



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI TRIESTE

Dipartimento di SCIENZE DELLA VITA

Contributi per la ricerca clinica, traslazionale, di base, epidemiologica e organizzativa, di cui all'articolo 15, comma 2, lettera b), della LR 17/2014.

Progetto "Nuovi biomarcatori e potenziali target per migliorare la diagnosi e il trattamento del tumore alla mammella triplice negativo. Acronimo: TNBCneo" - CUP J93C17000350002

RELAZIONE FINALE DELLE ATTIVITA'

Obiettivo generale

Descrivere come l'obiettivo generale di progetto sia stato raggiunto.
Compilare la parte sottostante non superando i 2000 caratteri

L'obiettivo generale del progetto era quello di identificare e validare fattori critici per la progressione del tumore alla mammella triplice negativo che potessero essere traslati a livello clinico come potenziali bersagli da parte di farmaci specifici e/o come biomarcatori. Questo obiettivo è stato raggiunto attraverso lo studio integrato di diverse pathway cellulari in diversi modelli di tumore alla mammella di tipo triplice negativo (TNBC) mediante approcci di biochimica, biologia cellulare e biologia molecolare.

Obiettivi specifici

Descrivere come gli obiettivi specifici sia siano raggiunti.
Compilare la parte sottostante non superando i 2000 caratteri

Gli obiettivi individuati nel progetto ricadevano sia nell'ambito della ricerca di base che nella sua traslabilità nella pratica clinica. In particolare il progetto si proponeva di:

1. comprendere in modo più approfondito quali siano i **network molecolari critici** nel sostenere l'aggressività del tumore alla mammella triplice negativo (TNBC);

2. identificare **nuovi biomarcatori di carattere prognostico** per il TNBC;
3. identificare **nuovi biomarcatori di carattere predittivo** in particolare per quanto concerne la risposta alla chemioterapia con derivati del platino in TNBC;
4. identificare **bersagli terapeutici** “druggable” in modelli murini di TNBC (PDX e/o modelli singenici con cellule di tumore della mammella murine E0771 e/o modelli ortotopici con cellule di tumore della mammella umane, in topi nudi).

I partner hanno compiuto studi molecolari e biochimici usando modelli cellulari TNBC ampiamente riconosciuti e ben caratterizzati, ma anche su linee primarie derivate da espunti di tumori. Sono stati anche generati modelli complessi di xenotrapianto in animali (PDX).

In questi modelli, applicando metodiche di genomica e biologia cellulare sono stati scoperti diversi circuiti molecolari rilevanti per la crescita, l'aggressività e la resistenza alle terapie di queste linee cellulari. Tali scoperte sono potenzialmente applicabili ai tumori TNBC nella clinica.

Ognuno dei partner coinvolti ha condotto studi focalizzati su alcuni specifici circuiti genici, così che alla fine del periodo progettuale è stata definita una rosa di promettenti biomarcatori e potenziali bersagli farmacologici di interesse clinico per il tumore TNBC.

Questi risultati, la cui validità scientifica è confermata dalla pubblicazione su riviste internazionali soggette a rigorosa revisione da pari (peer reviewed), forniscono solide basi concettuali per il futuro sviluppo ed applicazione in ambito clinico.

Risultati raggiunti nello stadio finale di avanzamento progettuale, indicatori e fonti di verifica

