



Corso di dottorato in Scienze Biomolecolari
PhD in Biomolecular Sciences
Ciclo 40 / Cycle 40
A.Y. 2024-2025

Reserved scholarships A

Progetti finanziati nell'ambito dei Dipartimenti di Eccellenza 2023-2027.

Curriculum Scienze Biomolecolari

Il vincitore sceglierà il progetto di ricerca dall'elenco sottostante.

MUR-funded grants - Departments of Excellence 2023-2027.

Biomolecular Sciences Curriculum

The winner will choose from the list available below the research project.

Principal Investigator	Project title
1 – Fulvio Chiacchiera	<i>Decrypting metastatic potential of primary liver tumors / Decodificare il potenziale metastatico dei tumori epatici</i>
2 – Maria Caterina Mione & Alberto Inga	<i>Do telomeric R-loops activate innate immunity in cancer? / Attivazione dell'immunità innata nel cancro da parte di R-loop telomeric</i>
3 – Marie-laure Baudet	<i>One ring to rule them all: circRNA as a common hallmark of neurodegenerative diseases / Un anello per vincerli: circRNA come hallmark comune delle malattie neurodegenerative</i>



Project 1

Decrypting metastatic potential of primary liver tumors

Decodificare il potenziale metastatico dei tumori epatici

Laboratory:

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

Principal Investigator: Fulvio Chiacchiera (fulvio.chiacchiera@unitn.it)

Keywords: Cancer, Metastasis, single cell transcriptomics, spatial transcriptomics

Synthetic description of the activity and expected research outcome

Every year 13000 new hepatocellular carcinoma cases are diagnosed in Italy. With a 5 year survival rate of around 20% hepatocellular carcinoma is one of the most lethal tumors in Europe. For early-stage patients, surgical resection and liver transplantation are the only curative options while no curative pharmacological approaches exist for advanced-stage diseases. Intrahepatic and extrahepatic metastasis are frequently observed. Lungs are the most frequently observed distal site that can be colonized by liver tumor cells¹. For most of the tumors, metastasis dissemination is an early event indicating that gradual accumulation of mutations during tumor growth is largely insufficient to explain cell dissemination and metastasis formation. These data suggest that metastatic potential are intrinsic features of the primary tumor and the result of an adaptative response to specific local or systemic environmental pressures^{2, 3}. The possibility to identify potentially metastatic clones already present in the primary tumors and understand which (micro)environmental pressure promote the migration of these cells, or activation of dormant lesions, would be a turning point for prognosis and therapy.

Aim

The goal of this project is to characterize the interactions between cancer cells and cells of the microenvironment, mainly immune cells, in both primary and metastatic lesions to understand how they interact to reciprocally reshape the transcriptional and epigenetic landscape to promote cell dissemination or dormant lesions reactivation.

Experimental approach

We will take advantage of a novel hepatocellular carcinoma mouse model we generated in which the growth of sporadic primary tumours is followed by the formation of lung metastasis (proliferative macro- and dormant micrometastasis) similarly to what can be observed in humans⁴. We will use spatial transcriptomics and proteomics to characterize primary tumours and metastatic lesions and single-cell transcriptomics to characterize the immune cells associated with these lesions⁵. Spatial proteomic will be performed using laser-microdissection couple to mass-spectrometry analysis to isolate and characterize specific regions of primary and metastatic lesions. For spatial transcriptomic we plan to use commercially available platforms and for single cell transcriptomic we will take advantage of the newly established single-cell facility. The data obtained will be integrated with the analysis of the genetic and epigenetic alterations in the different cells and the role of immune infiltrate investigated using specific bioactive molecules (e.g. anti-CTLA4/Anti-PD1, clodronate loaded liposomes) and antibodies-based selective ablation. The translatability of the data obtained will be explored in collaboration with the pathology unit of S. Chiara Hospital.

Expected results

The data obtained will shed light on the role of the tumor microenvironment, in particular immune cells, in shaping cancer cell epigenome and transcription (and vice versa) favouring dissemination and activation of dormant metastatic lesions. The integration of spatially resolved transcriptional data, single cell-transcriptomic and genomics data will help to identify specific traits and key players characterizing potentially metastatic clones that can be used to stratify primary liver tumors.

