC1 on the production of snoRTs: a new class of noncoding RNAs in the pathology of breast cancer cells

L'interazione tra p53 e DKC1 sulla produzione degli snoRTs: una nuova classe di RNA non codificanti coinvolti nella patologia delle cellule di cancro al seno

Laboratory:
Laboratory of Transcriptional Networks (https://www.cibio.unitn.it/85/laboratory-of-transcriptional-networks)
Laboratory of RNA Regulatory Networks (https://www.cibio.unitn.it/1096/rna-regulatory-networks)

Principal Investigator: Alberto inga, Erik Dassi & Lorenzo Montanaro (UniBo)

Synthetic description of the activity and expected research outcome
Small nucleolar RNAs (snoRNAs) are noncoding RNAs of 60-300 nucleotides in length transcribed by RNA Pol II. Most snoRNAs are encoded (hosted) in the introns of protein-coding and non-protein-coding genes. Recent studies determined that snoRNAs and their host genes are frequently altered in human cancer (1). However, mechanistic insights into their role in tumorigenesis are lacking, except for a few cases. For example, H/ACA box snoRNAguided rRNA pseudouridylation was shown to affect gene expression control, mRNA translation, and translational fidelity. Importantly, these regulatory mechanisms appear to play a role in tumorigenesis by ultimately affecting the expression of crucial cancer genes (2, 3). A study led by the Montanaro lab discovered that selected snoRNA sequences could be found in the cell as retained introns of specific mRNA isoforms expressed by their host genes (4), giving rise to snoRNA retaining transcripts, called snoRTs. This class of molecules has been so far overlooked by the gene-based RNA-seq analyses available in public databases. SnoRTs can be found in the cytoplasm associated with ribosomes and selected mRNAs, together with the core proteins of the modification complex. Importantly, one snoRT, retaining the SNORA67 sequence, was shown to be bound by dyskerin (DKC1) in the cytoplasm, interact with ribosomes, and its expression levels were found significantly associated with clinical and biological features of primary breast carcinomas (4).
This Ph.D. project proposal is based on the hypothesis that, in mammals, snoRTs biogenesis could be modulated by stress conditions through changes in intron retention. We plan to study snoRT biogenesis, expression, and impact on cancer cell phenotypes, under the lens of the functional interplay between p53 and DKC1. In fact, it is well known that p53 is a stress sensor activated by a myriad of both metabolic and genotoxic stress conditions. Further, it has been reported that activated p53 can repress DKC1 in both total and polysome-associated RNAs (5). p53 can also repress fibrillarin (6), which may also regulate snoRT production (7). Also, p53 modulates both splicing and global translation through multiple mechanisms (8,9) and in the context of the cell responses to chemotherapeutic agents that are also relevant in

breast cancer therapies. Finally, based on a highly curated list of direct p53 target genes (10), nearly 20% of snoRNA-containing genes would be candidate direct p53 targets.
The established collaboration between the Inga, Dassi, and Montanaro labs and the recent findings and data available represent an ideal opportunity to develop a project for a Ph.D. candidate focusing on establishing how stress-signaling impacts snoRT production, dissecting the underlying mechanisms, and contribute to elucidating the impact of snoRTs as a novel determinant of cancer phenotypes acting at the post-transcriptional and translational level. The Ph.D. candidate will also benefit from a network of international collaborations within the newly established TRANSLACORE COST action of which all the proponents are active members.
The first core experiments of the project will be based on the MCF7 breast cancer cell line model and will include polysomal profiling (8,11) followed by RNA extraction and sequencing of both total and polysome-bound RNA on biological triplicates of treated and control cells at 2x100bp reads per sample. We will use a sufficient depth to analyze not only expression changes in transcriptome and translatome but also splicing pattern changes, identifying modulated intron retention events overlapping snoRNAs and thus potentially involved in snoRTs biogenesis. Validation will be extended to already available MCF7 shp53 cells (11) and MCF7 derivative clones knockout for p53 or expressing the hotspot p53 mutations to be developed. DKC1 depletion in these cell models will enable us to investigate dyskerin and p53 crosstalk on snoRT biogenesis. Validation experiments could be extended to other breast cancer cell lines, hormone responsive or not, such as T47D, ZR751, SKBR3, and MDA-MB-231, depending on the results obtained. In the project's final phase, experiments will target abundantly expressed snoRTs and measure the effect on cell phenotypes by functional assays. The Montanaro lab has available primary cancer cell samples for further validation, while the Dassi lab has expertise in mining public cancer datasets, including data based on long-read sequencing, to translate the findings from the planned experiments. Ideally, snoRT host genes will inform our mining of cancer datasets to investigate their prognostic significance, as recently described for the eIF4A1 snoRT (10).

