**PROGETTO DI RICERCA**

**Study of the role of citrate metabolism in the development of bone metastases from prostate carcinoma using organ-on-a-chip models and by the analysis of biological samples**

*(Studio del ruolo del metabolismo del citrato nello sviluppo delle metastasi ossee da carcinoma alla postata attraverso l’impiego di modelli organ-on-a-chip e l’analisi di campioni biologici)*

**Tutor: Prof. Sofia Avnet (DIBINEM, Alma Mater Studiorum Università di Bologna)**

*Premessa:* L’attività di ricerca sarà svolta presso l’Istituto Ortopedico Rizzoli IRCCS (IOR, Bologna) e nell’ambito del progetto AIRC IG 2021 – PROBONE - “Citrate-mediated metabolic coupling: a target for advanced PROstate cancer in BONE”

**Descrizione breve attività di ricerca**

Il progetto sarà incentrato sul ruolo del metabolismo del citrato nel microambiente della metastasi ossea (BM) da carcinoma prostatico (PCa). Sarà impiegato un modello 3D bone-on-a-chip per approfondire i meccanismi del tropismo delle cellule tumorali verso l’osso, della simbiosi metabolica fra cellule di PCa e cellule ossee, nel sito di metastasi, e valutarne l’impatto sull’attrazione delle cellule di PCa a distanza, e la loro proliferazione e progressione nell’osso. Inoltre, verrà messa a punto l’analisi dell’espressione di proteine associate al differenziamento osseo e al metabolismo del citrato tramite Western Blot capillare al fine di caratterizzare nel dettaglio le interazioni tumore-stroma alla base della progressione della malattia. Isolando le cellule tumorali circolanti dai pazienti, sarà infine studiata l’associazione tra la presenza di alterazioni nell’espressione di geni associati al metabolismo del citrato e la progressione della malattia.

*The project will investigate the role of citrate metabolism in the microenvironment of bone metastasis (BM) from prostate carcinoma (PCa). To this end, a 3D bone-on-a-chip model will be employed to investigate the mechanisms underlying the osteotropism of tumor cells, to verify the existence of a metabolic symbiosis between PCa cells and bone cells residing at the site of metastasis, and to assess its impact on recruitment, proliferation and progression of PCa cells in bone. Furthermore,* *the analysis of the expression of proteins associated with bone differentiation and citrate metabolism will be performed by Western Blot, in capillary electrophoresis in order to characterize in detail the tumor-stroma interactions underlying disease progression. Finally, the association between citrate metabolism in tumor cells and disease progression will be investigated in circulating tumor cells isolated from BM patients.*

**Introduzione**

Il PCa è il secondo tipo di cancro più comune negli uomini dei paesi occidentali [1]. Il trattamento prevede la rimozione chirurgica del tumore primario con o senza radioterapia, seguita da chemioterapia e/o terapia di deprivazione androgenica (ADT) come adiuvante. Nonostante l’efficacia di quest’ultima nei pazienti con malattia localizzata (fino al 100% di sopravvivenza a 5 anni), dopo la terapia iniziale circa il 20-30% dei pazienti sviluppa una recidiva o una malattia metastatica resistente ai farmaci e va incontro ad elevati tassi di morbilità e mortalità, con una sopravvivenza a 5 anni inferiore al 30% [1].

Le cellule di carcinoma prostatico hanno un elevato tropismo nei confronti dell’osso, tanto che l’80-90% dei pazienti resistenti all’ADT sviluppano metastasi ossee [2-4], con conseguenze cliniche devastanti [5]. Tale tropismo potrebbe dipendere dal fatto che il microambiente prostatico e quello osseo condividono alcuni metaboliti essenziali per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali, quali il citrato e lo zinco (Zn). Infatti, è noto che sia le cellule epiteliali prostatiche che quelle dell’osso, in particolare gli osteoblasti, siano in grado di secernere citrato [6,7] e che lo Zn ne attivi il rilascio da parte di queste cellule per mezzo dell’inibizione dell’m-aconitasi [8]. Quest’ultimo, infatti, è un enzima adibito all’ossidazione del citrato a isocitrato e, se bloccato nella sua attività, porta ad un accumulo intracellulare di citrato ed una conseguente riduzione della produzione di ATP attraverso il ciclo di Krebs [9]. Al contrario delle cellule non trasformate, le cellule di carcinoma prostatico, convertono il piruvato derivante dalla glicolisi a citrato, per poi servirsi di quest’ultimo come substrato energetico da utilizzare nel ciclo di Krebs per produrre ATP ed altre sostanze indispensabili al proprio sostentamento, fra cui gli acidi grassi [10]. Esse, infatti, rispetto alle cellule non trasformate, perdono la capacità di accumulare Zn, con conseguente isomerizzazione del citrato tramite m-aconitasi e ridotto accumulo e produzione di citrato che viene dunque utilizzato nel ciclo di Krebs.