Obiettivo Specifico	Risultato Raggiunto	Indicatore di valutazione	Fonte di Verifica
Produzione dei dati di espressione genica.	Analisi bioinformatica dei dati di RNA-seq provenienti da modelli cellulari TNBC silenziati per HMGA1.	Dati di espressione differenziale disponibili. Validazione in qRT-PCR in modelli cellulari di TNBC.	Database DSV.
	Identificazione di lncRNA coinvolti nella regolazione delle HMGA.	Caratterizzazione dell'attività dei lncRNA nella regolazione dell'espressione delle HMGA.	Dati pubblicati in Ros et al., Front Oncol 2020.
	Analisi bioinformatica dei dati provenienti da modelli cellulari rispondenti al platino in maniera USP1 dipendente.	Identificazione di biomarcatori di attività.	Dati pubblicati in Sonogo et al., Science Advances 2019. Database CRO.
	Analisi bioinformatica dei dati di espressione genica provenienti da modelli cellulari TNBC con mutazione di TP53, dopo silenziamento di mutp53.	Dati di espressione differenziale, validazione di geni regolati da mutp53 mediante RT-qPCR.	Database LNCIB dei risultati sperimentali.
	Analisi bioinformatica dei dati provenienti da database di tumori mammari umani.	Identificazione di marcatore prognostico di sopravvivenza in pazienti con tumore della mammella.	Dati pubblicati in Citron et al., Cancer Res 2020.

	Analisi bioinformatica di sequenziamento genico su tumori mammari umani mediante tecnologia NGS.	Identificazione di marcatore prognostico di sopravvivenza in pazienti con tumore della mammella non TNBC.	Dati sottomessi per la pubblicazione. Database CRO.
Identificazione delle "pathways" critiche nel sostenere l'aggressività del TNBC	Identificati "network" molecolari governati da HMGA1 nel TNBC.	Analisi bioinformatica IPA (Ingenuity Pathway Analysis) disponibile.	Database DSV. Dati pubblicati in Sgarra et al., BBA Review 2018. Dati pubblicati in Sgarra et al., Cancer 2018.
	Identificati regolatori molecolari associati ad HMGA1 nel TNBC.	Dati sugli "upstream regulators" disponibili.	Dati sottomessi per la pubblicazione
	Identificazione dei miRNA coinvolti nella regolazione dei fattori HMGA.	Analisi dei miRNA che regolano l'espressione delle HMGA.	Dati pubblicati in Sgarra et al., IJMS 2020.
	Identificato un "network" molecolare indotto dalla chemioterapia con platino che in cellule TNBC assicura la sopravvivenza alla chemioterapia.	Dati sulla regolazione trascrizionale e post-trascrizionale di USP1 e Snail disponibili.	Dati pubblicati in Sonego et al., Science Advances 2019.
	Identificati "network" molecolari regolati da p53 in risposta a diversi stress (ossidativo, del reticolo endoplasmico).	Dati di espressione differenziale.	Dati pubblicati in Lisek et al., Oncotarget 2018 e dati sottomessi per la pubblicazione
Validazione in vitro delle "pathways" trovate	Confermati in linee cellulari i dati ottenuti dalle analisi bioinformatiche.	Dati sulla valutazione dell'azione sinergica di HMGA1 e di FOXM1 sulla regolazione genica.	Dati pubblicati in Zanin et al., J Exp Clin Cancer Res 2019.
	Saggiato in linee cellulari di TNBC il ruolo del "network" genico sull'aggressività tumorale.	Azione sinergica di HMGA1 e di FOXM1 sull'angiogenesi tumorale.	Dati pubblicati in Zanin et al., J Exp Clin Cancer Res 2019.
	Ruolo di HMGA1 nel sostenere l'azione di modificatori epigenetici (RSK2 e CBP) in TNBC.	Caratterizzazione di HMGA1 nel sostenere l'azione di modificatori epigenetici (RSK2 e CBP) nella regolazione di un set di geni coinvolti nella progressione tumorale in modelli cellulari TNBC in vitro.	Dati pubblicati in Penzo et al., Cancers 2019.
	Ruolo di HMGA1 nel regolare la plasticità meccanica della cromatina.	Caratterizzazione dell'attività di HMGA1 nel promuovere una maggior plasticità meccanica della cromatina di cellule TNBC in vitro attraverso la sua interazione funzionale con l'istone H1.	Dati pubblicati in Senigaglia et al., IJMS 2019.
	Ruolo di HMGA1 nel regolare l'azione di statmina in TNBC.	Caratterizzazione dell'asse HMGA1/p27/statmina nella modulazione delle proprietà migratorie di cellule TNBC in vitro.	Dati presenti in un manoscritto in fase di sottomissione. .
	Saggiato in linee cellulari di TNBC il ruolo del "network" genico USP1/Snail.	Azione sinergica di inibizione di USP1 e platino in modelli cellulari TNBC in vitro.	Dati pubblicati in Sonego et al., Science Advances 2019.