References

1. Williams,G.T. et al. (2012) Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? Nat. Rev. Cancer, 12, 84–88.
2. McMahon,M., et al. (2019) A single H/ACA small nucleolar RNA mediates tumor suppression downstream of oncogenic RAS. Elife, 8. 6. Bellodi,C., et al. (2013) H/ACA small RNA dysfunctions in disease reveal key roles for noncoding RNA modifications in hematopoietic stem cell differentiation. Cell Rep., 3, 1493–1502.
3. Bellodi,C., et al. (2013) H/ACA small RNA dysfunctions in disease reveal key roles for noncoding RNA modifications in hematopoietic stem cell differentiation. Cell Rep., 3, 1493–1502.
4. Zacchini,F., et al. (2021) Human dyskerin binds to cytoplasmic H/ACA-box-containing transcripts affecting nuclear hormone receptor dependence. Genome Biology, 2022 Aug 22;23(1):177.doi: 10.1186/s13059-022-02746-3.
5. Andrysik,Z., et al. (2017) Identification of a core TP53 transcriptional program with highly distributed tumor suppressive activity. Genome Res., 27, 1645–1657.
6. Marcel,V., et al. (2013) p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. Cancer Cell, 24, 318–330.
7. Lykke-Andersen,S., et al. (2018) Box C/D snoRNP Autoregulation by a cis-Acting snoRNA in the NOP56 PremRNA. Molecular Cell, 72, 99–111.e5.
8. Rizzotto,D., et al. (2020) Nutlin-Induced Apoptosis Is Specified by a Translation Program Regulated by PCBP2 and DHX30. Cell Rep., 30, 4355–4369.e6.
9. Marcel,V., et al. (2015) p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. Oncogene, 34, 5513–5523.
10. Menendez,D., et al. (2013) Diverse stresses dramatically alter genome-wide p53 binding and transactivation landscape in human cancer cells. Nucleic Acids Res., 41, 7286–7301.
11. Zaccara,S., et al (2014) p53-directed translational control can shape and expand the universe of p53 target genes. Cell Death Differ., 21, 1522–1534.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

I piccoli RNA nucleolari (snoRNA) sono RNA non codificanti di 60-300 nucleotidi trascritti da RNA Pol II. La maggior parte degli snoRNA sono codificati (ospitati) negli introni sia di geni codificanti sia non codificanti proteine. Studi recenti hanno determinato che gli snoRNA e i loro geni ospiti sono frequentemente alterati nel cancro (1). Tuttavia, attualmente manca una comprensione meccanicistica del loro ruolo nella tumorigenesi, ad eccezione di alcuni casi. Ad esempio, è stato dimostrato che la pseudouridilazione dell'rRNA guidata dal motivo H/ACA influisce sul controllo dell'espressione genica, sulla traduzione dell'mRNA e sulla fedeltà di traduzione. È importante notare che questi meccanismi di regolazione sembrano svolgere un ruolo nella tumorigenesi, influenzando in ultima analisi l'espressione di importanti geni del cancro (2, 3). Uno studio guidato dal laboratorio del professor Montanaro ha scoperto che sequenze selezionate di snoRNA si trovano nella cellula all'interno di introni non rimossi dal processo di splicing in specifiche isoforme di mRNA espresse dai loro geni ospiti (4). Il processamento di queste isoforme puo' dare origine a trascritti che presentano al 5' le sequenze snoRNA, rappresentando una nuova classe di molecole finora trascurata dalle analisi RNA-seq basate sui geni disponibili nelle banche dati pubbliche e battezzata snoRT. Gli snoRT si trovano nel citoplasma associati ai ribosomi ed a specifici RNA messaggeri, insieme alle proteine di base del complesso di modificazione. È importante notare che una snoRT, che presenta la sequenza SNORA67, si e' vista essere legata alla discherina (DKC1) nel citoplasma, interagire con i ribosomi, ed i suoi livelli di espressione sono risultati significativamente associati a caratteristiche cliniche e biologiche di carcinomi mammari primari (4). Il progetto di dottorato si basa sull'ipotesi che, nei mammiferi, la biogenesi degli snoRT possa essere modulata da condizioni di stress attraverso cambiamenti nella ritenzione degli introni. Intendiamo studiare la biogenesi, l'espressione

e l'impatto degli snoRT su fenotipi delle cellule tumorali, sotto la lente dell'interazione funzionale tra p53 e DKC1. Infatti, è noto che p53 è un sensore di stress attivato da una miriade di condizioni di stress sia metabolici che genotossici. Inoltre, è stato riportato che la p53 attivata può reprimere DKC1 (5). La p53 può anche reprimere fibrillarina (6), un fattore di modificazione che può anch'essa regolare la produzione di snoRT (7). Inoltre, p53 modula sia lo splicing sia la traduzione cellulare attraverso molteplici meccanismi (8,9) nel contesto delle risposte cellulari agli agenti chemioterapici che sono rilevanti anche nelle terapie del cancro al seno. Infine, sulla base di un elenco particolarmente selezionato di geni bersaglio (10), quasi il 20% dei geni contenenti snoRNA sarebbero candidati bersagli diretti di p53.
La collaborazione consolidata tra i laboratori Inga, Dassi e Montanaro e le recenti scoperte ed i dati disponibili rappresentano un'opportunità ideale per sviluppare un progetto per un candidato al dottorato di ricerca che studi come le risposte cellulari a stress influenzino la produzione di snoRT, sviscerando i meccanismi sottostanti e contribuendo a chiarire l'impatto degli snoRT come nuovo determinante dei fenotipi tumorali che agiscono a livello post-trascrizionale e traduzionale. Il candidato al dottorato beneficerà anche di una rete di collaborazioni internazionali nell'ambito della nuova azione COST Translacore, di cui tutti i proponenti sono membri. I primi esperimenti del progetto si baseranno sulla linea cellulare di cancro al seno MCF7 e comprenderanno il profiling polisomiale (8,11) seguito dall'estrazione dell'RNA e dal sequenziamento dell'RNA totale e di quello legato ai polisomi, da triplicati biologici di cellule trattate e di controllo con letture di 2x100bp per campione e una profondità di sequenziamento sufficiente per analizzare non solo i cambiamenti di espressione nel trascrittoma e nel traslatoma, ma anche i cambiamenti nel pattern di splicing, identificando eventi di inclusione di introni modulati che contengono snoRNA e quindi potenzialmente coinvolti nella biogenesi degli snoRT. La validazione dei risultati verrà estesa alle cellule MCF7 shp53 già disponibili (11) e a cloni derivati da MCF7 knockout per p53 o che esprimono le mutazioni hotspot di p53 che verranno. La deplezione di DKC1 in questi modelli cellulari ci permetterà di studiare il crosstalk di dyskerin e p53 sulla biogenesi degli snoRT. Gli esperimenti di validazione potrebbero essere estesi ad altre linee cellulari di cancro al seno, ormono-responsive o meno, come T47D, ZR751, SKBR3 e MDA-MB-231, a seconda dei risultati ottenuti. Nella fase finale del progetto, gli esperimenti saranno mirati alle snoRT abbondantemente espresse e misureranno l'effetto sui fenotipi cellulari mediante saggi funzionali. Inoltre, il laboratorio del professor Montanaro ha a disposizione campioni tumorali primari per un'ulteriore validazione, mentre il laboratorio Dassi ha ampia esperienza nell'estrazione di set di dati pubblici sul cancro, compresi i dati basati sul sequenziamento long-read, per trasferire i risultati degli esperimenti valutando l'espressione ed impatto prognostico degli snoRT in datasets di campioni clinici, come recentemente descritto per la snoRT di eIF4A1 (10).