Nell'osso, il profilo glicolitico delle cellule di PCa metastatizzanti potrebbe essere ulteriormente amplificato dalla presenza locale di ipossia fisiologica [11,12]. La ridotta tensione di ossigeno potrebbe, a sua volta, indurre le cellule di PCa a secernere notevoli quantità di lattato attraverso il noto trasportatore monocarbossilato 4 (MCT4) [13,14]. Il lattato così secreto potrebbe essere internalizzato dalle cellule dell’osso per essere convertito, in presenza di Zn, a citrato ed essere infine rilasciato nello spazio extracellulare. Il citrato sarebbe così reso disponibile per alimentare un circolo metabolico vizioso fra tumore e stroma dell’osso. Allo stesso tempo, l'assorbimento di Zn da parte delle cellule osteogeniche adiacenti che condividono con il tumore lo stesso microambiente potrebbe evitare l'inibizione mediata dallo Zn della m-aconitasi nelle cellule di PCa, sostenendo così la loro attività metabolica basata sulla fosforilazione ossidativa.

**Obiettivo dello studio**

Nell’ambito dello sviluppo di questo progetto si intende caratterizzare il comportamento metabolico delle cellule di PCa nel contesto del microambiente dell’osso, concentrandosi particolarmente sul metabolismo del citrato.

Gli obiettivi specifici del progetto sono:

1) Messa a punto di un modello 3D di microfluidica bone-on-a-chip vascolarizzato per studiare l’insediamento delle cellule di carcinoma alla prostata nell’osso, in presenza o assenza di lattato e citrato;

2) Messa a punto dell’analisi dell’espressione di proteine associate al differenziamento osseo e al metabolismo del citrato in modelli cellulari miniaturizzati tramite Western Blot in elettroforesi capillare;

3) Raccolta e processazione di campioni biologici (siero e osso) isolati da pazienti con carcinoma prostatico, nell’ambito dello studio osservazionale previsto dal progetto, per misurare biomarcatori associati al metabolismo del citrato, compresa l’analisi della presenza di mutazioni di geni associati al metabolismo del citrato in cellule di carcinoma prostatico circolanti, isolate tramite sistema Parsortix e DEPArray.

**References**

[1] Siegel RL, et al. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin 2021;71:7-33. 33433946

[2] Gao Y, et al. Metastasis Organotropism: Redefining the Congenial Soil. Dev Cell 2019;49:375-91. 31063756

[3] Gandaglia G, et al. Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. Prostate 2014;74:210-6. 24132735

[4] Huang JF, et al. Incidence of patients with bone metastases at diagnosis of solid tumors in adults: a large population-based study. Ann Transl Med 2020;8:482. 32395526

[5] Roghmann F, et al. The burden of skeletal-related events in patients with prostate cancer and bone metastasis. Urol Oncol 2015;33:17 e9- e8. 25443265

[6] Kline EE, et al. Citrate concentrations in human seminal fluid and expressed prostatic fluid determined via 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy outperform prostate specific antigen in prostate cancer detection. J Urol 2006;176:2274-9. 17070311

[7] Costello LC, et al. The status of citrate in the hydroxyapatite/collagen complex of bone; and Its role in bone formation. J Regen Med Tissue Eng 2014;3:4. 25745562

[8] Cutruzzola F, et al. Glucose Metabolism in the Progression of Prostate Cancer. Front Physiol 2017;8:97. 28270771

[9] Villasenor A, et al. Metabolomics reveals citric acid secretion in mechanically-stimulated osteocytes is inhibited by high glucose. Sci Rep 2019;9:2295. 30783155