	Studi molecolari sul network regolato da p53 mutata nella risposta allo stress ossidativo in cellule TNBC.	Saggi funzionali in vitro, analisi biochimiche.	Publicato in Lisek et al., Oncotarget 2018.
	Studi molecolari sul "network" regolato da p53 mutata nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico in cellule TNBC.	Saggi funzionali in vitro, analisi biochimiche.	Publicato in Sicari et al., Oncogene 2019.
	Generazione di Modelli PDX TNBC.	Abbiamo generato 4 modelli PDX stabilizzati da pazienti TNBC.	Database CRO.
	Studi molecolari sul network regolato da p53 mutata nella risposta all'ipossia in cellule TNBC.	Saggi funzionali in vitro, analisi biochimiche.	Dati pubblicati in Capaci et al., Nature Communications 2020.
Identificazione di biomarcatori/gene signatures	Identificata una "signature" governata da HMGA1.	Validazione retrospettiva in dataset pubblici di pazienti con tumore alla mammella (TCGA).	Dati sottomessi per la pubblicazione
	Identificati "switch genes" del TNBC.	Caratterizzazione del network genico HMGA1, FOXM1 e MYBL2 nel promuovere il TNBC.	Dati sottomessi per la pubblicazione Database DSV.
	Identificato un asse HMGA1/p27/statmina in TNBC.	L'asse HMGA1/p27/statmina promuove la migrazione in cellule TNBC.	Dati sottomessi per la pubblicazione. Database DSV e CRO.
	Identificata una sinergia fra HMGA1 e FOXM1 in TNBC.	L'azione sinergica di HMGA1 su FOXM1 promuove l'angiogenesi in TNBC attraverso l'attivazione di un set di geni che comprende VEGFA.	Dati pubblicati in Zanin et al., J Exp Clin Cancer Res 2019.
	Identificata una sinergia fra HMGA1 e FOXM1 in TNBC.	La co-espressione di HMGA1, FOXM1 e VEGFA è un fattore prognostico negativo di sopravvivenza libera da metastasi a distanza e sopravvivenza libera da recidive in TNBC.	Dati pubblicati in Zanin et al., J Exp Clin Cancer Res 2019.
	Identificata una "signature" prognostica per pazienti con tumore TNBC.	L'espressione di 10 geni selezionati predice la sopravvivenza di pazienti TNBC ma non di pazienti con tumore ER+.	Dati pubblicati in Sonogo et al., Science Advances 2019. Deposito della domanda di brevetto per invenzione presentata in data 07.01.2019 con domanda n. 102019000000130 a Ufficio Italiano Brevetti e Marchi.
	Studio di p53 mutata nella risposta allo stress ossidativo in cellule TNBC.	Identificazione di "signature" di espressione genica.	Dati pubblicati in Lisek et al., Oncotarget 2018.