References:

1. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2019;380:1450-1462.
2. Vendramin R, Litchfield K, Swanton C. Cancer evolution: Darwin and beyond. *EMBO J* 2021;40:e108389.
3. Vegliante R, Pastushenko I, Blanpain C. Deciphering functional tumor states at single-cell resolution. *EMBO J* 2022;41:e109221.
4. D'Ambrosio A, Bressan D, Ferracci E, Carbone F, Mulè P, Rossi F, Barbieri C, Sorrenti E, Fiaccadori G, Detone T, Vezzoli E, Bianchi S, Sartori C, Corso S, Fukuda A, Bertalot G, Falqui A, Barbareschi M, Romanel A, Pasini D, Chiacchiera F., Increased genomic instability and reshaping of tissue microenvironment underlie oncogenic properties of *Arid1a* mutations. *Science Advances* 15;10(11):eadh4435
5. Mulè P., Fernandez-Perez D., Brandini S., Diaferia G., Cuomo A., Manganaro D., Zanotti M., Rustichelli S., Ferrari K.J., Bisso A., Natoli G., Amati B., Chiacchiera F., Pasini D., WNT oncogenic transcription requires MYC-dependent suppression of autophagy in gastric tumours. *Gastroenterology (Under revision)*.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

Introduzione

Ogni anno 13000 nuovi casi di carcinoma epatico vengono diagnosticati in Italia. Con una percentuale di sopravvivenza a cinque anni pari al 20% questo tipo di tumori è tra i più letali in Europa. Mentre per i pazienti con tumori a stadi iniziali la terapia chirurgica o il trapianto d'organo possono rivelarsi risolutivi, per pazienti con tumori a stadi avanzati non esiste attualmente una terapia farmacologica curativa.



Metastasi intra- ed extra-epatiche sono spesso osservate. Il sito di metastatizzazione preferenziale è rappresentato dai polmoni¹. Per molti tumori, la formazione di metastasi è un evento relativamente precoce e ciò dimostra come il progressivo accumulo di mutazioni osservate durante la progressione tumorale non sia sufficiente a spiegare il processo di metastatizzazione. Ciò suggerisce che la capacità di metastatizzare è una caratteristica già presente nel tumore primario che si sviluppa in risposta a risposte adattative a specifiche pressioni selettive esercitate localmente o a livello sistemico^{2,3}. Da un punto di vista prognostico e terapeutico, la possibilità di identificare cloni potenzialmente metastatizzanti quando ancora nel tumore primario e comprendere quali pressioni selettive, presenti nel microambiente, spingano queste cellule a migrare, o cellule quiescenti a riattivarsi, rappresenterebbe una vera e propria svolta.

Scopo del progetto

Lo scopo di questo progetto è caratterizzare le interazioni tra cellule tumorali e cellule che compongono il microambiente, in particolare cellule del sistema immunitario, nel tumore primario e nella relativa metastasi per comprendere come queste interagiscano e siano in grado di plasmare il reciproco profilo trascrizionale ed epigenetico per promuovere il processo di metastatizzazione o la riattivazione di lesioni dormienti.

Approccio sperimentale

Per portare avanti questo progetto utilizzeremo un nuovo modello murino generato nel nostro laboratorio in cui alla formazione di un tumore epatico primario segue la formazione di metastasi polmonari (macrometastasi proliferanti e micrometastasi dormienti) in maniera simile a quanto osservato nei pazienti⁴. Per caratterizzare le lesioni primarie e metastatiche utilizzeremo tecniche di spatial transcriptomics e spatial proteomics mentre per la caratterizzazione delle cellule immunitarie nei diversi microambienti useremo approcci di single-cell transcriptomics⁵. Per eseguire analisi di spatial proteomics utilizzeremo la microdissezione laser accoppiata alla spettrometria di massa ad alta sensibilità per isolare e caratterizzare regioni specifiche dei tumori primari e delle lesioni metastatiche. Per gli esperimenti di spatial transcriptomics utilizzeremo piattaforme commerciali ampiamente utilizzate mentre per gli esperimenti di single-cell transcriptomics faremo riferimento alla nuova facility di single-cell analysis presente in dipartimento. I dati così ottenuti saranno integrati con l'analisi delle alterazioni genetiche ed epigenetiche nei diversi tipi cellulari e il ruolo delle singole popolazioni di cellule immunitarie sarà investigato utilizzando specifiche classi di molecole (e.g. antiCTLA4/anti-PD1, liposomi carichi con clodronato) o tramite ablazione selettiva di tipi cellulari utilizzando anticorpi specifici. La possibilità di trasferire i dati ottenuti in ambito clinico è garantita dalla collaborazione esistente con l'unità di anatomia patologica dell'ospedale S. Chiara.