[10] Costello LC, Franklin RB. Prostatic fluid electrolyte composition for the screening of prostate cancer: a potential solution to a major problem. Prostate Cancer Prostatic Dis 2009;12:17-24. 18591961

[11] Arnett TR. Acidosis, hypoxia and bone. Arch Biochem Biophys 2010;503:103-9. 20655868

[12] Spencer JA, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. Nature 2014;508:269-73. 24590072

[13] Pertega-Gomes N, et al. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. BMC Cancer 2011;11:312. 21787388

[14] Ullah MS, et al. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. J Biol Chem 2006;281:9030-7. 16452478

**Pubblicazioni del proponente (2011-2022)**

[1] S. Avnet, R. Pallotta, F. Perut, N. Baldini, M.G. Pittis, A. Saponari, E. Lucarelli, B. Dozza, T. Greggi, N.M. Maraldi, C. Capanni, E. Mattioli, M. Columbaro, G. Lattanzi, Osteoblasts from a mandibuloacral dysplasia patient induce human blood precursors to differentiate into active osteoclasts, Biochim Biophys Acta, 1812 (2011) 711-718.

[2] S. Avnet, M. Salerno, G. Quacquaruccio, D. Granchi, A. Giunti, N. Baldini, IGF2 derived from SH-SY5Y neuroblastoma cells induces the osteoclastogenesis of human monocytic precursors, Exp Cell Res, 317 (2011) 2147-2158.

[3] S. Avnet, F. Perut, M. Salerno, L. Sciacca, N. Baldini, Insulin receptor isoforms are differently expressed during human osteoblastogenesis, Differentiation, 83 (2012) 242-248.

[4] E. Cenni, S. Avnet, D. Granchi, C. Fotia, M. Salerno, D. Micieli, M.G. Sarpietro, R. Pignatello, F. Castelli, N. Baldini, The effect of poly(d,l-lactide-co-glycolide)-alendronate conjugate nanoparticles on human osteoclast precursors, J Biomater Sci Polym Ed, 23 (2012) 1285-1300.

[5] C. Fotia, S. Avnet, D. Granchi, N. Baldini, The natural compound Alizarin as an osteotropic drug for the treatment of bone tumors, J Orthop Res, 30 (2012) 1486-1492.

[6] O. Bortolini, G. Fantin, M. Fogagnolo, S. Rossetti, L. Maiuolo, G. Di Pompo, S. Avnet, D. Granchi, Synthesis, characterization and biological activity of hydroxyl-bisphosphonic analogs of bile acids, Eur J Med Chem, 52 (2012) 221-9.

[7] M. Columbaro, E. Mattioli, N.M. Maraldi, M. Ortolani, L. Gasparini, M.R. D'Apice, D. Postorivo, A.M. Nardone, S. Avnet, P. Cortelli, R. Liguori, G. Lattanzi, Oct-1 recruitment to the nuclear envelope in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy, Biochim Biophys Acta, 1832 (2013) 411-20.

[8] S. Avnet, G. Di Pompo, S. Lemma, M. Salerno, F. Perut, G. Bonuccelli, D. Granchi, N. Zini, N. Baldini, V-ATPase is a candidate therapeutic target for Ewing sarcoma, Biochim Biophys Acta, 1832 (2013) 1105-1116.

[9] S. Avnet, M. Salerno, N. Zini, M. Alberghini, D. Gibellini, N. Baldini, Sustained autocrine induction and impaired negative feedback of osteoclastogenesis in CD14(+) cells of giant cell tumor of bone, Am J Pathol, 182 (2013) 1357-1366.

[10] D. Granchi, A. Scarso, G. Bianchini, A. Chiminazzo, A. Minto, P. Sgarbossa, R.A. Michelin, G. Di Pompo, S. Avnet, G. Strukul, Low toxicity and unprecedented anti-osteoclast activity of a simple sulfur-containing gem-bisphosphonate: a comparative study, Eur J Med Chem, 65 (2013) 448-55.

[11] S. Ferrari, F. Perut, F. Fagioli, A. Brach Del Prever, C. Meazza, A. Parafioriti, P. Picci, M. Gambarotti, S. Avnet, N. Baldini, S. Fais, Proton pump inhibitor chemosensitization in human osteosarcoma: from the bench to the patients' bed, J Transl Med, 11 (2013) 268.