	Studio di p53 mutata nella risposta allo stress ossidativo in cellule TNBC.	Scoperto il ruolo del microRNA miR-30d nel modulare il profilo secretorio delle cellule TNBC e suo impatto nel modulare il microambiente tumorale. Identificazione di miR-30d come potenziale biomarker di aggressività e chemioresistenza.	Dati pubblicati in Capaci et al., Nature Communications 2020.
Identificazione di potenziali bersagli terapeutici	Identificazione di FOXM1 come fattore la cui attività è potenziata da HMGA1 in TNBC.	Il bersagliamento di HMGA1 in combinazione a FOXM1, in diversi modelli in vitro e in vivo, può rappresentare un'attraente opzione terapeutica nel TNBC.	Dati pubblicati in Zanin et al., J Exp Clin Cancer Res 2019. Dati sottomessi per la pubblicazione.
	Identificazione dell'asse HMGA1/p27/statmina come possibile target in TNBC.	Il bersagliamento dell'asse HMGA1/p27/statmina sensibilizza, in vitro e in vivo in un modello di topo nudo, al trattamento con paclitaxel.	Dati presenti in un manoscritto in preparazione. Database DSV e CRO.
	Identificazione di RSK2 e CBP come fattori epigenetici coinvolti nella progressione del TNBC la cui attività è modulata da HMGA1.	Utilizzo di inibitori di RSK2 e CBP per la modulazione della signature HMGA1-dipendente in cellule TNBC.	Dati pubblicati in Penzo et al. Cancers 2019.
	HMGA come possibili target nel cancro della mammella.	Analisi delle possibili strategie per interferire con l'attività delle HMGA nel cancro della mammella.	Dati pubblicati in Pegoraro et al., Exp Opin Therap Targets 2020.
	Identificazione di USP1 come possibile target terapeutico in tumori TNBC.	Il bersagliamento di USP1 in diversi modelli cellulari di tumore TNBC induce morte cellulare in vitro sia se usato da solo che in associazione a chemioterapia.	Dati pubblicati in Sonogo et al. Science Advances 2019. Database CRO.
	Studio di p53 mutata nella risposta ai farmaci che inducono stress del reticolo endoplasmatico in cellule TNBC.	Prova di principio che il trattamento combinato con inibitori di p53 mutata e inibitori del fattore ATF6 aumenta la sensibilità delle cellule TNBC ai farmaci che inducono stress proteotossico.	Dati pubblicati in in Sicari et al., Oncogene 2019.
	Studio di p53 mutata nella risposta allo stress ossidativo in cellule TNBC.	Scoperto il ruolo del microRNA miR-30d nel modulare il profilo secretorio delle cellule TNBC, e suo impatto nel modulare il microambiente tumorale. Identificazione di miR-30d come potenziale target per intervento terapeutico.	Dati pubblicati in in Capaci et al., Nature Communications 2020.

Quadro delle attività svolte (da scadenza intermedia a fine progetto)

Descrivere sinteticamente i contenuti delle attività progettuali svolte, indicando la durata ed i soggetti coinvolti nell'implementazione
 Compilare per ogni fase progettuale non superando 1000 caratteri per fase

Fase progettuale	Data prevista di inizio	Data prevista di fine	Attività svolta	Eventuali criticità riscontrate	Soggetti coinvolti nella fase progettuale
Analisi prospettica e retrospettica	01/05/2018	31/12/2019	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Validazione retrospettiva in dataset pubblici di pazienti con tumore alla mammella (TCGA); ◆ Identificazione e caratterizzazione di un network genico HMGA1, FOXM1 e MYBL2 nel promuovere il TNBC. La co-espressione di HMGA1, FOXM1 e VEGFA è un fattore prognostico negativo di sopravvivenza libera da metastasi a distanza e sopravvivenza libera da recidive in TNBC; ◆ Identificazione di una firma molecolare in grado di predire la sopravvivenza delle pazienti con tumore della mammella TNBC e la risposta alla chemioterapia con platino; ◆ Identificato miR-233 come marcatore di sopravvivenza in tumori mammari; ◆ Identificato CDKN1B come possibile marcatore di sopravvivenza in tumori mammari metastatici non TNBC. 		Sog. benef.: DSV. Partner: CRO. Partner: LNCIB.
Identificazione di potenziali bersagli terapeutici	01/06/2018	31/07/2020	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Identificato FOXM1 come fattore trascrizionale la cui attività è potenziata in TNBC; ◆ Identificato l'asse HMGA1/p27/statmina come possibile target in TNBC in particolare in combinazione con il paclitaxel; ◆ Validato inibitori di RSK2 e CBP come modulatori della signature HMGA1-dipendente in cellule TNBC; ◆ Analizzato possibili strategie per interferire con l'azione delle HMGA; ◆ Identificato USP1 come possibile bersaglio terapeutico in tumori TNBC; ◆ Identificato ATF6 come possibile bersaglio terapeutico per terapie combinate in tumori TNBC con p53 mutata; 		Sog. benef.: DSV. Partner: CRO. Partner: LNCIB.