Risultati attesi:

I dati ottenuti faranno luce sul ruolo delle cellule presenti nel microambiente, in particolare le cellule del sistema immunitario, nel plasmare il profilo trascrizionale ed epigenetico delle cellule tumorali (e vice versa), favorendo la metastatizzazione e la riattivazione di lesioni dormienti. L'integrazione di spatial transcriptomics, single-cell transcriptomics e dati di genomica sarà funzionale all'identificazione di tratti specifici e marcatori principali di cloni con potenzialità metastatiche da poter utilizzare per stratificare tumori primari.

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 è 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'epigenetica, 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 2

Do telomeric R-loops activate innate immunity in cancer?

Attivazione dell'immunità innata nel cancro da parte di R-loop telomerici

Laboratory:

Laboratory of Experimental Cancer Biology (<https://www.cibio.unitn.it/465/laboratory-of-experimental-cancer-biology>)

Principal Investigator: Maria Caterina Mione (mariacaterina.mione@unitn.it) & Alberto Inga (alberto.inga@unitn.it)

Keywords: Cancer; Immune responses



Synthetic description of the activity and expected research outcome

Summary: The project focuses on dissecting the role of RNA and RBP aggregates in resolving RNA-DNA hybrids, maintaining genome stability and preventing cGAS/STING immune responses in cancer models.

We will study the activation of innate immunity by DNA-RNA hybrids and the involvement of the cGAS/STING pathway. In cancer cells cGAS/STING acts as a potent tumor suppressive mechanism, and therapeutic approaches enhancing cGAS/STING pathway activation to promote anti-tumor immune responses are the goals of this project. Liquid-Liquid Phase Separations (LLPS) of DNA, RNA and RBP aggregates may function as resolving hubs for DNA-RNA hybrids that drastically limit genomic instability, thus suppressing innate immunity pathways. Telomeres will be used as hallmark model to functionally dissect DNA-RNA mediated activation of the cGAS/STING pathway in a model of ALT brain cancer in zebrafish, and we will investigate whether DNA-RNA hybrids containing TERRA and telomeric DNA are able to activate cGAS/STING when LLPS formation is impaired. Finally, the effects of cGAS/STING activation on the progression of brain cancer will be addressed. The project will be developed in close collaboration with Prof. Stefan Schoeftner, from University of Trieste and Prof. Emilio Cusanelli from DiCibio at the University of Trento.

Experimental design: 1) Visualize co-localization of TERRA and R-loops with paraspeckle proteins, which are the main component of LLPS; 2) Perform depletion of TERRA by ASO to study the impact on R-loop and paraspeckle formation; 3) Define whether telomeric R-loops are able to activate the cGAS/STING pathway in a ALT+ zebrafish brain tumor model; 4) Assess whether cGAS/STING activation through R-loops stress leads to cancer regression and cancer immune responses.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

Sommario: Il progetto si concentra sull'analisi del ruolo degli aggregati di RNA e RBP nella risoluzione di ibridi di RNA-DNA, mantenendo così la stabilità del genoma e prevenendo l'attivazione di cGAS/STING nei modelli di cancro. Studieremo l'attivazione dell'immunità innata da parte di ibridi DNA-RNA ed il coinvolgimento della pathway di cGAS/STING. Nelle cellule tumorali cGAS/STING agisce come un potente meccanismo di soppressione del tumore e approcci terapeutici che stimolano l'attivazione di cGAS/STING nella risposta immunitaria antitumorale sono gli obiettivi di questo progetto. Aggregati di DNA, RNA e RBP in separazione di fase liquido-liquido (LLPS) di possono funzionare come hub risolutivi per gli ibridi DNA-RNA, così limitando drasticamente instabilità genomica, e sopprimendo le vie dell'immunità innata antitumorale. I telomeri verranno utilizzati come modello per analizzare funzionalmente l'attivazione mediata da ibridi di DNA-RNA di cGAS/STING in un modello di tumore cerebrale ALT+ nello zebrafish e studieremo se quando la formazione di LLPS è compromessa da approcci farmacologici o genetici, gli ibridi DNA-RNA composti da TERRA e DNA telomerico sono in grado di attivare cGAS/STING. Finalmente, verranno studiati gli effetti dell'attivazione di cGAS/STING sulla progressione del tumore. Il progetto sarà sviluppato in stretta collaborazione con il Prof. Stefan Schoeftner, dell'Università di Trieste e Prof. Emilio Cusanelli del DiCibio dell'Università di Trento.

