

Programma di Attività del/della borsista

Programma di Ricerca (Dott.ssa Claudia Zanna)

Analisi di trascrittomica per identificare i pathways potenzialmente coinvolti in linee tumorali di osteosarcoma e colonc carcinoma in presenza/assenza della proteina inibitrice IF₁ dell'ATP sintasi.

Molteplici aspetti della biologia mitocondriale, oltre al metabolismo energetico, supportano la tumorigenesi e la progressione del cancro, inclusa la biogenesi ed il turnover mitocondriale, la dinamica di fissione e fusione del reticolo, la regolazione dello stress ossidativo e la suscettibilità alla morte cellulare (Vyas S et al. 2016). IF₁, l'inibitore endogeno dell'ATP sintasi, è sovra-espresso in molti tumori e sembra avere un ruolo centrale nelle cellule tumorali promuovendo la riprogrammazione metabolica, la proliferazione, la resistenza alla morte cellulare, l'invasione e la metastasi. IF₁ inibisce l'idrolisi di ATP, da parte dell'ATP sintasi mitocondriale, quando le cellule tumorali sono esposte ad anossia/ipossia, favorendo la sopravvivenza cellulare e la crescita tumorale (Solaini G et al. 2021). Inoltre, sembra svolgere la sua azione pro-oncogenica anche inibendo l'apoptosi attraverso la preservazione dell'ultrastruttura delle *cristae* mitocondriali ed il blocco del rilascio di citocromo c nel citoplasma (Faccenda D et al. 2017). In letteratura, l'over-espressione di IF₁ è associata a cattiva prognosi per i pazienti con alcuni tipi di tumore (glioma, epatocarcinoma, carcinoma della vescica) mentre è correlata a prognosi favorevole nei pazienti con tumore al seno, al colon o al polmone (Domínguez-Zorita S et al. 2023).

In questo studio verranno utilizzate linee cellulari di osteosarcoma (143B) e colonc carcinoma (HCT116) parentali, scramble e con silenziamento di IF₁ (IF₁ knock-down KD). Queste linee cellulari sfruttano metabolismi energetici differenti (143B sono glicolitiche, mentre le HCT116 sono OXPHOS dipendenti) e presentano livelli di espressione di IF₁ differenti (Barbato S et al. 2015; Sgarbi G et al. 2018).

Verranno effettuate analisi di trascrittomica tramite sequenziamento di RNA delle varie linee tumorali cresciute in 25mM glucosio (terreno ricco), 5mM glucosio (terreno fisiologico) e 5mM galattosio (terreno di stress) per individuare i pathways potenzialmente coinvolti in queste linee tumorali, permettendo correlazioni con la presenza o meno di IF₁ e con la sua quantità in diverse condizioni metaboliche.

L'attività del candidato sarà articolata come descritto:

- Estrazione RNA dai pellet cellulari
- Analisi di sequenziamento dell'RNA utilizzando la piattaforma Illumina NovaSeq6000. Il sequenziamento verrà eseguito su una *flow cell* NovaSeq6000 S1 200 cicli e verranno analizzati almeno 50 milioni di letture per ciascun campione.
- Analisi dei dati di trascrittomica tramite software bioinformatici. L'analisi dell'arricchimento del set genetico (GSE, Gene set enrichment) svolge un ruolo essenziale nell'estrarre informazioni biologiche dai dati molecolari ottenuti dagli esperimenti in scala omica (genomica, trascrittomica, proteomica..) e per la loro interpretabilità. ORA (over-representation analysis; per valutare se l'elenco dei geni immessi dall'utente è sovrarappresentato in un determinato set di geni correlati funzionalmente), FCS (functional class scoring; calcola un functional score utilizzando l'espressione di tutti i geni all'interno di una specifica classe di geni piuttosto che dei singoli geni) e PT (pathway topology; fornisce un network di pathways) sono tre approcci di GSE. Verranno utilizzati tre software in particolare:

- IPA (Ingenuity Pathway Analysis) _ predizione di up-regolazione e/o down-regolazione di pathways e potenziale identificazione di nuovi targets o biomarcatori
- KOBAS-i (KEGG Orthology Based Annotation System - intelligent) _ nuovo approccio di machine-learning denominato CGPS (Combined Gene set analysis incorporating Prioritization and Sensitivity) che integra i risultati derivati da 7 strumenti FCS e 2 PT in un unico punteggio d'insieme (R score) per ottimizzare l'identificazione di pathways biologicamente rilevanti.
- ShinyGO (Gene Ontology) _ analisi approfondita degli elenchi di geni, con visualizzazione grafica di GSE, pathway, caratteristiche genetiche e interazioni proteiche.

- Validazione dei pathways alterati tramite Real Time PCR e WB

Queste analisi verranno svolte in collaborazione con la Dott.ssa Maresca ed il Dott. Caporali del gruppo del Prof. Carelli, DIBINEM UNIBO e IRCCS ISNB.

Bibliografia

Barbato S et al. (2015) *J Biol Chem.* 290: 6338-48. The inhibitor protein (IF1) of the F1F0-ATPase modulates human osteosarcoma cell bioenergetics.

Domínguez-Zorita S et al. (2023) *Cancers* 15: 3775-3801. The Mitochondrial ATP Synthase/IF1 Axis in Cancer Progression: Targets for Therapeutic Intervention.

Faccenda D et al. (2017) *Cell Reports*, 18: 869-1883. Control of Mitochondrial Remodeling by the ATPase Inhibitory Factor 1 Unveils a Pro-survival Relay via OPA1.

Sgarbi G et al. (2018) *BBA - Bioenergetics*, 1859: 99-109. The role of the ATPase inhibitor factor 1 (IF1) in cancer cells adaptation to hypoxia and anoxia.

Solaini G et al. (2021) *Biochemical Society Transactions* 49: 815-827. The F1Fo-ATPase inhibitor, IF1, is a critical regulator of energy metabolism in cancer cells.

Vyas S et al. (2016) *Cell* 166: 555-566. Mitochondria and Cancer.