Diffusione dei Risultati, trasferimento delle conoscenze

Descrivere come la ricerca è stata divulgata e con quali mezzi
 Compilare la parte sottostante non superando i 2000 caratteri

I risultati della ricerca sono stati divulgati principalmente attraverso pubblicazioni scientifiche su riviste a distribuzione internazionale e comunicazioni a congressi. In parallelo, è stata svolta una capillare attività di divulgazione in ambito accademico e presso i potenziali beneficiari nel mondo della sanità regionale.

Pubblicazioni:

- 1) Sgarra R, et al. High Mobility Group A (HMGA) proteins: Molecular instigators of breast cancer onset and progression. *Biochim Biophys Acta*. 2018 Apr;1869(2):216-229. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.03.001. Epub 2018 Mar 6. Review. PubMed PMID: 29518471.
- 2) Brunetti A, Manfioletti G. Editorial: Hormone Receptors and Breast Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Apr 2;10:205. doi: 10.3389/fendo.2019.00205. eCollection 2019. PubMed PMID: 31001204; PubMed Central PMCID: PMC6454855.
- 3) Fedele M, et al. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 4;20(11). pii: E2746. doi: 10.3390/ijms20112746. Review. PubMed PMID: 31167470.
- 4) Senigaglia B, et al. The High Mobility Group A1 (HMGA1) Chromatin Architectural Factor Modulates Nuclear Stiffness in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 4;20(11). pii: E2733. doi: 10.3390/ijms20112733. PubMed PMID: 31167352.
- 5) Penzo C, et al. HMGA1 Modulates Gene Transcription Sustaining a Tumor Signalling Pathway Acting on the Epigenetic Status of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 2;11(8). pii: E1105. doi: 10.3390/cancers11081105. PubMed PMID: 31382504; PubMed Central PMCID: PMC6721465.
- 6) Zanin R, et al. HMGA1 promotes breast cancer angiogenesis supporting the stability, nuclear localization and transcriptional activity of FOXM1. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Jul 16;38(1):313. doi: 10.1186/s13046-019-1307-8. PubMed PMID: 31311575; PubMed Central PMCID: PMC6636010.
- 7) Ros G, et al. HMGA2 Antisense Long Non-coding RNAs as New Players in the Regulation of HMGA2 Expression and Pancreatic Cancer Promotion. *Front Oncol*. 2020 Jan 17;9:1526. doi: 10.3389/fonc.2019.01526. eCollection 2019. PubMed PMID: 32010621; PubMed Central PMCID: PMC6978849.
- 8) Sgarra R, et al. High Mobility Group A (HMGA): Chromatin Nodes Controlled by a Knotty miRNA Network. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 22;21(3). pii: E717. doi:

10.3390/ijms21030717. Review. PubMed PMID: 31979076.

9) Pegoraro S., et al. Targeting the intrinsically disordered architectural High Mobility Group A (HMGA) oncoproteins in breast cancer: learning from the past to design future strategies. *Expert Opin Ther Targets* 2020 (in stampa).

10) Sonogo M, et al. USP1 links platinum resistance to cancer cell dissemination by regulating Snail stability. *Sci Adv.* 2019 May 8;5(5):eaav3235. doi: 10.1126/sciadv.aav3235

11) Sicari, D., et al., Mutant p53 improves cancer cells' resistance to endoplasmic reticulum stress by sustaining activation of the UPR regulator ATF6. *Oncogene*, 2019. 38(34): p. 6184-6195.

