



ALLEGATO E – PROGETTO DI RICERCA

Titolo del progetto

Caratterizzazione molecolare dei ruoli non-canonici della proteina della BER Ape1 nel processamento di miRNA attraverso Analisi Proteomica funzionale e di trascrittomica in linee cellulari tumorali e 3D organoidi tumorali

Descrizione del Progetto

Ape1 è essenziale nelle cellule tumorali per il suo ruolo nel mantenimento della stabilità del genoma attraverso BER, e nella regolazione dell'espressione dei geni coinvolti nella progressione tumorale e chemioresistenza. Recentemente, nel laboratorio del PI è stato scoperto che Ape1 regola l'espressione di onco-miRNA coinvolti nella resistenza al cancro. Ape1 è un bersaglio emergente per la terapia combinata di tumori (tumori ovarici, neurologici, epatici e polmonari) mediante inibitori delle sue funzioni di riparazione del DNA e/o redox. Le limitate informazioni disponibili sul suo coinvolgimento nello sviluppo del cancro e nella chemioresistenza, compreso il ruolo funzionale di diversi polimorfismi, preclude la possibilità di tradurre le conoscenze su questa proteina dal da banco al letto del paziente. Inoltre, gli inibitori finora utilizzati hanno una specificità limitata. Le interazioni proteina-proteina (IPP) e le modificazioni post-traduzionali modulano specificatamente le diverse funzioni di Ape1 nelle cellule tumorali. Ad esempio, abbiamo scoperto che l'associazione Ape1 / NPM1, che è alterata in diverse cellule tumorali (come ad esempio nella leucemia mieloide acuta, AML), modula la risposta delle cellule tumorali ai genotossici e regola la proliferazione cellulare. I rilevanti progressi dei nostri dati recenti mostrano che i ruoli non canonici, ancora poco compresi, di Ape1, associati al metabolismo del miRNA e alla sua rete interazione, possono svolgere una funzione essenziale nei meccanismi di resistenza dei tumori.

L'ipotesi alla base di questo progetto è che l'alterazione del profilo del miRNA regolato da Ape1 e l'alterazione della sua rete di interattoma, possono mediare la resistenza delle cellule tumorali alla chemioterapia. Pertanto, una caratterizzazione molecolare dettagliata dei meccanismi cellulari in cui è coinvolto Ape1 rappresenta il punto di partenza per potenti strategie terapeutiche per la terapia combinata del cancro, sulla base dell'inibizione funzionale della rete di interazioni di Ape1.

La proposta prevede un approccio integrato di NGS (Next Gene Sequencing), Proteomica funzionale e caratterizzazioni biochimiche / biologiche accoppiate all'utilizzo di nuovi composti in grado di modulare le funzioni di Ape1 attraverso piattaforme di screening in vitro e cellulari che impiegano linee cellulari tumorali e organoidi tumorali. Si intende:

- 1) Identificare i miRNA direttamente regolati da Ape1 durante lo stress genotossico che sono coinvolti nella resistenza al cancro e definire il consenso di legame, attraverso analisi CLIP-seq nelle linee di cellule tumorali: A549, JHH6, HeLa e HCT116;
- 2) Caratterizzare la rete di interazioni proteiche di Ape1 responsabile della regolazione dei miRNA regolati da Ape1.
- 3) Definire i requisiti strutturali responsabili dell'interazione di Ape1 con i pri-miRNA target.
- 4) Correlare l'espressione di Ape1 con i suoi miRNA regolati, i geni target e con quello dei partner proteici identificati utilizzando i set di dati di espressione disponibili da vari tipi di tumori, per identificare nuovi biomarcatori predittivi.
- 5) Valutare gli effetti degli inibitori delle diverse funzioni di Ape1 disponibili, nel sensibilizzare le linee cellulari tumorali suddette ed organoidi di cancro del colon, come possibili farmaci in terapia combinata, testando la loro attività sull'interattoma di Ape1.

Questo progetto è organizzato in 5 Workpackages (WP).

WP1. Identificazione delle sequenze di miRNA regolate direttamente da Ape1 nelle linee cellulari di cancro A549, JHH6, HeLa e HCT116 e coinvolte nella resistenza delle cellule tumorali alla



chemioterapia. Time-frame totale: mesi 1-36 del progetto (TT: M1-36). Questo obiettivo sarà sviluppato attraverso approcci di sequenziamento NGS basati su analisi CLIP-seq accoppiate a studi di espressione genica, confrontando le cellule HeLa, come modello di cellule tumorali di riferimento e linee cellulari di cancro al colon A549 (da NSCLC) e JHH6 (da HCC) e HCT116.