Disegno sperimentale: 1) Visualizzare la co-localizzazione di TERRA e R-loop con proteine dei paraspeckles, che sono il componente principale di LLPS; 2) Eseguire la deplezione di TERRA mediante ASO per studiarne l'impatto sulla formazione degli 'R-loops e del paraspeckles; 3) Definire se gli R-loops telomerici sono in grado di attivare la via cGAS/STING in un modello di tumore cerebrale ALT+ in zebrafish; 4) Valutare se l'attivazione di cGAS/STING attraverso lo stress dovuto ad R-loops non risolti porta alla regressione del cancro e alla attivazione della risposta immunitaria.

Candidate's profile (skills and competencies)

Required qualifications: Master degree in Biology or Biotechnology.

- Familiarity with mammalian cell culture and basic molecular/cell biology, including nucleic acid isolation and RT-qPCR.

Preferred skills/experience in

- Cancer biology, signaling pathways, telomere biology, advanced microscopy

The candidate will be trained and supported by senior colleagues.

Profilo del/la candidato/a

Titoli richiesti: Laurea Magistrale in Biologia o Biotecnologie.

- Familiarità con le colture cellulari di mammifero e la biologia molecolare/cellulare di base, compreso l'isolamento degli acidi nucleici e la RT-qPCR.

Competenze/esperienze preferenziali nel settore

- Biologia del cancro, vie di segnalazione, biologia dei telomeri, microscopia avanzata

Il candidato sarà formato e supportato da colleghi senior.

Project 3

One ring to rule them all: circRNA as a common hallmark of neurodegenerative diseases

Un anello per vincerli: circRNA come hallmark comune delle malattie neurodegenerative

Laboratory:



The Giovanni Armenise-Harvard laboratory of axonal neurobiology (<https://www.cibio.unitn.it/174/the-giovanni-armenise-harvard-laboratory-of-axonal-neurobiology>)

Principal Investigator: Marie-laure Baudet (marie-laure.baudet@unitn.it)

Keywords: Single Cell (transcriptomics)

Synthetic description of the activity and expected research outcome

Impaired RNA transport is a common hallmark in all critical neurodegenerative diseases (ND) and may precede axon degeneration and cell death. Data generated in my lab has uncovered that circRNAs are enriched in axons and recent publication has revealed that this new class of non-coding RNAs is deregulated in many neurodegenerative diseases although the exact involvement is still poorly understood. We hypothesize that derailed axonal circRNA function is a common etiological factor in neurodegenerative disease. To test our hypothesis, we will use human iPSC cells grown in compartmentalized chambers modelling Huntington's disease, SMA, ALS and Alzheimer's disease. Using novel pipelines we are developing with collaborators derived from single cell transcriptomics approach, we will profile axonal circRNAs but also mRNA, miRNA, translome and proteome by performing spatial omics analysis at the subcellular compartment levels. We will then integrate these data to establish whether impaired axonal circRNAs alter local protein synthesis in axons using advanced Imaging, as a common mechanism in ND which ultimately leads to axonal degenerations.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

L'alterazione del trasporto di RNA è un hallmark comune a tutte le malattie neurodegenerative (ND) critiche e può precedere la degenerazione degli assoni e la morte cellulare. I dati generati nel mio laboratorio hanno scoperto che i circRNA sono arricchiti negli assoni e recenti pubblicazioni hanno rivelato che questa nuova classe di RNA non codificanti è deregolata in molte malattie neurodegenerative, sebbene il coinvolgimento esatto sia ancora poco conosciuto. Ipotizziamo che il deragliamento della funzione dei circRNA assonali sia un fattore eziologico comune nelle malattie neurodegenerative. Per verificare la nostra ipotesi, utilizzeremo cellule iPSC umane coltivate in camere compartimentalizzate che modellano le malattie di Huntington, SMA, SLA e Alzheimer. Utilizzando nuove pipelines che stiamo sviluppando con collaboratori derivato da un approccio di single cell transcriptomics, profileremo i circRNA assonali ma anche mRNA, miRNA, traslatoma e proteoma eseguendo analisi di spatial omics a livello di "single cell" / compartimento subcellulare. In seguito, integreremo questi dati per stabilire se un'alterazione dei circRNA assonali altera la sintesi proteica locale negli assoni utilizzando advanced imaging, come meccanismo comune nella ND che, in ultima analisi, porta alla degenerazione assonale.

Candidate's profile (skills and competencies)

The candidate should be well versed in cell culture, preferentially in iPSC, in RNA biology. Experience in RNA-sequencing analysis and data integration from different omics is a plus but not a strict requirement.

Profilo del/la candidato/a

Il candidato dovrebbe essere esperto in colture cellulari, preferibilmente in iPSC. L'esperienza nell'analisi del sequenziamento dell'RNA e nell'integrazione dei dati provenienti da diversi omics è un vantaggio ma non un requisito rigoroso.