[12] M. Salerno, S. Avnet, G. Bonuccelli, A. Eramo, R. De Maria, M. Gambarotti, G. Gamberi, N. Baldini, Sphere-forming cell subsets with cancer stem cell properties in human musculoskeletal sarcomas, Int J Oncol, 43 (2013) 95-102.

[13] G. Bonuccelli, S. Avnet, G. Grisendi, M. Salerno, D. Granchi, M. Dominici, K. Kusuzaki, N. Baldini, Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells, Oncotarget, 5 (2014) 7575-7588.

[14] F. Perut, S. Avnet, C. Fotia, S.R. Baglio, M. Salerno, S. Hosogi, K. Kusuzaki, N. Baldini, V-ATPase as an effective therapeutic target for sarcomas, Exp Cell Res, 320 (2014) 21-32.

[15] M. Salerno, S. Avnet, G. Bonuccelli, S. Hosogi, D. Granchi, N. Baldini, Impairment of lysosomal activity as a therapeutic modality targeting cancer stem cells of embryonal rhabdomyosarcoma cell line RD, PLoS One, 9 (2014) e110340.

[16] E.P. Spugnini, P. Sonveaux, C. Stock, M. Perez-Sayans, A. De Milito, S. Avnet, A.G. Garcìa, S. Harguindey, S. Fais, Proton channels and exchangers in cancer, Biochim Biophys Acta, 1848 (2015) 2715-26.

[17] C. Fotia, S. Avnet, K. Kusuzaki, L. Roncuzzi, N. Baldini, Acridine Orange is an Effective Anti-Cancer Drug that Affects Mitochondrial Function in Osteosarcoma Cells, Curr Pharm Des, 21 (2015) 4088-4094.

[18] F. Perut, F. Carta, G. Bonuccelli, G. Grisendi, G. Di Pompo, S. Avnet, F.V. Sbrana, S. Hosogi, M. Dominici, K. Kusuzaki, C.T. Supuran, N. Baldini, Carbonic anhydrase IX inhibition is an effective strategy for osteosarcoma treatment, Expert Opin Ther Targets, 19 (2015) 1593-1605.

[19] G. Di Pompo, M. Salerno, D. Rotili, S. Valente, C. Zwergel, S. Avnet, G. Lattanzi, N. Baldini, A. Mai, Novel histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in sarcoma cancer stem cells, J Med Chem, 58 (2015) 4073-4079.

[20] C. Evangelisti, P. Bernasconi, P. Cavalcante, C. Cappelletti, M.R. D'Apice, P. Sbraccia, G. Novelli, S. Prencipe, S. Lemma, N. Baldini, S. Avnet, S. Squarzoni, A.M. Martelli, G. Lattanzi, Modulation of TGFbeta 2 levels by lamin A in U2-OS osteoblast-like cells: understanding the osteolytic process triggered by altered lamins, Oncotarget, 6 (2015) 7424-7437.

[21] S. Avnet, M. Cortini, Role of Pericellular Matrix in the Regulation of Cancer Stemness, Stem Cell Rev Rep, 12 (2016) 464-75.

[22] S. Avnet, S. Lemma, M. Cortini, P. Pellegrini, F. Perut, N. Zini, K. Kusuzaki, T. Chano, G. Grisendi, M. Dominici, A. De Milito, N. Baldini, Altered pH gradient at the plasma membrane of osteosarcoma cells is a key mechanism of drug resistance, Oncotarget, 7 (2016) 63408-63423.

[23] T. Chano, S. Avnet, K. Kusuzaki, G. Bonuccelli, P. Sonveaux, D. Rotili, A. Mai, N. Baldini, Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells, Am J Cancer Res, 6 (2016) 859-875.

[24] G. Ciapetti, G. Di Pompo, S. Avnet, D. Martini, A. Diez-Escudero, E.B. Montufar, M.P. Ginebra, N. Baldini, Osteoclast differentiation from human blood precursors on biomimetic calcium-phosphate substrates, Acta Biomater, 50 (2017) 102-113.