Task 1.1 Identificazione delle sequenze di miRNA legate da Ape1 attraverso approcci RNA-CLIP e NGS. Le linee cellulari HeLa, A549, JHH66 e HCT116, ricostituite con un'Ape1 Flaggata, saranno utilizzate per immuno-precipitare i complessi Ape1-RNA. Questi modelli consentono il silenziamento di Ape1 endogeno e la ri-espressione di una forma ricombinante (siRNA-resistente) in una misura simile a quella endogena, evitando i problemi legati alla sovraespressione proteica. Queste analisi verranno eseguite per identificare sia i miRNA che la loro forma immatura pri-miRNA specificamente legata da Ape1. Al fine di evitare risultati non specifici dovuti al legame di Ape1 con gli rRNA, verrà utilizzato un mutante Ape1 incapace di accumularsi all'interno dei nucleoli e di legare gli rRNA, ma ancora in grado di legare c-Myc RNA e pri-miR221 / 222. Questi esperimenti saranno condotti in condizioni normali e di stress genotossico per identificare miRNA coinvolti nella risposta cellulare a tale danno. Analisi bioinformatiche mediante pipeline golden standard con strumenti specifici: fastQC per la valutazione della qualità, bwa o star per l'allineamento; Saranno impiegati HT-seq per le fasi di quantificazione.

Task 1.2 Determinazione del profilo dell'espressione dei miRNA che dipende da Ape1. L'analisi dell'espressione differenziale dei miRNA dalle cellule che esprimono o meno Ape1 saranno eseguite con pipeline golden standard differenziale basate su pacchetti software Bioconductor. Inoltre, le analisi di profiling miRNA differenziali verranno eseguite utilizzando la tecnologia Nanostring e il relativo pacchetto all'interno di Bioconductor. I miRNA candidati più affidabili verranno convalidati mediante l'analisi qPCR. Il pannello dei miRNA identificati rappresenta candidati target affidabili per la regolazione mediata da Ape1 e verrà confrontato con i dati ottenuti dal Task 1.1 per limitare ulteriori analisi.

Task 1.3 Identificazione bioinformatica del presunto consensus dei miRNA legati da Ape1 e studi di networking genico. I dati ottenuti dagli esperimenti NGS verranno analizzati attraverso una pipeline per le previsioni dei motivi di legame. In particolare, utilizzeremo un approccio integrato utilizzando diversi strumenti: suite TOMTOM, Weeder (PMID: 15215380) e Chipmodule (PMID: 23424137). L'obiettivo di questo TASK è quello di scoprire la sequenza consensus dei miRNA legati da Ape1, al fine di inferire ulteriori possibili miRNA espressi in diversi modelli cellulari. Verranno condotti studi di Gene networking per prevedere i possibili bersagli di mRNA dei miRNA legati e influenzati dall'espressione di Ape1. Per questo obiettivo, utilizzeremo diversi strumenti, come l'analisi PicTAR e l'analisi attraverso Ingenuity Pathway, integrando i risultati nell'ambiente statistico R.

TASK 1.4 Prioritizzazione dei miRNA da studiare più approfonditamente. Una volta identificato, l'elenco dei miRNA direttamente legati (Tasks 1.1 e 1.3) e disregolati dopo silenziamento di Ape1 (Task 1.2.) o modulati da vari agenti genotossici testati, verrà confrontato con i profili di espressione genica già descritti in precedenti lavori. Questo evidenzierà i geni target candidati (GOI) regolati da Ape1 a livello post-trascrizionale attraverso la regolazione dei miRNA e coinvolti nel ruolo di Ape1 nella chemioresistenza delle cellule tumorali. L'espressione di miRNA e GOI sarà correlata con quella dei tumori in cui Ape1 è deregolamentato (cioè HCC, NSCLC, AML, carcinoma mammario, gliomi), interrogando database pubblici per definire le firme geniche dei tumori aggressivi associati all'espressione di Ape1, prestando particolare attenzione a quei miRNA coinvolti nella chemioresistenza. Da questa analisi, limiteremo ulteriormente il numero di miRNA da studiare a <10-15.



Task 1.5 Convalida delle analisi NGS. Per convalidare le analisi NGS, gli esperimenti qPCR verranno eseguiti sui risultati migliori determinati tramite il Task 1.4, anche stimando l'efficacia della relazione tra i miRNA selezionati e i loro geni target noti (GOI). Questi studi utilizzeranno differenti mutanti di Ape1 e linee di cellule di cancro ricostituite con Ape1 sopra descritte e sottoposti a controllo incrociato con altri modelli di cellule tumorali già disponibili (JHH6, HepG2, A549, utilizzando i dati HeLa come controllo di riferimento) e cellule AML in cui Ape1 è funzionalmente deregolato dall'aploinsufficienza di NPM1 (cioè OCI / AML2 e AML3). Al fine di escludere qualsiasi bias dovuto alla presenza di bassi livelli residui di espressione di Ape1 nei modelli di cellule kd, utilizzeremo una linea cellulare B di topo, knock out per APE1 (APE1 Δ / Δ / Δ CH12F3) e i suoi controlli normali isogenici (wt) (APE1 + / Δ / Δ e APE1 + / + / +) attualmente disponibili nel nostro laboratorio. Il modello di cellule knock out sarà anche utile nei saggi di ricostituzione con mutanti funzionali Ape1 descritti sopra per testare tutti i dettagli molecolari e per generalizzare i risultati ottenuti.