12) Capaci, V., et al., Mutant p53 induces Golgi tubulo-vesiculation driving a prometastatic secretome. *Nat Commun*, 2020. 11(1): p. 3945.

13) Citron F, et al. Downregulation of miR-223 Expression Is an Early Event during Mammary Transformation and Confers Resistance to CDK4/6 Inhibitors in Luminal Breast Cancer. *Cancer Res.* 2020 Mar 1;80(5):1064-1077.

Presentazioni a congressi o su altri canali di divulgazione:

1) Presentazione poster al 60° congresso SIC 19-22 settembre 2018 “HMGA1 and FOXM1 synergistically regulate a common gene network modulating angiogenesis in breast cancer”.

2) Preparato ed esposto poster che riporta le finalità del progetto in Istituto CRO-Aviano.

3) Diffuso a mezzo stampa e mediante social network la notizia della pubblicazione in Science Advance 2019 (e.g. <https://www.rainews.it/tgr/fvg/articoli/2019/05/fvg-tumore-ovaio-cro-aviano-ricidiva-scoperta-bloccare-d39e50ec-f4aa-45c7-94fc-6c89547c387e.html>).

4) Diffuso mediante social network la notizia della pubblicazione in Cancer Research 2020 (e.g. <https://aacr.altmetric.com/details/73112480>).

5) Diffuso attraverso il sito del Dipartimento di Scienze della Vita le pubblicazioni effettuate dai gruppi di ricerca inerenti a questo progetto (https://dsv.units.it/it/news-archivio/all_news).

Trasferibilità dei risultati e sostenibilità

Descrivere come i risultati siano trasferibili e le caratteristiche di sostenibilità del progetto

Compilare la parte sottostante non superando i 3000 caratteri

L'ottimizzazione delle cure per il tumore della mammella di tipo TNBC rappresenta un'urgente necessità in oncologia in quanto non sono stati ancora individuati bersagli selettivi per questo tipo di tumore. I risultati di questo progetto sono potenzialmente trasferibili e applicabili alla pratica clinica, in particolare per quanto concerne i seguenti punti:

L'identificazione di nuovi biomarcatori e bersagli terapeutici potrà stimolare lo sviluppo di sinergie con piccole e medie imprese regionali per lo sviluppo e la commercializzazione dei prodotti della ricerca, portando ad una accelerazione dello sviluppo e ad un aumento della produttività.


La migliore selezione delle pazienti con tumore della mammella di tipo TNBC permetterà di risparmiare a queste donne la somministrazioni di terapie inefficaci e inutilmente tossiche, indirizzandole più tempestivamente verso terapie potenzialmente più efficaci.

L'identificazione di miR-223 e di CDKN1B come biomarcatori di sopravvivenza e/o diagnosi precoce del tumore mammario potrebbe aiutare nella diagnosi e follow up delle pazienti con tumore mammario e aiutare il medico oncologo nella migliore scelta terapeutica.

Il tipo di saggi messi a punto su campioni di tessuto mammario e di plasma da pazienti con tumore metastatico (i.e. sequenziamento NGS e analisi qRT-PCR e ddPCR) sono facilmente riproducibili ed esportabili nella pratica clinica per un miglior inquadramento diagnostico dei tumori mammari.

La generazione di modelli PDX di tumori TNBC permetterà di testare, in modelli più appropriati e derivati direttamente da pazienti, le nuove possibilità terapeutiche identificate in questo progetto per un loro più rapido trasferimento in clinica.

Il Responsabile scientifico
Prof. Guidalberto Manfioletti

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'G. Manfioletti', written on a light-colored background.

Firma e timbro del Proponente
Direttore del Dipartimento di Scienze della Vita
Prof. Mauro Tretiach

FIRMATO DIGITALMENTE