Bibliografia

1. Williams,G.T. et al. (2012) Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? Nat. Rev. Cancer, 12, 84–88.
2. McMahon,M., et al. (2019) A single H/ACA small nucleolar RNA mediates tumor suppression downstream of oncogenic RAS. Elife, 8. 6. Bellodi,C., et al. (2013) H/ACA small RNA dysfunctions in disease reveal key roles for noncoding RNA modifications in hematopoietic stem cell differentiation. Cell Rep., 3, 1493–1502.
3. Bellodi,C., et al. (2013) H/ACA small RNA dysfunctions in disease reveal key roles for noncoding RNA modifications in hematopoietic stem cell differentiation. Cell Rep., 3, 1493–1502.
4. Zacchini,F., et al. (2021) Human dyskerin binds to cytoplasmic H/ACA-box-containing transcripts affecting nuclear hormone receptor dependence. Genome Biology, 2022 Aug 22;23(1):177.doi: 10.1186/s13059-022-02746-3.
5. Andrysik,Z., et al. (2017) Identification of a core TP53 transcriptional program with highly distributed tumor suppressive activity. Genome Res., 27, 1645–1657.
6. Marcel,V., et al. (2013) p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. Cancer Cell, 24, 318–330.
7. Lykke-Andersen,S., et al. (2018) Box C/D snoRNP Autoregulation by a cis-Acting snoRNA in the NOP56 PremRNA. Molecular Cell, 72, 99–111.e5.
8. Rizzotto,D., et al. (2020) Nutlin-Induced Apoptosis Is Specified by a Translation Program Regulated by PCBP2 and DHX30. Cell Rep., 30, 4355–4369.e6.
9. Marcel,V., et al. (2015) p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. Oncogene, 34, 5513–5523.
10. Menendez,D., et al. (2013) Diverse stresses dramatically alter genome-wide p53 binding and transactivation landscape in human cancer cells. Nucleic Acids Res., 41, 7286–7301.
11. Zaccara,S., et al (2014) p53-directed translational control can shape and expand the universe of p53 target genes. Cell Death Differ., 21, 1522–1534.

Candidate's profile (skills and competencies)

A candidate with a strong interest in cancer research, translation control, non-coding RNA, and with experience in molecular and cellular biology, RNA and protein analysis. Some experience in the preparation of RNA-seq libraries and/or NGS data analysis will be a plus.

Profilo del/la candidato/a

Un candidato con un forte interesse per la ricerca sul cancro, il controllo della traduzione, gli RNA non codificanti e con esperienza in biologia molecolare e cellulare, analisi di RNA e proteine. Una certa esperienza nella preparazione di librerie RNA-seq e/o nell'analisi dei dati NGS costituirà un plus.

Project 10

Expanding the therapeutic repertoire of the newly identified kinase inhibitor CK2-TN03 for cancer treatment

Laboratory:
Laboratory of Protein Crystallography and Structure-Based Drug Design (https://www.cibio.unitn.it/504/laboratory-of-protein-crystallography-and-structure-based-drug-design)

Principal Investigator: Graziano Lolli

Synthetic description of the activity and expected research outcome

Background

CK2 is an antiapoptotic kinase overactive in various malignancies. We recently showed that CK2 inhibition dramatically affects neuroblastoma growth both in vitro and in vivo. In particular, we identified a CK2 inhibitor [1] (named CK2-TN03, Ki = 20 nM, excellent selectivity over the human kinome) showing greater cellular efficacy than silmitasertib, the only available clinical grade CK2 inhibitor with orphan status for cholangiocarcinoma and in clinical trials for medulloblastoma [2]. CK2-TN03 acts by suppressing survivin, which is amplified in all high-risk neuroblastomas. Survivin function is affected by direct inhibition of its phosphorylation by CK2; its mRNA and protein levels are reduced through CK2 regulation of the MDM2/p53 balance via AKT1 and BRD4/MYCN. Accordingly, neuroblastoma cells persistently stall in mitosis before going to apoptosis. Finally, CK2-TN03 does not affect non-cycling cells and significantly reduces tumor growth in mice xenografts without any apparent toxicity. A patent application has been filed describing CK2-TN03 and its analogues.

Aims

- Produce SAR (Structure-Activity Relationship) data to further exploit the potentiality of the chemical class.
- Expand the repertoire of malignancies targeted by CK2-TN03. We will focus on those cancers carrying chromosome 17q aberrations (survivin amplification) and in particular the most aggressive medulloblastoma type 3 and 4 and myeloid neoplasms (AML and CML).

