PIANO ASSEGNO AUTOFINANZIATO

**Proponente**: **Prof. Giovanni Perini**

**Durata: 1 anno, rinnovabile**

**Titolo: *Dissezione funzionale dell’asse MYCN-E2F3 nel neuroblastoma***

**Introduzione**.
Il neuroblastoma metastatico è un tumore particolarmente aggressivo che deriva dalla cresta neurale e che si presenta tipicamente come una grande massa addominale lungo la colonna vertebrale o nella porzione midollare della ghiandola surrenale. E’ altresì caratterizzato dall’amplificazione dell’oncogene MYCN presente in circa il 50% dei casi ad alto rischio [3]. La sovra-espressione specifica di MYCN nella cresta neurale è sufficiente a guidare l’insorgenza e la progressione del tumore in vertebrati come il topo e lo zebrafish [6, 7]. In particolare, l'amplificazione di MYCN rappresenta al momento il fattore prognostico più importante e tristemente negativo per la diagnosi del neuroblastoma. Come ormai noto da una letteratura scientifica molto ricca, i fattori MYC (c-MYC e MYCN) sono potenti fattori di trascrizione che, formando etero-dimeri con la proteina partner MAX, promuovono la trascrizione legandosi a specifiche sequenze di DNA dette E-Box presenti nei promotori genici. [4, 5].

Una recente analisi, svolta su 11000 tumori di varia origine e natura e che rappresentano 33 diverse neoplasie adulte, ha mostrato che l’amplificazione di oncogeni della famiglia MYC (MYC, MYCN o L-MYC) è presente nel 28% di tutti i tumori noti [1]. L'amplificazione dei geni MYC(N) nella cellula tumorale implica la sovra-espressione delle rispettive proteine, modificando inevitabilmente la distribuzione del complesso MYC(N)/MAX sul DNA genomico. Inoltre, molti studi, tra cui anche alcuni condotti nel nostro laboratorio dimostrano che MYCN esercita la sua attività globale, interagendo fisicamente con una pletora di altri fattori trascrizionali e regolatori della cromatina influenzando così uno o più livelli del processo trascrizionale (inizio, allungamento, attivazione o repressione/silenziamento).

Tra questi interlocutori, E2F3 ha attirato la nostra attenzione in quanto pensiamo esso possa stabilire un asse funzionale con MYCN per stabilire almeno in parte il programma oncogenico. Tre principali informazioni rafforzano la nostra ipotesi. Innanzitutto, E2F3 è un potente marcatore di esito clinico in diverse coorti di pazienti con neuroblastoma con un profilo molto simile a quello di MYCN. In secondo luogo, diversi i risultati preliminari del nostro laboratorio indicano che E2F3 è richiesto per l'espressione di MYCN. Terzo, l’impiego di tecniche di mappatura in vivo di interazioni proteina-proteina (proximity biotinylation) ci dicono che E2F3 è un diretto interattore di MYC(N). E2F3 è un fattore trascrizionale appartenente alla famiglia E2F ed è coinvolto nella progressione del ciclo cellulare [10]. Come per la maggior parte dei fattori E2F, la funzione E2F3 è controllata dalla proteina Retinoblastoma (pRB) e da Chinasi Ciclino-dipendenti (CDKs) che hanno lo scopo di regolare la trascrizione dei geni del ciclo cellulare [10]. E’ interessante notare che in circa il 10% percento dei casi di Retinoblastoma, tumore pediatrico della retina, noto per essere causato da mutazioni in RB1, MYCN è amplificato in un contesto in cui RB1 non è mutato. Anche nei neuroblastomi con MYCN amplificato RB1 è selvatico nel 97% dei casi analizzati.

Qui, presentiamo l'ipotesi che, nel neuroblastoma, l'oncoproteina MYCN possa interagire fisicamente con E2F3 superando lo stretto controllo esercitato da RB1 sull'attività di E2F3. Questo nuovo complesso proteico sembra originarsi in presenza di alti livelli di MYCN e indipendentemente dallo stato di RB1 della cellula tumorale. Inoltre, il complesso sembra riconoscere selettivamente un insieme specifico di geni la cui alterata espressione favorisce la promozione dell'inizio e/o progressione del tumore.

