*Modulo richiesta assegno*

|  |  |
| --- | --- |
| **TUTOR** | **Prof. Giuseppe Gasparre** |
| Fascia VRA | **(compilazione a cura della Giunta)** | *Punti*  |
| **PRODUZIONE SCIENTIFICA ASSEGNISTI NELL’ULTIMO QUADRIENNIO** | *Punti* |
| Nome e n° mesi assegnista 1 | Amato Laura Benedetta (30 mesi) |
| **Max. 4** lavori in extenso su riviste indicizzate PubMed | Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. Sansone P, Savini C, Kurelac I, Chang Q, **Amato LB**, Strillacci A, Stepanova A, Iommarini L, Mastroleo C, Daly L, Galkin A, Thakur BK, Soplop N, Uryu K, Hoshino A, Norton L, Bonafé M, Cricca M, Gasparre G, Lyden D, Bromberg J.Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Oct 24;114(43):E9066-E9075.  |
| Mild phenotypes and proper supercomplex assembly in human cells carrying the homoplasmic m.15557G > A mutation in cytochrome b gene. Iommarini L, Ghelli A, Leone G, Tropeano CV, Kurelac I, **Amato LB**, Gasparre G, Porcelli AM.Hum Mutat. 2018 Jan;39(1):92-102. |
| Inducing cancer indolence by targeting mitochondrial Complex I is potentiated by blocking macrophage-mediated adaptive responses. Kurelac I, Iommarini L, Vatrinet R, **Amato LB**, et al.. Nat Commun. 2019 Feb 22;10(1):903 |
|  |
| Nome e n° mesi assegnista 2 | Girolimetti Giulia (24 mesi) |
| **Max. 4** lavori in extenso su riviste indicizzate PubMed | Platinum-induced mitochondrial DNA mutations confer lower sensitivity to paclitaxel by impairing tubulin cytoskeletal organization. **Girolimetti G**, et al.Hum Mol Genet. 2017 Aug 1;26(15):2961-2974. 47. |
| Mitochondrial DNA sequencing demonstrates clonality of peritoneal implants of borderline ovarian tumors. **Girolimetti G**, et al. Mol Cancer. 2017 Feb 27;16(1) |
|  |
|  |
|  |  |
|  |  |
|  |
|  |
|  |
|  |  |
|  |  |
|  |
|  |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Commissione proposta**3 commissari + 1 supplente | Prof. Giuseppe Gasparre |
| Dott.ssa Ivana Kurelac |
| Dott.ssa Monica De Luise |
| Prof.ssa Anna Maria Porcelli |