Experimental plan

- Selection of CK2-TN03 derivatives

The high-resolution crystallographic structure of CK2 in complex with CK2-TN03 was determined in our laboratory. This was used to inform a molecular docking campaign (17136 CK2-TN03 analogues) performed by our collaborators at the University of Perugia. A selection of the top-scoring compounds in both virtual screening rounds will be obtained by on-demand synthesis from commercial providers. Depending on synthetic accessibility, chemical diversity and price, we expect to assemble a physical library of 50-100 CK2-TN03 derivatives. Predicted pharmacokinetics and BBB permeability will also be considered for the final selection of the most interesting compounds.

- Kinase assay

A classic kinase assay will be run to evaluate the compounds IC50s. This assay, already optimized in 384-wells format in the HTS Facility of our Institute, measures the ADP produced during the phosphorylation reaction through the commercial ADP-Glo kit (Promega). The screening will be first conducted in single dose, at least in duplicate. Most active hits will then be tested in dose-response, and their IC50s evaluated.

- Cellular efficacy

Cellular efficacy will be tested in neuroblastoma (NB), medulloblastoma (MB), CML and AML cell lines. Cell viability will be probed, and compounds DC50s calculated. Inhibitors will be first tested in single dose in triplicate, then in dose-response for those inducing the highest mortality rates.

- Protein crystallography

Finally, all interesting compounds deriving from the kinase and cellular assays will be co-crystallized with CK2, and the structures of those complexes determined to atomic resolution. Production and crystallization of CK2 are routinely attained in our lab and access to European synchrotrons is granted regularly. By crossing structural information with kinase and cellular activity data, a structure-activity relationship (SAR) model will be built to correlate the effects of the introduced chemical modifications to CK2 affinity and cellular efficacy (influx/efflux).

- Mechanism of action (MOA)

MOA has already been defined in NB and will be verified for the compound showing the highest cellular activity in the most susceptible MB, CML and AML cell lines. All experiments already performed on NB will be replicated by applying the same consolidated protocols to analyze (treated vs. untreated) cell cycle by FACS, cellular morphology over 24 hours by live- cell imaging, activation of caspase-dependent and independent apoptosis, alteration of the AKT1/GSK3/b-catenin and BRD4/MYC(N)/MDM2/p53 pathways and their convergence on survivin by WB and RT-PCR. All experiments will be performed with the necessary technical and biological replicates to obtain statistically meaningful results.

References

1. Cazzanelli G., Dalle Vedove A., Broso F., Burigotto M., Zasso J., Aiello G., Zonta F., Astolfi A., Barreca M.L., Ruzzene M., Tiberi L., Fava L., Quattrone A. and Lolli G. Switching off CK2-mediated activation of survivin offers new therapeutic opportunities in neuroblastoma. Cell Death Diff. Under revision.
2. Purzner, T., Purzner, J., Buckstaff, T., Cozza, G., Gholamin, S., Rusert, J. M., Hartl, T. A., Sanders, J., Conley, N., Ge, X., Langan, M., Ramaswamy, V., Ellis, L., Litzenburger, U., Bolin, S., Theruvath, J., Nitta, R., Qi, L., Li, X. N., Li, G., Taylor, M. D., Wechsler- Reya, R. J.,

Pinna, L. A., Cho, Y. J., Fuller, M. T., Elias, J.E., and Scott, M. P. (2018) Developmental phosphoproteomics identifies the kinase CK2 as a driver of Hedgehog signaling and a therapeutic target in medulloblastoma. Sci. Signal. 11, eaau5147

Candidate's profile (skills and competencies)
The candidate should have a solid background in Biochemistry and Cellular Biology, as provided by a well-reputed Master Degree course, and experience in biochemical and cellular assays.

Project 11

Bridging the gap between cold tumors and cancer immunotherapy

Colmare il divario tra i tumori freddi e l'immunoterapia del cancro

Laboratory:
Armenise-Harvard Laboratory of Cancer Biology & Genetics (https://www.cibio.unitn.it/87/armenise-harvard-laboratory-of-cancer-biology-genetics)