Sulla base di questi risultati preliminari, desideriamo ricostruire le dinamiche della formazione del complesso MYCN/E2F3 e in particolare come quest’ultimo impatta sulla biologia dei tumori che presentano l’amplificazione di MYCN, con la prospettiva di identificare nuovi bersagli terapeutici per lo sviluppo di più efficaci protocolli di cura.

**Piano esecutivo e di Formazione**

Per rispondere alle domande di cui sopra, nel contesto di un progetto di ricerca quinquennale finanziato dalla Associazione per la Ricerca sul Cancro (IG - AIRC n. 24341), l’assegnista si occuperà di due obiettivi principali. 1) definire i determinanti molecolari richiesti per la formazione del complesso MYCN/E2F3 in neuroblastoma. 2) determinare se e come il dosaggio di MYCN modifichi l'occupazione di E2F3 sui promotori genici e come questo fatto a sua volta cambia l'output trascrizionale nel neuroblastoma. A tale scopo l’assegnista utilizzerà tecnologie molecolari all’avanguardia che contemplano: a) la purificazione di complessi proteici attraverso cromatografia per affinità, co-immunoprecipitazione e GST-pull down; b) Utilizzo della tecnica di “Proximity Biotinylation per la mappatura in vivo di interazioni proteina-proteina. c) Impiego di tecniche NGS, quali RNA-seq, ChIP.seq e SLAM-seq al fine di capire come MYCN modifichi l’”occupancy” di E2F3 sul genoma in vivo e per identificare i geni target la cui trascrizione risente della formazione di tale complesso.

L’assegnista avrà la possibilità di interagire con ricercatori senior del laboratorio che hanno ampia esperienza con le metodologie sopra descritte e si avvarrà anche di una recente e importante collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Linda Penn dell’Università di Toronto che ha pionieristicamente messo a punto le tecniche di mappatura in vivo delle interazioni tra proteine in cellule di mammifero.

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

**Fondi su cui graverà l'assegno di ricerca.** Il presente assegno sarà interamente autofinanziato usando fondi del grant IG - AIRC n. 24341 di cui il proponente è titolare.

Bibliografia relativa al progetto

*[1] Schaub FX, Dhankani V, Berger AC, et al. Pan-cancer Alterations of the MYC. Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. Cell Syst. 2018; 6(3):282-300.*

*[2] Kalkat M, De Melo J, Hickman KA, et al. MYC Deregulation in Primary Human Cancers.*

*Genes (Basel). 2017; 8(6).*

*[3] Schwab M MYCN in neuronal tumours. Cancer Lett. 2004; 204(2):179-87.*

*[4] Zimmerman MW, Liu Y, He S, et al. MYC Drives a Subset of High-Risk*

*Pediatric Neuroblastomas and Is Activated through Mechanisms Including Enhancer Hijacking and Focal Enhancer Amplification. Cancer Discov. 2018;8(3):320-35.*

*[5] Nie Z, Hu G, Wei G, et al. c- Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. Cell. 2012;151(1):68-79.*

*[6] Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, et al. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. EMBO J. 1997; 16(11):2985-95.*

*[7] Zhu S, Look TA. Neuroblastoma and Its Zebrafish Model. Adv Exp Med Biol. 2016; 916:451-78.*

*[8] Rajbhandari P, Lopez G, Capdevila C, et al. Cross-Cohort Analysis Identifies a TEAD4-MYCN Positive Feedback Loop as the Core Regulatory Element of High-Risk Neuroblastoma. A. Cancer Discov. 2018 May;8(5):582-599.*

*[9] Kalkat M, Resetca D, Lourenco et al.. MYC Protein Interactome Profiling Reveals Functionally Distinct Regions that Cooperate to Drive Tumorigenesis Mol Cell. 2018 Dec 6;72(5):836-848.e7.*

*[10] Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. Nat Rev Cancer. 2009 Nov;9(11):785-97.*