|  |
| --- |
| **TITOLO DEL PROGETTO** |
| Studio dei meccanismi delle vie adattive di angiogenesi in seguito alla perdita del Complesso I mitocondriale nel carcinoma ovarico. |
| ASSEGNO FINANZIATO DA PROGETTO COMPETITIVO*(barrare la casella corrispondente)* | x SI | □ NO | *Punti* |
| SE IL FINANZIAMENTO È COMPETITIVO L’ENTE FINANZIATORE  | AIRC |
| PROGETTO/ATTIVITÀ A SCOPO COMMERCIALE*(es. sperimentazione profit)* | □ SI | x NO |
| CARATTERISTICHE DEL PROGETTO (*biomedico/osservazionale/clinico-interventistico/multidisciplinare*) | Biomedico |
| STATO DI APPROVAZIONE DEL PROGETTO DA PARTE DEL COMITATO ETICO (*se necessario per il tipo di studio barrare o evidenziare la casella corrispondente*) | x Ottenuto | □ Da ottenere |
| **DESCRIZIONE DEL PROGETTO** *(max 800 parole)* | *Punti* |
| **Stato dell’Arte e Razionale**Il cancro ovarico è uno dei tumori con il più alto tasso di mortalità, soprattutto perché spesso diagnosticato a stadi già avanzati, con un tasso di ricorrenza del 75% nell’arco di 5 anni. Da ciò scaturisce la necessità di ricercare nuovi farmaci che consentano di migliorare le probabilità di sopravvivenza, come i farmaci anti-angiogenici, considerato che l’angiogenesi ha un ruolo fondamentale nella progressione tumorale nell’ovaio attraverso la formazione di ascite e metastasi. Un esempio è il Bevacizumab, che ha mostrato però un’efficacia limitata accompagnata dalla comparsa di tolleranza, a causa di una serie di processi adattativi del tumore, tra cui l’incremento del fattore pro-angiogenico ipossia-inducibile 1-α (HIF1α). È stato dimostrato che l’assenza di funzionalità del Complesso I (CI) mitocondriale impedisce alle cellule tumorali di adattarsi all' ipossia attraverso la destabilizzazione di HIF1α, riducendone il potenziale tumorigenico. Pertanto, un modo per incrementare l’efficienza del Bevacizumab nel cancro ovarico potrebbe essere quello di bersagliare il CI al fine di impedire la stabilizzazione di HIF1α. Tuttavia, le cellule tumorali CI-nulle sono in grado di sopravvivere *in vivo* e di riadattarsi nel tempo, ristrutturando il loro microambiente in modo da promuovere l’angiogenesi mediata dai macrofagi associati al tumore. Inoltre, in seguito al danno mitocondriale causato dall’assenza del CI si osserva l’attivazione di un meccanismo compensatorio mediato dal fattore di trascrizione PGC1α, coinvolto oltre che nella biogenesi mitocondriale, anche nella neoangiogenesi, indipendentemente da HIF1α. Infatti, PGC1α, attraverso l’interazione con il recettore degli estrogeni ERRα, potrebbe causare un aumento del fattore di crescita endoteliale VEGF. Lo studio di questi meccanismi potrebbe quindi rivelare nuovi target supportando l'uso di terapie combinate, che potrebbero risultare più efficaci nel trattamento di modelli di cancro ovarico, mirando alla loro plasticità metabolica.**Obiettivi**Questo studio consentirà di valutare il contributo della popolazione di macrofagi M2 durante l’angiogenesi in modelli di cancro ovarico CI-nulli e di investigare se questo avviene attraverso l’aumento della secrezione di lattato e/o la riduzione dell’espressione di HIF1 insieme al fattore inibitorio migratorio dei macrofagi (MIF). Inoltre, ERRα potrebbe promuovere, insieme a PGC1α, l’incremento dei livelli di VEGF, in modelli in cui il CI è inibito. Pertanto, verrà valutato se tali meccanismi possano essere responsabili dell’adattamento tumorale e dell’aumento della vascolarizzazione tipico dei modelli CI-nulli *in vivo*.**Metodologia (*descrizione del campione, principali tecniche utilizzate, aspetti biostatistici, fattibilità…*)**Le linee ovariche CI-nulle SKOV-3, CAOV3, OVSAHO e OVCAR4 verranno inoculate per mezzo di iniezione intraperitoneale in topi nudi, mentre la linea murina ID8 in topi BALB/c. La crescita tumorale sarà valutata settimanalmente con l’utilizzo dello strumento UltraSound unit (MyLab70 XVG), finché il tumore non avrà raggiunto la dimensione di 1,5 cm3. Eventuali differenze nella sopravvivenza degli animali saranno messe in evidenza attraverso le curve di Kaplan-Meier. Questo esperimento consentirà di ottenere masse di uguali dimensioni, essenziali al fine di valutare il contributo dello stroma nei tumori. Un secondo esperimento sarà eseguito con le stesse linee e ceppi di topo, terminando l’esperimento non appena i primi tre controlli raggiungeranno la dimensione di 1,5 cm3, in modo da evidenziare differenze di crescita tra tumori CI-nulli e CI competenti. Al termine degli esperimenti ogni tumore sarà espiantato e per valutare l’eventuale formazione di metastasi verranno prelevate anche le ovaie, la milza, il fegato e i polmoni. I tumori saranno raccolti e processati per analisi di immunoistochimica e immunofluorescenza; saranno congelati per l’estrazione di RNA, proteine e metaboliti; una parte sarà impiegata per la generazione di colture *ex vivo*. Le IHC saranno eseguite per NUDFS3, HIF1α, MIF, il marcatore dei macrofagi F4/80, il marcatore dei periciti SMA, il marcatore delle cellule endoteliali CD31, i trasportatori di lattato MCT1 e MCT4, i marcatori di acidosi LAMP2 e CAIX, ERRα, e VEGF. Successivamente, verrà analizzata la correlazione tra i livelli di VEGF, determinati attraverso l’analisi del secretoma nelle cellule delle colture *ex vivo*, insieme ai livelli di espressione di PGC1α (in qRT-PCR) e di ERRα (in Western Blot), in condizioni ipossiche. La co-immunoprecipitazione di PGC1α e di ERRα, inoltre, aiuterà a comprendere se tale complesso si formi preferenzialmente nei modelli CI-nulli. Successivamente, le linee ovariche CI-nulle *ex vivo* verranno trattate in ipossia con un inibitore specifico per il recettore ERRα (XCT790) così da valutare l’espressione di VEGF attraverso qRT-PCR. In seguito, le linee CI-nulle *ex vivo* verranno messe in co-coltura con la linea endoteliale HUVEC in piastre contenenti Matrigel, in modo da valutare la capacità delle cellule HUVEC di formare strutture tridimensionali simili a vasi sanguigni. Gli esperimenti animali e le analisi immunoistochimiche saranno svolte presso lo stabulario del Centro di Ricerca Biomedica Applicata (CRBA). Le analisi *in vitro* verranno eseguite presso la U.O. Genetica Medica.**Risultati attesi**Questo lavoro consentirà di confermare su modelli di cancro ovarico i risultati ottenuti in precedenza su modelli CI-nulli *in vivo*, e di identificare nuovi target delle vie adattive di angiogenesi attraverso lo studio dell’interazione PGC1α- ERRα. |
| **DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DELL’ASSEGNISTA** *(per i* ***nuovi*** *assegni: max 400 parole; competenze richieste, scansione temporale della formazione, scansione temporale dell’attività, obiettivi primari e secondari)*Il presente progetto richiederà l’utilizzo di competenze in biologia molecolare e cellulare, per lo svolgimento delle principali attività previste.Obiettivi primari: * confermare che attraverso la generazione di modelli xenograft da linee di cancro ovarico CI-nulle, l’assenza del CI causa una riduzione della crescita tumorale.
* confermare negli stessi modelli ovarici che i tumori CI-nulli innescano meccanismi adattativi per garantire il proseguimento della crescita tumorale, come l'attrazione delle cellule stromali e l'acidificazione del microambiente tumorale, in modo da supportare l'invasione e il processo di metastatizzazione.