Principal Investigator: Andrea Lunardi

Synthetic description of the activity and expected research outcome
Background: Immuno-oncology is substantially improving the prognosis of several types of tumors. Along with treatments disengaging immunosuppressive mechanisms raised in cancer cells, the development of vaccines that enhance T- and B-cell responses against specific tumor epitopes will increase the effectiveness of therapeutic strategies harnessing anti-cancer immunity. Different from tumors with high mutation burden and profuse neoantigens presentation, prostate cancer (PCa) is primarily driven by chromosomal rearrangements, indel, chromoplexy, and aneuploidies that rarely give rise to neoepitopes, and thus, at least in principle, poorly immunogenic. However, this oversimplified postulate can be contradicted when considering the class of epitopes called Tumor Associated Antigens (TAAs), whose genesis in cancer cells depends on the deregulation of a wide range of molecular mechanisms such as atypical proteolysis, altered protein glycosylation, aberrant RNA splicing, or re- expression of silenced embryonic genes, among others.
Rationale: Identification of immunogenic TAAs will pave the way for the development of innovative immunotherapies for the treatment of PCa.
Preliminary Data: To identify TAAs exposed by prostate cancer cells expressing the transcription factor ERG (50% incidence in human PCa), we have established a keen collaboration with Dr. Ternette at the Nuffield Department of Medicine of the University of Oxford (UK). HLA-I proteins were immunoprecipitated from doxycycline-inducible ERG prostate cells in presence or not of doxycycline. Then, epitopes were eluted from the HLA-I and analyzed by mass spectrometry. The same analysis was repeated with cells treated with ionizing radiation (IR, 10 Gy), since radiotherapy can generate TAA in irradiated tumor cells. This analysis has defined a list of antigens significantly associated with ERG expression in prostate cells. This includes some well-known TAAs such as some Testis Antigens, but also intriguing new epitopes totally unexpected. Moreover, a parallel project in collaboration with Prof Romanel's group at CIBIO, will unveil aberrant splicing events dictated by ERG expression/activity in prostate cells. These data will be integrated with the MS results to fish out TAAs that are currently unidentifiable -dark matter- due to the lack of their corresponding mass spectra.
Aims of the project:
1. Immunogenicity of the most interesting TAAs will be tested in vitro by measuring IFNg expression in T cells extracted from the spleen of wild-type mice and exposed to the selected TAAs.
2. In collaboration with Prof. Grandi's group at CIBIO and BiOMViS Biotech at Toscana Life Science in Siena (Italy), immunogenic TAAs will be exploited to generate vaccines via the Outer membrane Vesicles -OMVs- platform.
3. Wild type mouse prostate organoids will be genetically engineered to model ERG alterations typical of human prostate tumors (ERG-ires-Luc/Pten-null; ERG-ires-Luc/Trp53-null; ERG-ires-Luc/Rb-null). The different lines will be validated in vitro for their malignancy and then orthotopically injected in syngeneic mice to generate prostate tumors.
4. Mouse prostate tumors developed in intact and orchiectomized (mimicking hormone therapy) mice will be characterized through histopathological studies to determine their grade, by FACS to characterize the infiltration of different components of the immune systems (B and T-cells, APC, macrophages, MSDC, T-reg), and by immunohistochemistry to define the possible expression of PDL-1/PDL-2.
5. Anti-tumor efficacy of TAA-based vaccines will be tested in vivo (see point 3) as single agents or in combination with hormone therapy (orchiectomy) and Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs, pembrolizumab or nivolumab).
6. Tetramer technology will be embraced to detect circulating T cells specific for pre-clinically effective TAAs in the blood of patients affected by ERG+ PCa and stratified according to HLA-I alleles.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

Premessa: L'immuno-oncologia sta migliorando sostanzialmente la prognosi di diversi tipi di tumore. Oltre ai trattamenti che contrastano i meccanismi immunosoppressivi messi in campo dalle cellule tumorali, lo sviluppo di vaccini che potenziano le risposte delle cellule T e B contro specifici epitopi tumorali aumenterà l'efficacia delle strategie terapeutiche basate sulla risposta immunitaria. A differenza dei tumori con elevato carico di mutazioni e abbondante presentazione di neo-antigeni, il cancro alla prostata (CaP) è caratterizzato principalmente da riarrangiamenti cromosomici, inserzioni- delezioni, cromoplexy e aneuploidie, le quali raramente danno origine a neo-epitopi e quindi, almeno in linea di principio, considerato un tumore scarsamente immunogenico. Tuttavia, questo postulato eccessivamente semplificato può essere contraddetto se si considera la classe di epitopi denominata Tumor Associated Antigens (TAA), la genesi dei quali nelle cellule tumorali dipende dalla deregolazione di un'ampia gamma di meccanismi molecolari, come la proteolisi atipica, l'alterata glicosilazione delle proteine, lo splicing aberrante dell'RNA o la espressione de novo di geni embrionali silenziati.
Razionale: L'identificazione di TAA immunogenici sarà fondamentale per lo sviluppo di immunoterapie innovative per il trattamento del carcinoma prostatico (CaP).
Dati preliminari: Per identificare specifici TAA esposti da cellule di carcinoma prostatico caratterizzate dall'espressione del fattore di trascrizione ERG (50% di incidenza nel CaP umano), abbiamo stabilito una interessante collaborazione con il Dr. Ternette del Nuffield Department of Medicine dell'Università di Oxford (UK). Le proteine HLA-I sono state immunoprecipitate da cellule prostatiche esprimenti ERG sotto il controllo di doxiciclina in presenza o meno di quest'ultima. Gli epitopi sono stati eluiti dalle proteine HLA-I e analizzati mediante spettrometria di massa. La stessa analisi è stata ripetuta con cellule trattate con radiazioni ionizzanti (IR, 10 Gy), poiché la radioterapia è noto generare TAA nelle cellule tumorali irradiate. Tale analisi ha definito un elenco di antigeni la cui esposizione è significativamente associata all'espressione di ERG nelle cellule prostatiche, tra questi troviamo TAA ben noti quali gli Antigeni del Testicolo ma anche nuovi e intriganti epitopi del tutto inaspettati. In aggiunta agli antigeni identificati, un progetto parallelo sviluppato in collaborazione con il gruppo del Prof. Romanel presso il CIBIO, svelerà eventi di RNA splicing aberrante dettati dall'espressione/attività di ERG nelle cellule prostatiche. Questi dati saranno integrati con i risultati della spettrometria di massa al fine di individuare TAA che attualmente non sono identificabili - materia oscura - a causa della mancanza dei corrispettivi spettri di massa.
Obiettivi del progetto:
1. L'immunogenicità dei TAA più interessanti sarà testata in vitro misurando l'espressione di IFNg in cellule T estratte dalla milza di topi wild-type ed esposte ai TAA selezionati;
2. In collaborazione con il gruppo del Prof. Grandi presso il CIBIO e BiOMViS Biotech presso Toscana Life Science a Siena (Italia), i TAA immunogenici saranno sfruttati per generare vaccini attraverso la piattaforma Outer Membrane Vesicles -OMVs-;
3. Organoidi prostatici di topo con fenotipo selvatico saranno ingegnerizzati geneticamente per modellare le alterazioni ERG tipiche dei tumori prostatici umani (ERG-ires-Luc/Pten-null; ERG-ires- Luc/Trp53-null; ERG-ires-Luc/Rb-null). Le diverse linee saranno validate in vitro per la loro malignità e poi iniettate ortotopicamente in topi singenici per generare tumori prostatici;
4. I tumori prostatici di topo sviluppati in topi intatti o castrati (modello di terapia ormonale) saranno caratterizzati mediante studi istopatologici per determinarne il grado, mediante FACS per caratterizzare l'infiltrazione di diverse componenti del sistema immunitario (cellule B e T, APC, macrofagi, MSDC, T- reg) e mediante immunoistochimica per definire l'eventuale espressione di PDL-1/PDL-2;
5. L'efficacia antitumorale dei vaccini basati sui TAA identificati sarà testata in modelli murini (vedi punto 3) sia come agenti singoli che in combinazione con la terapia ormonale (orchiectomia) e gli inibitori del checkpoint immunitario (ICI, pembrolizumab o nivolumab);
6. La tecnologia Tetramer sarà utilizzata per rilevare cellule T specifiche per i TAA pre-clinicamente efficaci presenti nel sangue di pazienti affetti da PCa ERG+ e stratificati in base agli alleli HLA-I..