[25] J. Viklund, S. Avnet, A. De Milito, Pathobiology and Therapeutic Implications of Tumor Acidosis, Curr Med Chem, 24 (2017) 2827-2845.

[26] M. Cortini, A. Massa, S. Avnet, G. Bonuccelli, N. Baldini, Tumor-Activated Mesenchymal Stromal Cells Promote Osteosarcoma Stemness and Migratory Potential via IL-6 Secretion, PLoS One, 11 (2016) e0166500.

[27] S. Lemma, S. Avnet, M. Salerno, T. Chano, N. Baldini, Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells, PLoS One, 11 (2016) e0149481.

[28] S. Lemma, M. Sboarina, P.E. Porporato, N. Zini, P. Sonveaux, G. Di Pompo, N. Baldini, S. Avnet, Energy metabolism in osteoclast formation and activity, Int J Biochem Cell Biol, 79 (2016) 168-180.

[29] F.V. Sbrana, M. Cortini, S. Avnet, F. Perut, M. Columbaro, A. De Milito, N. Baldini, The Role of Autophagy in the Maintenance of Stemness and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, Stem Cell Rev, 12 (2016) 621-633.

[30] S. Avnet, G. Di Pompo, T. Chano, C. Errani, A. Ibrahim-Hashim, R.J. Gillies, D.M. Donati, N. Baldini, Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF-kappaB activation, Int J Cancer, 140 (2017) 1331-1345.

[31] N. Baldini, A. De Milito, O. Feron, R.J. Gillies, C. Michiels, A.M. Otto, S. Pastorekova, S.F. Pedersen, P.E. Porporato, P. Sonveaux, C.T. Supuran, S. Avnet, Annual Meeting of the International Society of Cancer Metabolism (ISCaM): Metabolic Networks in Cancer, Front Pharmacol, 8 (2017) 411.

[32] M. Cortini, S. Avnet, N. Baldini, Mesenchymal stroma: Role in osteosarcoma progression, Cancer Lett, 405 (2017) 90-99.

[33] G. Di Pompo, S. Lemma, L. Canti, N. Rucci, M. Ponzetti, C. Errani, D.M. Donati, S. Russell, R. Gillies, T. Chano, N. Baldini, S. Avnet, Intratumoral acidosis fosters cancer-induced bone pain through the activation of the mesenchymal tumor-associated stroma in bone metastasis from breast carcinoma, Oncotarget, 8 (2017) 54478-54496.

[34] I. Kolosenko, S. Avnet, N. Baldini, J. Viklund, A. De Milito, Therapeutic implications of tumor interstitial acidification, Semin Cancer Biol, 43 (2017) 119-133.

[35] S. Lemma, G. Di Pompo, P.E. Porporato, M. Sboarina, S. Russell, R.J. Gillies, N. Baldini, P. Sonveaux, S. Avnet, MDA-MB-231 breast cancer cells fuel osteoclast metabolism and activity: A new rationale for the pathogenesis of osteolytic bone metastases, Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 1863 (2017) 3254-3264.

[36] A. Massa, F. Perut, T. Chano, A. Woloszyk, T.A. Mitsiadis, S. Avnet, N. Baldini, The effect of extracellular acidosis on the behaviour of mesenchymal stem cells in vitro, Eur Cell Mater, 33 (2017) 252-267.

[37] S. Avnet, N. Baldini, L. Brisson, A. De Milito, A.M. Otto, S. Pastorekova, P.E. Porporato, G. Szabadkai, P. Sonveaux, Annual Meeting of the International Society of Cancer Metabolism (ISCaM): Cancer Metabolism, Front Oncol, 8 (2018) 329.

[38] N. Baldini, S. Avnet, The Effects of Systemic and Local Acidosis on Insulin Resistance and Signaling, Int J Mol Sci, 20 (2018) 126.

[39] N. Baldini, E. Torreggiani, L. Roncuzzi, F. Perut, N. Zini, S. Avnet, Exosome-like Nanovesicles Isolated from Citrus limon L. Exert Antioxidative Effect, Curr Pharm Biotechnol, 19 (2018) 877-885.

[40] T. Chano, H. Kita, S. Avnet, S. Lemma, N. Baldini, Prominent role of RAB39A-RXRB axis in cancer development and stemness, Oncotarget, 9 (2018) 9852-9866.