TASK 1.6 Integrazione dei dati mediante analisi bioinformatica. Durante il progetto, integreremo costantemente i nostri dati provenienti sia da analisi ad alta produttività che da esperimenti su piccola scala, attraverso strumenti e set di dati pubblici disponibili.

Risultati attesi: verrà ottenuto un elenco di miRNA regolato direttamente da Ape1 durante vari trattamenti genotossici delle linee cellulari tumorali e verrà sviluppato un elenco di geni bersaglio Ape1 (GOI) regolati da Ape1 attraverso l'espressione di miRNA. Questi dati saranno utili come ulteriori strumenti prognostici in modo da fornire più prove per convalidare le nuove funzioni di Ape1 nella progressione del cancro utilizzando: i) una banca dati NSCLC derivante da un progetto già in corso (AIRC-IG19862); ii) banche dati AML; iii) set di dati di mammella e glioma.

WP2. Caratterizzazione della rete di interazioni proteiche di APE1 coinvolta nella regolazione dei miRNA identificati. TT: M 1-24. In questo WP, sarà ottenuta una lista completa di interazioni proteiche, che regolano le funzioni di Ape1 nella chemoresistenza attraverso la modulazione dei miRNA identificati, attraverso studi di proteomica funzionale.

Task 2.1 Analisi di proteomica funzionale per il dettaglio del ruolo dell'interattoma-proteina-proteina (PPI) di Ape1 nelle cellule tumorali, in particolare per quanto riguarda la maturazione / processamento dei miRNA identificati prima. Attualmente, l'interattoma di Ape1 comprende poche dozzine di proteine, molte delle quali identificate da noi con uno studio di analisi proteomica basato su gel. Verranno eseguiti esperimenti di proteomica quantitativa basati su MS per aumentare il numero di proteine e rivelare differenze nella loro abbondanza relativa tra campioni biologici distinti. Esperimenti specifici saranno condotti su complessi di Ape1 ottenuti da compartimenti subcellulari nucleari e citosolici, che sono già stati isolati in modo efficiente nel laboratorio del PI. La rete di interattoma di Ape1 wt sarà confrontata con quella di Ape1 Δ 33 e di varianti polimorfiche associate al cancro (D283G e R237C). La convalida dei dati di interazione sarà ottenuta su linee cellulari tumorali ricostituite A549, JHH6, HCT116 e HeLa disponibili. Verranno analizzate cellule trasfettate in condizioni basali, e dopo trattamento con alchilanti, stress ossidativo e radiomimetici. Per le proteine selezionate, verrà eseguita anche una stima quantitativa dell'interazione tramite PLA.

Task 2.2 Generazione della rete di interazione miRNA-proteina. Utilizzando gli strumenti del database STRING (<http://string-db.org>), progetteremo una rete di interazione Ape1 aggiornata che possa aiutare a comprendere la funzione di Ape1 nel metabolismo dei miRNA. Gli interattori di miRNA identificati saranno anche analizzati tramite il database RAID (<http://www.rna-society.org/raid>) al fine di sezionare la pathway di interazione associata ad Ape1-miRNA e determinarne il suo significato funzionale in cellule tumorali.



Risultati attesi: definiremo e caratterizzeremo biochimicamente il ruolo degli PPI di Ape1 nelle pathway di processamento di miRNA, definendo molecole e determinanti strutturali coinvolti in queste interazioni. Questi risultati chiariranno il ruolo di Ape1 nella biologia dei miRNA e saranno cruciali per lo sviluppo di nuovi modulatori delle funzioni di Ape1 nel metabolismo dei miRNA.

WP3. Definizione dei requisiti strutturali responsabili dell'interazione di Ape1 con i pri-miRNA target, utilizzando il pri-miRNA-221 / Ape1 come modello di partenza. TT: M 6-24.

Gli studi di RIP-seq forniranno un pannello di 10-15 sequenze di pri-miRNA che saranno impiegate in saggi di legame con Ape1. Attraverso approcci biochimici, l'interazione diretta di Ape1 con pri-miRNA identificati, sarà approfondita, usando il pri-miRNA 221 come modello di partenza.