Candidate's profile (skills and competencies)
Highly motivated candidate with previous experience in cancer research and/or immunology.

Profilo del/la candidato/a
Il candidato deve essere altamente motivato ed avere esperienza nel campo della ricerca sui tumori e/o dell'immunologia.

Project 12

Exploring the interaction landscape of germline and somatic coding variants in cancer

Laboratory:
Laboratory of Bioinformatics and Computational Genomics (https://www.cibio.unitn.it/785/laboratory-of-bioinformatics-and-computational-genomics)

Principal Investigator: Alessandro Romanel & Gianluca Lattanzi (Dip. Fisica)

Synthetic description of the activity and expected research outcome
Project

A growing number of studies support the presence of intricate links between germline (inherited) variants and somatic cancer aberrations (Carter et al. 2017; Romanel et al. 2017; Liu, Gusev, and Kraft 2023). In particular, efforts that integrate large-scale germline and somatic datasets to identify and characterize interactions between germline variants and tumor genomes are needed to explore mechanisms underpinning the evolution from normal tissue to cancer and to identify potential targets for early detection or therapeutic intervention Most studies focused so far mainly on the interaction between somatic variants and non-coding germline variants involved in gene regulation, leaving the investigation of the interaction landscape between coding germline SNPs and coding somatic point mutations largely unexplored. Based on solid preliminary data and supported by the combined expertise of the two involved labs, this project aims to:
1) Explore the association between germline coding SNP haplotypes and somatic cancer point mutations across a collection of cancer genes exploiting large-scale omics studies like The Cancer Genome Atlas (TCGA). Both pan-cancer and tumor type specific analyses will be performed;
2) Use the framework of atomistic and coarse grained molecular dynamics to investigate and characterize the extent at which germline coding SNP haplotypes alone and in combination with specific somatic point mutations affect the stability and the dynamics of protein structures and/or protein assemblies;
3) Shortlist candidate genes to explore the effectiveness of the identified SNP germline haplotypes as biomarkers for clinical/genomic variables such as overall and progression free survival, genomic instability and cancer aggressiveness. Also in this case large- scale omics datasets will be mined and used to perform the analyses.
Overall, the project will provide evidence on how the local germline context can select for specific somatic cancer mutations and pave the implementation of effective tools capable to intercept patients with increased risk of developing a more aggressive disease or more/less sensible to specific cancer drugs.

References

- Carter, Hannah, Rachel Marty, Matan Hofree, Andrew M. Gross, James Jensen, Kathleen M. Fisch, Xingyu Wu, et al. 2017. "Interaction Landscape of Inherited Polymorphisms with Somatic Events in Cancer." Cancer Discovery 7 (4): 410–23. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1045.
- Kar, Siddhartha P. 2023. "A New Frontier for Cancer Genetics: Identification of Germline– Somatic Associations." Cancer Research 83 (8): 1165–66. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-0152
- Liu, Yuxi, Alexander Gusev, and Peter Kraft. 2023. "Germline Cancer Gene Expression Quantitative Trait Loci Are Associated with Local and Global Tumor Mutations." Cancer Research 83 (8): 1191–1202. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-2624.
- Romanel, Alessandro, Sonia Garritano, Blerta Stringa, Mirjam Blattner, Davide Dalfovo, Dimple Chakravarty, David Soong, et al. 2017. "Inherited Determinants of Early Recurrent Somatic Mutations in Prostate Cancer." Nature Communications 8 (1): 48. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00046-0.

Available computational resources

Computational resources available for the project include four high-performance CIBIO servers (224 cores and 2TB of RAM), an UNITN HPC cluster composed by 2 head nodes and 25 compute nodes (500 cores, 6.4TB of RAM, 20000 CUDA cores GPU) and computational resources available in the laboratory of Bioinformatics and Computational Genomics at CIBIO that include more than 120TB of disk space, one 96-cores machine with 512GB of RAM, two 48-cores machines with 512GB of RAM, one 24-cores machine with 256GB of RAM and one workstation running an NVIDIA RTX A5000 with 8192 CUDA cores.

Candidate's profile (skills and competencies)

The ideal candidate studied bioinformatics or computational biology, has analytical and quantitative analysis skills, excellent programming skills (C, Python, Bash scripting), is knowledgeable of human genomics and cancer genomics and had experience in management and analysis of next-generation sequencing data and in the use of molecular dynamics tools

Project 13

Investigating the crosstalk between RNA modifications, RNA splicing and DNA repair to develop novel therapeutic approaches for leukaemia.