[41] S. Lemma, S. Avnet, M.J. Meade, T. Chano, N. Baldini, Validation of Suitable Housekeeping Genes for the Normalization of mRNA Expression for Studying Tumor Acidosis, Int J Mol Sci, 19 (2018) 2930.

[42] F. Perut, F.V. Sbrana, S. Avnet, A. De Milito, N. Baldini, Spheroid-based 3D cell cultures identify salinomycin as a promising drug for the treatment of chondrosarcoma, J Orthop Res, (2018).

[43] S. Avnet, G. Di Pompo, S. Lemma, N. Baldini, Cause and effect of microenvironmental acidosis on bone metastases, Cancer Metastasis Rev, 38 (2019) 133-147.

[44] S. Avnet, S. Lemma, M. Cortini, G. Di Pompo, F. Perut, N. Baldini, Pre-clinical Models for Studying the Interaction Between Mesenchymal Stromal Cells and Cancer Cells and the Induction of Stemness, Front Oncol, 9 (2019) 305.

[45] S. Avnet, T. Chano, A. Massa, G. Bonuccelli, S. Lemma, L. Falzetti, G. Grisendi, M. Dominici, N. Baldini, Acid microenvironment promotes cell survival of human bone sarcoma through the activation of cIAP proteins and NF-κB pathway, Am J Cancer Res, 9 (2019) 1127-1144.

[46] M. Cortini, N. Baldini, S. Avnet, New Advances in the Study of Bone Tumors: A Lesson From the 3D Environment, Front Physiol, 10 (2019) 814.

[47] M. Martano, E. Morello, S. Avnet, F. Costa, F. Sammartano, K. Kusuzaki, N. Baldini, Photodynamic Surgery for Feline Injection-Site Sarcoma, Biomed Res Int, 2019 (2019) 8275935.

[48] S. Avnet, N. Baldini, L. Brisson, S.F. Pedersen, P.E. Porporato, P. Sonveaux, G. Szabadkai, S. Pastorekova, Annual Meeting of the International Society of Cancer Metabolism (ISCaM): Metabolic Adaptations and Targets in Cancer, Front Oncol, 9 (2019) 1332.

[49] S. Avnet, S. Lemma, C. Errani, L. Falzetti, E. Panza, M. Columbaro, C. Nanni, N. Baldini. Benign albeit glycolytic: MCT4 expression and lactate release in giant cell tumour of bone, Bone, 134 (2020) 115302.

[50] D. Nejman, I. Livyatan, G. Fuks, N. Gavert, Y. Zwang, L.T. Geller, A. Rotter-Maskowitz, R. Weiser, G. Mallel, E. Gigi, A. Meltser, G.M. Douglas, I. Kamer, V. Gopalakrishnan, T. Dadosh, S. Levin-Zaidman, S. Avnet, T. Atlan, Z.A. Cooper, R. Arora, A.P. Cogdill, M.A.W. Khan, G. Ologun, Y. Bussi, A. Weinberger, M. Lotan-Pompan, O. Golani, G. Perry, M. Rokah, K. Bahar-Shany, E.A. Rozeman, C.U. Blank, A. Ronai, R. Shaoul, A. Amit, T. Dorfman, R. Kremer, Z.R. Cohen, S. Harnof, T. Siegal, E. Yehuda-Shnaidman, E.N. Gal-Yam, H. Shapira, N. Baldini, M.G.I. Langille, A. Ben-Nun, B. Kaufman, A. Nissan, T. Golan, M. Dadiani, K. Levanon, J. Bar, S. Yust-Katz, I. Barshack, D.S. Peeper, D.J. Raz, E. Segal, J.A. Wargo, J. Sandbank, N. Shental, R. Straussman, The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria, Science, 368 (2020) 973-980.

[51] F. Costa, L. Falzetti, N. Baldini, S. Avnet, The Microfluidic Trainer: Design, Fabrication and Validation of a Tool for Testing and Improving Manual Skills. Micromachines (Basel), 11 (2020) 872.