Task 3.1 Indagini strutturali su pri-miRNA e pre-miRNA. L'elenco dei miRNA regolati da Ape1, ottenuti in WP1, permetterà di definire le sequenze nucleotidiche minime in grado di interagire con Ape1. Le sequenze pri-miRNA saranno analizzate attraverso strumenti bioinformatici per identificare potenziali elementi strutturali secondari (hairpin loop, ecc.) Come entità preferenziali per Ape1; Gli esperimenti di CD verificheranno queste informazioni.

Task 3.2 Progettazione e analisi di analoghi di miRNA in grado di legare Ape1. Per convalidare i potenziali ruoli di elementi di struttura secondaria, le sequenze nucleotidiche recanti strutture secondarie peculiari e / o con specifiche alterazioni di sequenza (sostituzioni di basi, inserimento di siti abasici) saranno valutate per la loro capacità di legarsi ad Ape1. Il Pri-miR221 sarà utilizzato come un modello paradigmatico, ma verranno studiate anche altre sequenze (dall'attività 2.4).

Risultati attesi: saranno chiariti il ruolo e i determinanti strutturali delle sequenze primarie e secondarie di miRNA e Ape1 nella modulazione dell'interactoma di Ape1 / miRNA.

WP4. Analisi della correlazione tra l'espressione di Ape1, i miRNA regolati, i geni target ed i partners di PPI utilizzando set di dati su varie tipologie di tumori disponibili, per identificare nuovi biomarcatori predittivi. TT: M 6-18. In questo WP, integreremo diverse fonti di dati: i) i risultati ottenuti nel progetto; ii) dati esterni da set di dati pubblici disponibili; iii) dati clinici da set di dati pubblici disponibili; iv) modelli biologici dalla letteratura. L'obiettivo di questo WP è di ottenere un elenco di biomarkers affidabili associati alla progressione del tumore.

Task 4.1 Recupero di dati esterni per i geni interessanti del progetto. Raccoglieremo le informazioni disponibili in set di dati pubblici per i geni ottenuti dai precedenti WP. In particolare, i dati di alterazione dell'espressione genica e mutazioni (varianti di singoli nucleotidi somatici, INDEL e numeri di copie) saranno recuperati da Cancer Genome Atlas, Cancer Expression Atlas o espressione di gene Omnibus. Il livello di espressione proteica sarà ottenuto dall'archivio PRoteomics IDentifications e dal database Protein Atlas. In particolare, ci concentreremo sulla raccolta primaria di tumore / metastasi e sui modelli di cancro in vivo.

Task 4.2 Analisi di correlazione e integrazione dei dati. Come primo passo, utilizzeremo i dati ottenuti nel Task 5.1 per eseguire la validazione e l'analisi esplorativa nei dataset tumorali. Per prima cosa eseguiranno, come i test di correlazione, per convalidare le prove ottenute in esperimenti basati su cellule. Quindi, combineremo i dati ottenuti dai singoli strati biologici (mRNA / proteina / miRNA / mutazione) usando metodi disponibili.

Task 4.3 Correlazione con la prognosi. I risultati ottenuti nel Task precedente (compresi i geni e le loro reti) saranno valutati in pazienti con cancro con sovraespressione di Ape1 e, in particolare, in pazienti trattati con agenti chemioterapici. Verranno eseguite analisi di associazione tra variabili cliniche



disponibili e geni identificati o pattern di rete per cercare l'arricchimento delle caratteristiche cliniche nei sottotipi di pazienti. Inoltre, verrà eseguita l'analisi di sopravvivenza univariata, utilizzando le curve di Kaplan-Meier (log-rank test), considerando diversi trattamenti e pazienti stratificanti in base ai geni identificati e ai pattern di network.

Risultati attesi: Verranno ottenuti i parametri di correlazione dell'espressione di Ape1 con i suoi partner interagenti e con i miRNA identificati. Verranno ottenute delle reti geniche integrate che descrivono la biologia di Ape1 nei modelli tumorali. Sarà identificato il tasso di risposta / sopravvivenza dei pazienti con cancro con sovraespressione Ape1 trattati con agenti chemioterapici ai nuovi biomarcatori predittivi identificati. Queste analisi metteranno in evidenza i più interessanti (almeno 5) partner PPI e miRNA (almeno 10) da includere in ulteriori WP.

WP5. Valutazione dell'effetto di inibitori delle funzioni di Ape1 basate sulla sua rete di Interattomica (cioè proteine e pri-miRNA) e confronto con gli inibitori già disponibili utilizzando linee cellulari tumorali e organoidi tumorali. TT: M24-36. I composti identificati nel WP5 e altri inibitori specifici di Ape1 noti che mirino a diverse funzioni Ape1 (redox e riparazione-attualmente negli studi clinici come antitumorali-così come gli inibitori di Ape1/NPM1-sviluppati nel laboratorio di PI) saranno testati per la loro specificità d'azione sui geni bersaglio Ape1 e sui suoi partner di legame proteico (da solo o in combinazioni razionali), per valutare potenziali effetti sinergici.