Studio sulle interazioni tra modifiche dell'RNA, aberrazioni nello splicing e riparazione del DNA, per sviluppare nuovi approcci terapeutici per le leucemie

Laboratory:

Laboratory of RNA and Disease Data (https://www.cibio.unitn.it/1349/laboratory-of-rna-and-disease-data-science)

Principal Investigator: Toma Tebaldi & Stephanie Halene (Yale School of Medicine)

Synthetic description of the activity and expected research outcome

INTRODUCTION

Somatic mutations in splicing factor genes (e.g. SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2) function as drivers of myeloid malignancies. They are generally mutually exclusive and determine clinical outcomes (Papaemmanuil et al, 2013; Saez et al, 2017). They occur in ∼10% of de novo acute myeloid leukemia (AML) and reach more than 50% in myelodysplastic syndromes (MDS) and secondary AML (Visconte et al, 2019; Yoshida et al, 2011). In particular, the SRSF2 splicing factor is mutated in ∼5% to 15% of MDS cases overall; its mutations are highly enriched in other subsets of myeloid malignancies and portend a poor prognosis.
N6-methyladenosine (m6A) is the most abundant mRNA modification and plays multiple roles, yet to be fully characterized, in RNA biology. The m6A writer METTL3 has been linked to the initiation and maintenance of leukaemia (Barbieri et al, 2017, Vu et al, 2017, Weng et al, 2018). METTL3 and alternative splicing are intricately linked: co-transcriptional METTL3-mediated m6A deposition is regulated by splicing with the Exon Junction Complex blocking potential methylation sites (Yang et al, 2022; Uzonyi et al, 2023). Manipulation of the m6A writers, erasers or readers suggests that m6A modification can also alter RNA splicing.
PRELIMINARY RESULTS
We recently found that alternative splicing secondary to SRSF2 mutations, in multiple leukaemia models and patients samples, significantly affects DNA repair pathway genes (Yang et al, 2018). Previous work confirmed that mutations in SRSF2 and other splicing factors result in enhanced R-loop formation, DNA damage response and CHK1/ATR activation and sensitivity to ATR inhibitors (Chen et al, 2018; Nguyen et al, 2018).
By performing RNA sequencing on leukaemia cell lines treated in vitro and in vivo with METTL3 inhibitors, we revealed significant alterations in RNA expression with the enrichment of DNA repair pathways, as well as splicing alterations on several transcripts that are also affected by SRSF2 mutations.
PROJECT
The PhD project will be focused on the characterization of the crosstalk between RNA modifications (m6A mediated by METTL3), alterations in splicing (driven by splicing factor mutations, in particular SRSF2), R-loop formation and DNA repair pathways, with the goal of identifying synthetic lethal circuits or other forms of molecular interactions that could be exploited in therapeutical combinations for the treatment of leukaemia.
The candidate will develop and apply computational strategies to integrate multiple omics providing information on aberrant splicing events (RNA-seq), alterations in splicing factor-RNA interactions (eCLIP-seq), m6A modifications (m6A -eCLIP), R-loop formation ( ) with bulk and single-cell approaches.
Data will be generated in leukaemia cell lines, murine models and patient-derived xenograft models (PDXs).
The candidate will benefit from a solid interdisciplinary collaboration with the laboratory of Stephanie Halene, Yale School of Medicine, where the candidate will spend part of the PhD.
The proposed project will be an ideal platform for the development of interdisciplinary skills in the PhD candidate, so that he/she will be able to cope with international research challenges.
The project is fully coherent with the Pezcoller mission to promote and support excellence in Cancer Research.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi
INTRODUZIONE
Mutazioni somatiche nei fattori di splicing (ad esempio SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2) funzionano come driver di neoplasie mieloidi. Generalmente si escludono a vicenda e sono rilevanti nel determinare l'esito clinico della malattia (Papaemmanuil et al, 2013; Saez et al, 2017). Si verificano in circa il 10% della leucemia mieloide acuta e raggiungono più del 50% nelle sindromi mielodisplastiche (MDS) (Visconte et al, 2019; Yoshida et al, 2011). In particolare, il fattore di splicing SRSF2 è mutato dal 5% al 15% dei casi di MDS in generale, ed è altamente arricchito in alcuni sottogruppi di tumori mieloidi, determinando una prognosi infausta.
L'N6-metiladenosina (m6A) è la modifica dell'mRNA più abbondante e svolge molteplici ruoli, in parte ancora da caratterizzare, nella biologia dell'RNA. METTL3, la proteina che catalizza la modifica m6A, è stata associata all'insorgere e al mantenimento delle leucemie (Barbieri et al, 2017, Vu et al, 2017, Weng et al, 2018). METTL3 e lo splicing alternativo sono strettamente collegati: la deposizione di m6A mediata da METTL3 durante la trascrizione è regolata dallo splicing; in particolare, il complesso"Exon Junction Complex" blocca potenziali siti di metilazione (Yang et al,2022; Uzonyi et al, 2023). La manipolazione di proteine, "writers", "erasers" e "readers" di m6A suggerisce una connessione tra questa metilazione e la regolazione dello splicing dell'RNA.
RISULTATI PRELIMINARI
Abbiamo recentemente scoperto che lo splicing alternativo indotto da mutazioni di SRSF2, in modelli cellulari e animali e in pazienti, influisce in modo significativo sui geni coinvolti nella riparazione del DNA (Yang et al, 2018). Un lavoro precedente ha confermato che le mutazioni in SRSF2 e altri fattori di splicing determinano una maggiore formazione di R-loops, una risposta al danno del DNA, l'attivazione della via CHK1/ATR e una maggiore sensibilità agli inibitori ATR (Chen et al, 2018; Nguyen et al, 2018).
Tramite RNA-seq condotto su linee cellulari leucemiche trattate in vitro e in vivo con inibitori di METTL3, abbiamo scoperto alterazioni significative nell'espressione di molti RNA, con arricchimento in geni coinvolti nelle vie di riparazione del DNA, nonché alterazioni di splicing su diversi trascritti che sono anche influenzati dalle mutazioni di SRSF2.
PROGETTO
Il progetto di dottorato sarà focalizzato sulla caratterizzazione delle interazioni tra i processi che regolano modificazioni dell'RNA (m6A mediate da METTL3), alterazioni nello splicing (guidate da mutazioni dei fattori di splicing, in particolare SRSF2), formazione di R-loop e