[52] T.G. Grünewald, M. Alonso, S. Avnet, A. Banito, S. Burdach, F. Cidre-Aranaz, G. Di Pompo, M. Distel, H. Dorado-Garcia, J. Garcia-Castro, L. González-González, A.E. Grigoriadis, M. Kasan, C. Koelsche, M. Krumbholz, F. Lecanda, S. Lemma, D.L. Longo, C. Madrigal-Esquivel, Á. Morales-Molina, J. Musa, S. Ohmura, B. Ory, M. Pereira-Silva, F. Perut, R. Rodriguez, C. Seeling, N. Al Shaaili, S. Shaabani, K. Shiavone, S. Sinha, E.M. Tomazou, M. Trautmann, M. Vela, Y.M. Versleijen-Jonkers, J. Visgauss, M. Zalacain, S.J. Schober, A. Lissat, W.R. English, N. Baldini, D. Heymann, Sarcoma treatment in the era of molecular medicine, EMBO Mol Med, 12 (2020) e11131.

[53] R. Gelli, G. Di Pompo, G. Graziani, S. Avnet, N. Baldini, P. Baglioni, F. Ridi, Unravelling the Effect of Citrate on the Features and Biocompatibility of Magnesium Phosphate-Based Bone Cements, ACS Biomater Sci Eng, 6 (2020) 5538-5548.

[54] F. Perut, L. Roncuzzi, S. Avnet, A. Massa, N. Zini, S. Sabbadini, F. Giampieri, B. Mezzetti, N. Baldini, Strawberry-Derived Exosome-Like Nanoparticles Prevent Oxidative Stress in Human Mesenchymal Stromal Cells, Biomolecules, 11 (2021) 87.

[55] M. Cortini, A. Armirotti, M. Columbaro, D.L. Longo, G. Di Pompo, E. Cannas, A. Maresca, C. Errani, A. Longhi, A. Righi, V. Carelli, N. Baldini, S. Avnet, Exploring Metabolic Adaptations to the Acidic Microenvironment of Osteosarcoma Cells Unveils Sphingosine 1-Phosphate as a Valuable Therapeutic Target, Cancers (Basel), 13 (2021) 311.

[56] G. Di Pompo, M. Cortini, R. Palomba, V. Di Francesco, E. Bellotti, P. Decuzzi, N. Baldini, S. Avnet, Curcumin-Loaded Nanoparticles Impair the Pro-Tumor Activity of Acid-Stressed MSC in an In Vitro Model of Osteosarcoma, Int J Mol Sci. 22 (2021) 5760.

[57] G. Di Pompo, C. Errani, R. Gillies, L. Mercatali, T. Ibrahim, J. Tamanti, N. Baldini, S. Avnet, Acid-Induced Inflammatory Cytokines in Osteoblasts: A Guided Path to Osteolysis in Bone Metastasis, Front Cell Dev Biol. 9 (2021) 678532.

[58] G. Di Pompo, M. Cortini, N. Baldini, S. Avnet, Acid Microenvironment in Bone Sarcomas, Cancers (Basel), 13 (2021) 3848.

[59] T. Fischetti, G. Di Pompo, N. Baldini, S. Avnet, G. Graziani, 3D Printing and Bioprinting to Model Bone Cancer: The Role of Materials and Nanoscale Cues in Directing Cell Behavior, Cancers (Basel), 13 (2021) 4065.

[60] S. Avnet, S. Lemma, M. Cortini, G. Di Pompo, F. Perut, M.V. Lipreri, L. Roncuzzi, M. Columbaro, C. Errani, A. Longhi, N. Zini, D. Heymann, M. Dominici, G. Grisendi, G. Golinelli, L. Consolino, D.L. Longo, C. Nanni, A. Righi, N. Baldini, The Release of Inflammatory Mediators from Acid-Stimulated Mesenchymal Stromal Cells Favours Tumour Invasiveness and Metastasis in Osteosarcoma, Cancers (Basel), 13 (2021) 5855.

[61] M.V. Lipreri, N. Baldini, G. Graziani, S. Avnet, Perfused Platforms to Mimic Bone Microenvironment at the Macro/Milli/Microscale: Pros and Cons, Front Cell Dev Biol, 9 (2022) 760667.