Task 5.1 Valutazione dell'effetto degli inibitori di Ape1/NPM1, dell'inibitore redox e dell'inibitore dell'attività endonucleasica di riparazione del danno al DNA sulla rete funzionale proteica e dei corrispondenti potenziali sinergismi mediante l'utilizzo di linee cellulari tumorali. Valuteremo la specificità degli inibitori di Ape1 nel processamento dei miRNA identificati, nella proliferazione delle cellule t, confrontando le loro attività sulla rete funzionale Ape1 coinvolta nella chemioresistenza e stabilità proteica. Verranno utilizzate linee di cellule tumorali A549, JHH6, HeLa e HCT116, nonché altre linee di cellule tumorali disponibili nel laboratorio del PI, come descritto sopra. La specificità dei composti sarà verificata sugli interattori di Ape1 e NPM1 (come l'interazione NPM1 / ARF). Verranno inoltre studiati gli effetti degli inibitori sui geni regolati da Ape1 associati alla chemioresistenza (dal WP1) per escludere l'insorgenza di meccanismi adattativi agli agenti chemioterapici utilizzati. La valutazione di una possibile sinergia tra gli inibitori del complesso Ape1 / NPM1 e gli inibitori noti dell'attività redox (E3330) e della funzione di riparazione del DNA di Ape1 (come:MX, composti # 52 e # 3) sarà effettuata attraverso test di sensibilizzazione, di vitalità cellulare e saggi di tumorigenesi.

Task 5.2 Valutazione degli effetti degli inibitori di Ape1 / pri-miRNA e / altre proteine nel modello in vitro 3D di organoidi di cancro del colon. Per convalidare i dati dall'attività 4.1, studieremo l'attività degli inibitori di Ape1 su organoidi tumorali di CRC. In dettaglio, eseguiremo test di vitalità su organoidi tumorali derivati dal paziente mediante trattamenti con i diversi inibitori di. La sensibilità ai composti sarà associata al profilo di mutazione del tumore del paziente. Una raccolta di organoidi tumorali dal cancro del colon è disponibile nel PI's Lab.

Risultati attesi: Caratterizzazione dell'attività, sui miRNA identificati, degli inibitori noti di Ape1-redox e Ape1-DNA-repair nel bloccare la proliferazione delle cellule tumorali e aumentare la sensibilizzazione ad agenti genotossici che usano linee cellulari di cancro del colon e organoidi CRC. Questo progetto implementerà in modo significativo gli attuali approcci traslazione per la terapia combinata del cancro che si basano sul targeting di Ape1 e rappresenterà una pipeline di riferimento per ulteriori studi mirati a bersagliare ruoli non canonici di complessi di riparazione del DNA per la terapia del cancro.

Durata del Progetto: 3 anni



Title of the Project:

Molecular characterization on non canonical roles of the BER protein Ape1 in miRNA processing through Functional Proteomics and Transcriptomics approaches in cancer cell lines and 3D organoids.

Description of the Project:

Ape1 is essential in cancer cells for its role in the maintenance of the genome stability through BER, and in the regulation of the expression of genes involved in tumor progression and chemoresistance. We recently found that Ape1 regulates the expression of onco-miRNAs involved in cancer resistance. Ape1 is an emerging target for combination therapy of cancers (ovarian, neurologic, hepatic and lung tumors) by means of inhibitors of its DNA-repair and/or redox functions. The limited information available on its involvement in cancer development and chemoresistance, including the functional role of several polymorphisms, precludes the possibility to translate knowledge on this protein from benchtop to bedside. Moreover, the inhibitors used so far have a limited specificity. Protein-protein interactions (PPIs) and post-translational modifications specifically modulate the different functions of Ape1 in cancer cells. As an example, we found that Ape1/NPM1 association, which is altered in different cancer cells (i.e. in AML), modulates tumor cell response to genotoxicants and regulates cell proliferation. Relevant advances from our recent data show that neglected non-canonical roles of Ape1, which are associated with miRNA metabolism and its interactome network, may play an essential function in cancer resistance.

The underlying hypothesis of this project is that the alteration of Ape1-regulated miRNA profile as well as the impairment of its interactome network, may mediate cancer cell resistance to chemotherapy. Thus, a detailed molecular characterization of cellular mechanisms in which Ape1 is involved represents the starting point for powerful therapeutic strategies for combination therapy of cancer, based on the functional impairment of the Ape1 functional network.