L’inoculo per mezzo di iniezione intraperitoneale in topi nu/nu verrà eseguito su 8 animali per ogni gruppo/linea cellulare (n=8 linee CI-nulle; n=8 CI-competeneti). Saranno inoculate 1x107 cellule delle linee umane ovariche SKOV-3, CAOV3, OVSAHO, OVCAR4 e della linea murina ovarica CI-nulla ID8 in topi BALB/c (Mese 1-6). La caratterizzazione dei tessuti xenograft ottenuti sarà eseguita mediante analisi di immunoistochimica e immunofluorescenza; estrazione di RNA, proteine e metaboliti da tessuti freschi e congelati. Dagli stessi campioni verranno generate colture *ex vivo* (Mese 6-8).Obiettivo secondario:* dimostrare che l’inibizione di ERRα con l’inibitore XCT790 causi una riduzione dell’angiogenesi *in vitro* attraverso l’abbassamento dei livelli di PGC1α.

Le colture *ex vivo* derivate dalle linee SKOV-3, CAOV3, OVSAHO, OVCAR4 (CI-nulle e CI-competenti) saranno trattate in ipossia con l’inibitore di ERRα, XCT790. Sarà eseguita l’analisi del secretoma per valutare i livelli di VEGF prodotto e secreto all’esterno delle cellule; attraverso qRT-PCR saranno misurati i livelli di espressione di PGC1α e mediante Western Blot verranno valutati i livelli di ERRα (Mese 10-11). Successivamente, attraverso un esperimento di co-coltura, le linee cellulari *ex vivo*, saranno seminate in piastre contenenti Matrigel, insieme alle cellule della linea endoteliale HUVEC. In questo modo sarà possibile valutare in 3D se, in seguito all’aumento di VEGF prodotto dalle linee stabili di cancro ovarico CI-nulle, le cellule HUVEC saranno in grado di formare strutture tridimensionali simili a vasi sanguigni. Al contempo, il trattamento con l’inibitore di ERRα, XCT790, consentirà di dimostrare un’eventuale riduzione della capacità delle cellule HUVEC di formare strutture simili a vasi sanguigni (Mese 11-12).L’assegnista sarà costantemente coinvolto nei lab meeting e nelle attività di brainstorming del gruppo di ricerca, settimanalmente, per il rendiconto delle attività di laboratorio. Parteciperà alla stesura dei lavori scientifici e verrà garantita la partecipazione ad almeno un congresso internazionale per anno. | *Punti* |
|  |

SE RINNOVO, SI RICORDA DI ALLEGARE ANCHE LA RELAZIONE DELL’ASSEGNISTA CON LA SUA PRODUZIONE SCIENTIFICA.

*Scheda attività assistenziale (se prevista)*

|  |
| --- |
| **ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DELL’ASSEGNISTA/ N. ORE SETTIMANA** |
| Non previste |
|  |
|  |
| AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L’ATTIVITÀ |
|  |

Si ricorda che, come previsto dagli Accordi sull’impiego nell’attività assistenziale dei Titolari di assegni di ricerca, sottoscritti tra l’Università di Bologna e le Aziende Ospedaliere di riferimento, una volta stipulato il contratto con il vincitore della selezione, il tutor deve consegnare alla Direzione Medica Ospedaliera la relativa modulistica, nella quale andranno riportate le attività qui segnalate.