**PIANO DELLE ATTIVITA’**

###### Laboratorio dove saranno eseguite le prove

L'attività dell’assegnista di ricerca sarà svolta presso l’Istituto Ortopedico Rizzoli IRCCS (IOR Bologna), presso la SC di Scienze e Tecnologie Biomediche (Responsabile Nicola Baldini).

**Materiale e Metodo**

Allo scopo di studiare l’effetto del citrato sulla migrazione delle cellule di PCa all’osso, verrà sviluppato un sistema *in vitro* 3D bone-on-a-chip vascolarizzato. In particolare, all’interno del chip verranno co-coltivate cellule di carcinoma prostatico e cellule stromali dell’osso, quali osteoblasti e osteociti, al fine di verificare la simbiosi metabolica fra cellule tumorali e cellule normalmente residenti a livello del tessuto colonizzato. Allo scopo di validare il sistema bone-on-a-chip sviluppato e la sua capacità di mimare le interazioni fra il tumore e lo stroma dell’osso, sarà prevista nel progetto l’analisi dell’espressione di proteine associate al differenziamento degli osteoblasti, come la fosfatasi alcalina, l’osteocalcina, l’osteopontina, RUNX2 e il collagene di tipo I e di marcatori tipicamente osteocitari, quali la podoplanina/E11 e la sclerostina. Tale messa a punto, considerando la miniaturizzazione del sistema *in vitro*, si baserà sui vantaggi della tecnica di Western Blot in elettroforesi capillare. Quest’ultima sarà impiegata anche per valutare nello stesso modello miniaturizzato l’espressione nello stroma osseo di proteine coinvolte nel metabolismo del lattato e del citrato, fra cui il trasportatore monocarbossilato 1 (MCT1), il trasportatore dello zinco (ZIP1) e il trasportatore del citrato (CTP).

Come modello di cellule tumorali, saranno impiegate sia linee commerciali che circulating tumor cells (CTC) isolate dal sangue periferico di pazienti tramite la tecnologia del Parsortix. L’extravasazione delle cellule di carcinoma poste all’interno del sistema bone-on-a-chip *in vitro* sarà valutata tramite conta delle cellule che avranno attraversato le cellule endoteliali e saranno migrate verso l’adiacente matrice.

Infine, grazie alla conduzione di uno studio clinico osservazionale, saranno raccolti e processati campioni biologici, in particolare sangue e biopsie ossee, isolati da pazienti con carcinoma prostatico allo scopo di quantificare biomarcatori associati al metabolismo del citrato. In particolare, le biopsie ossee saranno destinate al dosaggio del citrato e del collagene di tipo I tramite saggi colorimetrici, previo dismembramento e lisi del tessuto. Il sangue del paziente, invece, sarà utilizzato ai fini dell’isolamento delle CTC per valutare nelle stesse la presenza di mutazioni o di particolari polimorfismi nei geni associati al metabolismo del citrato, utilizzando la piattaforma DEPArray e il sequenziamento NGS.

**Piano di formazione dell’assegnista**

La formazione del titolare dell’assegno sarà integrata da:

1) Formazione sull’utilizzo dello strumento Parsortix;

2) Formazione sull’utilizzo dello strumento DEPArray;

3) Messa a punto e validazione di metodiche di analisi proteica tramite Western Blot in elettroforesi capillare;

4) Nozioni sulla raccolta, processazione, stoccaggio e gestione dei campioni biologici e dei dati clinici risultanti dallo studio clinico osservazionale;

5) Analisi statistica dei dati, con uso di tecniche uni- e multivariate.

Al termine del periodo di ricerca, il titolare avrà acquisito competenze di alto livello sull’isolamento delle CTC da sangue periferico tramite la tecnologia del Parsortix e sulla successiva caratterizzazione mediante lo strumento DEPArray. Inoltre, il titolare acquisirà competenze nelle tecniche di caratterizzazione osteogenica e metabolica delle cellule stromali ossee tramite Western Blot in elettroforesi capillare e nella conduzione di studi clinici osservazionali.

*Partecipazione a seminari e corsi*

* Meeting interni di laboratorio e Journal Clubs;
* Webinars sull’utilizzo di dispositivi di coltura cellulare microfluidici organ-on-a-chip;
* Eventuali seminari ed eventi scientifici nazionali ed internazionali.