The proposal involves an integrated approach of NGS (Next Gene Sequencing), Functional Proteomics and biochemical/biological characterizations coupled to the identification of new compounds able to modulate Ape1's functions through in vitro and cellular screening platforms employing cancer cell lines and tumor organoids. It intends to:

- 1) Identify miRNAs directly regulated by Ape1 during genotoxic stress that are involved in cancer resistance and define the consensus binding motif through CLIP-seq analysis in HeLa and HCT116 cancer cell lines.
- 2) Characterize the Ape1 protein interactome network responsible for miRNA regulation.
- 3) Define the structural requirements responsible for the interaction of Ape1 with the target pri-miRNA.
- 4) Correlate the expression of Ape1 with its regulated miRNAs, target genes and protein interacting partners using cancer expression data sets to identify new predictive biomarkers.
- 5) Evaluate the effects of the available inhibitors of the Ape1 different functions in sensitizing cancer cell lines and colon cancer organoids to combination therapy agents through testing their activity on the Ape1 interactome.

This project is organized into 5 Work packages (WP).

WP1. Identification of miRNA sequences directly regulated by Ape1 in HeLa and HCT116 colon cancer cell lines and involved in cancer cell resistance to chemotherapy. Total Time-frame: months 1-36 of the project (TT: M1-36). This aim will be developed through deep sequencing approaches based on CLIP-seq analyses coupled to gene expression studies, by comparing HeLa cells, as a reference cancer cell model and A549 (from NSCLC) and JHH6 (from HCC) and HCT116 colon cancer cell lines.

Task 1.1 Identification of Ape1-bound miRNA-sequences through RNA-CLIP and NGS approaches. HeLa, A549, JHH66 and HCT116 cell lines, reconstituted with a Flag-tagged Ape1, will be used to



immuno-precipitate Ape1-RNA complexes. These models allow the silencing of endogenous Ape1 and the re-expression of a recombinant (siRNA-resistant) form to a similar extent of the endogenous one, avoiding biases for protein overexpression. These analyses will be performed to identify both small miRNA and their immature form pri-miRNA specifically bound by Ape1. To distinguish PCR duplicates of the same RNA fragment, a modification of protocol will be used to generate small RNA libraries for NGS. To avoid biases due to the binding of Ape1 to rRNAs, an Ape1 mutant unable to accumulate within nucleoli and to bind rRNAs, but still able to bind c-Myc RNA and pri-miR221/222, will be used. These experiments will be performed under normal and genotoxic stress conditions to identify miRNAs involved in genotoxic cell response. Bioinformatic analyses using golden standard pipelines with specific tools: fastQC for quality assessment, bwa or star for the alignment; HT-seq or salmon for the quantification steps will be employed.

Task 1.2 Determination of the profile of miRNAs expression dependent on Ape1. Pair-wise differential expression (DE) analysis of miRNAs from Ape1-expressing and Ape1-depleted cells will be performed with gold-standard DE pipelines based on Bioconductor software packages. In addition, differential miRNAs profiling analyses will be performed using the Nanostring technology and its package within Bioconductor. The most reliable candidate miRNAs will be validated through qPCR analysis. The panel of identified miRNAs represent reliable candidate targets for Ape1-mediated regulation and will be cross-checked with data obtained from Task 1.1 to restrict further analyses.

Task 1.3 Bioinformatic identification of the putative miRNAs consensus bound by Ape1 and gene networking studies. Data obtained by the NGS experiments will be passed through a pipeline for binding motif predictions. In particular, we will use an integrated approach using several tools: TOMTOM suite, Weeder (PMID: 15215380) and Chipmodule (PMID: 23424137). The goal of this task is to discover the DNA consensus of the bound miRNAs in order to infer additional possible miRNAs expressed in different cell models. Gene networking studies will be performed to predict the possible mRNA targets of the miRNAs bound and affected by Ape1 expression. To perform this step, we will use several tools, like PicTAR and Ingenuity Pathway analysis, integrating the results in R statistical environment.

Task 1.4 Prioritization of miRNAs to be further investigated. Once identified, the list of miRNAs, directly bound (Tasks 1.1 and 1.3) and dysregulated upon Ape1 silencing (Task 1.2.) or modulated by tested genotoxicants, will be cross-checked with the gene expression profiles already described^{10,11}. This will highlight candidate target genes (GOI) regulated by Ape1 at the post-transcriptional level through miRNAs regulation and involved in Ape1's role in chemoresistance of cancer cells. The expression of miRNAs and GOI will be correlated with that of cancers in which Ape1 is deregulated (i.e. HCC, NSCLC, AML, breast cancer, gliomas), interrogating public databases to define gene signatures of aggressive cancers associated with Ape1, deserving a particular attention to those miRNAs involved in chemoresistance. From this analysis, we will restrict the number of miRNAs to be further studied to <10-15.