riparazione del DNA, con l'obiettivo di identificare circuiti letali sintetici o altre forme di interazioni molecolari che potrebbero essere sfruttate in combinazioni terapeutiche per il trattamento delle leucemie.
Il candidato svilupperà e applicherà strategie computazionali per integrare più omiche in grado di catturare eventi di splicing aberranti (RNA-seq), alterazioni nelle interazioni fattore di splicing- RNA (eCLIP-seq), modifiche di m6A (m6a-eCLIP), formazione di R-loop (DRIP-seq) usando sia approcci bulk che a risoluzione di singola cellula.
I dati saranno generati in linee cellulari di leucemia, modelli murini e modelli di xenotrapianto da paziente (PDX).
Il candidato beneficerà di una solida collaborazione interdisciplinare con il laboratorio di Stephanie Halene, Yale School of Medicine, dove il candidato trascorrerà parte del dottorato.
Il progetto proposto sarà una piattaforma ideale per lo sviluppo di competenze interdisciplinari in modo che il candidato sia in grado di far fronte alle sfide della ricerca internazionale.
Il progetto è pienamente coerente con la missione della Fondazione Pezcoller per promuovere e sostenere l'eccellenza nella ricerca sul cancro.

Candidate's profile (skills and competencies)
The ideal candidate is eager to learn and develop computational biology approaches for the analysis and integration of multi-omics data, to identify crosstalk between RNA and DNA regulation processes that could be exploited for antitumoral therapies.

Profilo del/la candidato/a
Il candidato ideale è desideroso di apprendere e sviluppare approcci di biologia computazionale per l'analisi e l'integrazione di dati multi-omici, per identificare interazioni tra processi di regolazione di RNA e DNA, che possono essere sfruttati per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali.

Project 14

Epigenetic mechanisms driving dormancy in metastatic cancer cells

Colmare il divario tra i tumori freddi e l'immunoterapia del cancro

Laboratory:
Laboratory of Chromatin Biology & Epigenetics (https://www.cibio.unitn.it/675/laboratory-of-chromatin-biology-epigenetics)

Principal Investigator: Alessio Zippo

Synthetic description of the activity and expected research outcome
Tumor relapse and metastasis formation rely on the capability of cancer cells to adapt to hostile microenvironments once disseminated on distal sites. Albeit its relevance, we have little biological insights related to the epigenetic mechanisms that prime cancer cells to respond to the environmental cues by the entry in a reversible condition of quiescence. The project is centered on determining the contribution of epigenetic reprogramming in promoting the cancer dormancy of disseminated tumor cells. This proposal aims to define the role of oncogenic enhancers and 3D chromatin structure in establishing transcriptional memory as an adaptive mechanism supporting cancer cell dormancy and escape from immune surveillance. The herein program uses cutting-edge technologies to solve enhancer-centered chromatin domains to gain insights into epigenetic heterogeneity and its impact on tumor progression and metastasis formation.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi
La recidiva del tumore e la formazione di metastasi si basano sulla capacità delle cellule tumorali di adattarsi a microambienti ostili una volta disseminati nei siti distali. Nonostante la sua rilevanza, abbiamo poche informazioni relative ai meccanismi epigenetici che inducono le cellule tumorali in una condizione reversibile di quiescenza, in risposta ai segnali ambientali. Il progetto è incentrato sulla determinazione del contributo della riprogrammazione epigenetica nel promuovere la quiescenza delle cellule tumorali disseminate. Questo progetto mira a definire il ruolo degli enhancers oncogeni e della struttura 3D della cromatina nello stabilire la memoria trascrizionale come meccanismo adattativo che supporta la quiescenza delle cellule tumorali, e sfuggire alla sorveglianza immunitaria. Il presente programma utilizza tecnologie all'avanguardia per risolvere i domini della cromatina centrati sugli enhancers per ottenere informazioni sull'eterogeneità epigenetica e sul suo impatto sulla progressione del tumore e sulla formazione di metastasi.

Candidate's profile (skills and competencies)
We are seeking highly motivated and enthusiastic candidates willing to challenge an innovative project by adopting a pro-active attitude and an analytical approach. The candidate should have a vivid interest in epigenome profiling and CRISPR-based functional screening to address

chromatin changes in cancer cells. The successful candidate will be involved in an interdisciplinary project with research at the crossroads between cancer biology, chromatin biology, and cell biology. The candidate should have a strong interest in multidisciplinary collaboration. Given the international framework, the candidate should also have good communication skills and a team-oriented working attitude.

Profilo del/la candidato/a

Cerchiamo candidati altamente motivati ed entusiasti disposti a sfidare un progetto innovativo adottando un atteggiamento proattivo e un approccio analitico. Il candidato dovrebbe avere un vivo interesse per lo studio dell'epigenoma e lo screening funzionale basato su CRISPR per determinare i cambiamenti della cromatina nelle cellule tumorali. Il candidato prescelto sarà coinvolto in un progetto interdisciplinare che coinvolgerà lo studio dell'oncologia, la biologia della cromatina e cellulare. Il candidato dovrebbe avere un forte interesse per la collaborazione multidisciplinare. Dato il quadro internazionale, il candidato dovrebbe anche avere buone capacità di comunicazione e un'attitudine al lavoro di gruppo.