Task 1.5 Validation of the NGS analyses. To validate NGS analyses, qPCR experiments will be performed on the top hits determined through Task 1.4, also by estimating the effectiveness of the relationship between the selected miRNAs and their known target genes (GOI). These studies will use different Ape1 mutants and Ape1-reconstituted-cancer cell lines described above and crosschecked with other cancer cell models already available (JHH6, HepG2, A549, using HeLa data as a reference control) as well as AML cells in which Ape1 is functionally deregulated by NPM1 haploinsufficiency (i.e. OCI/AML2 and AML3). In order to exclude any bias due to the presence of residual low levels of Ape1 expression in the kd-cell models, we will take advantage of an *APE1* knock out mouse B cell line (*APE1*^{Δ/Δ} CH12F3) and its isogenic wild type (wt) controls (*APE1*^{+/Δ} and *APE1*^{+/+}) currently available



in our laboratory. The knock out cell model will be also useful in reconstitution assays with Ape1 functional mutants described above to test all the molecular details as well as to generalize our findings.

Task 1.6 Bioinformatics data integration. During the project, we will constantly integrate our data coming both from high-throughput analyses and small-scale experiments altogether to public available tools and datasets.

Deliverables: A list of miRNA directly regulated by Ape1 during genotoxic treatments of cancer cell lines and a list of Ape1 target genes (GOI) regulated by Ape1 through miRNAs expression will be developed. These data will be helpful as further prognostic tools providing more evidences to validate new functions for Ape1 in cancer progression using: i) an NSCLC data bank deriving from an already ongoing project (AIRC-IG19862); ii) AML databanks; iii) breast and glioma datasets.

WP2. Characterization of APE1 protein interactome network involved in miRNA regulation. *TT: M 1-24.* Here, a complete list of protein interactors, regulating Ape1 functions in chemoresistance through miRNAs processing, will be obtained through functional proteomics studies.

Task 2.1 Functional Proteomics analyses for detailing the role of Ape1 protein-protein interactome (PPI) in cancer cells, particularly with respect to miRNA maturation/processing. Currently, Ape1's interactome comprises few dozen proteins, most of them identified by us with a gel-based proteomic workflow. MS-based quantitative proteomic experiments will be performed to enlarge the number of proteins and to reveal differences in their relative abundance among distinct biological samples. Specific experiments will be performed on Ape1 complexes from nuclear and nucleolar subcellular compartments, which were efficiently isolated by us. The interactome network of Ape1 wt will be compared with that of Ape1 Δ 33, and of cancer associated polymorphic variant(s) (D283G and R237C). Validation of interactomic data will be obtained on A549, JHH6, HCT116 and HeLa reconstituted cancer cell lines available. Transfected cells under basal, as well as upon oxidative alkylating, or radiomimetic stress conditions will be analyzed. For selected proteins, a quantitative estimation of the interaction will be also performed through PLA.

Task 2.2 Generation of miRNA-protein interaction network. By using STRING database tools (<http://string-db.org>), we will design an updated Ape1 interaction network that may help in understanding the function of Ape1 in miRNA metabolism. Identified miRNAs interactors will be also analyzed through RAID database (<http://www.rna-society.org/raid>) in order to dissect the Ape1-miRNA-associated interaction trajectory and determine its functional significance in the whole RNA-associated interaction network of cancer cells.

Deliverables: We will define and biochemically characterize the role of Ape1 PPIs in miRNA pathways, defining molecules and structural determinants involved in these interactions. These findings will elucidate the role of Ape1 in miRNA biology and be crucial for developing novel modulators of Ape1 functions in miRNAs metabolism.

WP3. Definition of the structural requirements responsible for the interaction of Ape1 with the target pri-miRNAs using the pri-miRNA-221/Ape1 as a starting model. *TT: M 6-24.*

RIP studies will provide a panel of 10-15 pri-miRNAs sequences that will be employed in binding assays with Ape1. Through biochemical approaches, the direct interaction of Ape1 with identified pri-miRNAs, will be deeply investigated, using pri-miRNA 221 as starting model.



Task 3.1 Structural investigations of pri-miRNAs and pre-miRNA. The list of Ape1-regulated miRNAs, obtained in WP1, will allow to define the minimum nucleotide sequences able to interact with Ape1. The pri-miRNA sequences will be analyzed through bioinformatic tools to identify potential secondary structure elements (hairpin loop, etc.) as preferential entities for Ape1; CD experiments will check these indications.

Task 3.2 Design and analysis of analogues of miRNAs able to bind Ape1. To validate potential roles of secondary structure elements, nucleotide derivatives bearing peculiar secondary structures and/or with specific sequence alterations (base replacements, insertion of abasic sites) will be evaluated in their ability to bind to Ape1. Results from task 3.2 will be also exploited to design potential inhibitors of the pri-miRNA/Ape1 interaction (see WP4). Pri-miR221 will be assumed as a paradigmatical model⁴, but other sequences (from task 2.4) will be investigated.

Deliverables: The role and structural determinants of miRNA and Ape1 primary and secondary sequences in modulating the Ape1/miRNAs interactome will be elucidated.

WP4. Analysis of the correlation among the expression of Ape1, regulated miRNAs, target genes and PPI partners using cancer data sets to identify new predictive biomarkers. *TT: M 6-18*. Here, we will integrate different sources of data: i) the results obtained in the project; ii) external data from public available datasets; iii) clinical data from public available datasets; iv) biological models from literature. The goal of this WP is to obtain reliable biological-driven biomarkers associated with tumor progression.

Task 4.1 Retrieve of external data for the interesting genes of the project. We will gather the information available in public datasets for the genes obtained from previous WPs. In particular, gene expression and mutation aberration data (somatic single nucleotide variants, INDELs and copy numbers) will be retrieved from The Cancer Genome Atlas, Cancer Expression Atlas or Gene expression Omnibus. Protein expression level will be obtained from PRoteomics IDentifications archive and Protein Atlas database. In particular, we will focus on primary tumor/metastasis collection and on *in vivo* cancer models.

Task 4.2 Correlation analyses and data integration. As a first step, we will use the data obtained in Task 6.1 to perform validation and exploratory analysis in tumor datasets. First, we will perform, such as correlation tests to validate the evidences obtained in cell-based experiments. Then, we will combine the data obtained from individual biological layers (mRNA/protein/miRNA/mutation) using Similarity network fusion methods and subtyping through Ranked Factorisation.

Task 4.3 Correlation to prognosis. The results obtained in the previous task (including genes and their networks) will be evaluated in Ape1-overexpressing cancer patients and, in particular, in patients treated with chemotherapy agents. Association analysis between available clinical variables and identified genes or network patterns will be performed to search for enrichment of clinical features in patient subtypes. In addition, univariate survival analysis considering different treatments and stratifying patients by the identified genes and network patterns will be performed using the Kaplan-Meier estimator (log-rank test).

Deliverables: Correlative parameters of the expression of Ape1 with its interacting partners and with the identified miRNAs. Integrated gene networks describing the Ape1 biology in tumor models. The response rate/survival of Ape1-overexpressing cancer patients treated with chemotherapy agents to the identified new predictive biomarkers will be identified. These analyses will highlight the most interesting (at least 5) PPI partners and miRNAs (at least 10) to be included in further WPs.



WP5. Evaluation of the effect of the new inhibitors of Ape1 functions based on its interactome network (i.e. proteins and pri-miRNAs) and comparison with the already available inhibitors using cancer cell lines and tumor organoids. TT: M24-36. Known Ape1-specific inhibitors targeting different Ape1 functions (redox and repair - currently in clinical trials as anticancers - as well as inhibitors of Ape1-NPM1 - developed in PI's Lab) will be tested for their specificity of action on Ape1 target genes and on its protein binding partners (alone or in rational combinations), to evaluate potential synergistic effects.

Task 5.1 Evaluation of the effect of Ape1/NPM1, Ape1-redox and Ape1-DNA-repair inhibitors on protein functional network and of the potential corresponding synergisms using cancer cell lines. We will assess the specificity of the known Ape1-redox and Ape1-DNA-repair inhibitors, by comparing their activities on Ape1 functional network involved in chemoresistance and protein stability. A549, JHH6, HeLa and HCT116 cancer cell lines will be used, as well as other cancer cell lines available in the PI's Lab, as described above. The specificity of compounds will be verified in Ape1 and NPM1 interactomes (as example NPM1/ARF interaction). The effects of the inhibitors on Ape1-regulated genes associated with chemoresistance (from WP1) will be also investigated to exclude the onset of adaptive processes to chemotherapy. The evaluation of a possible synergy among the Ape1/NPM1 complex inhibitors and known inhibitors of the redox (i.e. E3330) and of the DNA-repair function of Ape1 (i.e. MX, compounds #52 and #3) will be performed through sensitization, cell viability and tumorigenic assays.

Task 5.2 Evaluation of the effects of inhibitors of Ape1 /pri-miRNA and /other proteins in *in vitro* 3D organoid colon cancer model.

To validate the data from task 3.1, we will investigate the activity of the Ape1 inhibitors on tumor CRC organoids. In detail, we will perform viability assay on patient-derived tumor organoids upon treatments with Ape1-redox and Ape1-DNA-repair inhibitors. The sensitivity to the compounds will be associated with the tumor mutation profile of the patient. A collection of tumor organoids from colon cancer is available in the PI's Lab.

Deliverables: Understanding the role of known Ape1-redox and Ape1-DNA-repair inhibitors, mediated by miRNA regulation and target gene alteration, in blocking tumor cell proliferation and increasing sensitization to genotoxic agents using colon cancer cell lines and CRC organoids.

This project will significantly implement current translational approaches for the combination therapy of cancer that rely on Ape1 targeting and will represent a paradigmatic pipeline for further studies aimed at targeting non-canonical roles of DNA repair complexes for cancer therapy.

Duration of the Project: 3 yrs