



Ministero dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale della Ricerca

DECRETO DEL DIRETTORE GENERALE - N. 3055 del 24/11/2023 - Allegato Utente 1 (A01)

Rendiconto di spesa fondi 5 per mille
Enti della Ricerca Scientifica
ANNI FINANZIARI 2021 E 2022¹

Ente beneficiario

Denominazione sociale	FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Codice fiscale	04724150968
Sede legale	VIA FRANCESCO SFORZA 28 – 20122 MILANO
Indirizzo posta elettronica (NO PEC)	protocollo@pec.policlinico.mi.it
Scopo dell'attività sociale	<p><u>PROGETTO DI RICERCA DAL TITOLO:</u></p> <p>MAPPATURA DELLE INTERAZIONI RECETTORE-LIGANDO TRA CELLULE TUMORALI E MICROAMBIENTE USANDO LA TECNOLOGIA SINGLE-CELL E SPATIAL TRANSCRIPTOMIC: NUOVE STRATEGIE PER IDENTIFICARE TARGET TERAPEUTICI</p> <p>SPATIAL RESOLUTION OF LIGAND-RECEPTOR INTERACTIONS BETWEEN TUMOR CELLS AND THE MICROENVIRONMENT USING SINGLE-CELL AND SPATIAL TRANSCRIPTOMIC: A NEW STRATEGY TO IDENTIFY THERAPEUTIC TARGETS.</p> <p><i>Descrizione - Background del progetto e obiettivi principali della ricerca</i> L'eterogeneità tumorale è la principale causa di resistenza/fallimento terapeutico, recidiva della malattia e morte correlata al cancro. L'interazione dei diversi cloni tumorali con il microambiente circostante determina la diffusione delle cellule tumorali, la sensibilità alle terapie e il controllo del sistema immunitario. Questa interazione è governata dalle interazioni ligando-recettore. Il sequenziamento dell'RNA a cellula singola (scRNA-seq) è un potente strumento in grado di fornire un profilo di espressione delle neoplasie alla risoluzione della singola cellula, che consente l'identificazione e la caratterizzazione di sotto-cluster specifici con caratteristiche biologiche uniche. Tuttavia, il scRNA-seq manca di informazioni spaziali e non può caratterizzare adeguatamente le interazioni cellula-cellula per estrapolare dove e come le cellule tumorali influenzano il comparto infiammatorio all'interno del tessuto. La trascrittomica spaziale (ST) è una nuova tecnica che consente la visualizzazione e l'analisi quantitativa del trascrittoma con risoluzione spaziale in sezioni di tessuto. La combinazione di ST e scRNA-seq con il supporto di algoritmi specifici (come l'analisi dell'intersezione multimodale) aiuta a superare i limiti di entrambe le tecniche fornendo informazioni biologiche significative. Questo approccio</p>

¹ Indicare l'anno finanziario al quale si riferisce l'erogazione.



**Ministero dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale della Ricerca**

combinatorio offre opportunità senza precedenti per comprendere l'eterogeneità cellulare nel contesto spaziale consentendo l'esplorazione delle localizzazioni e delle interazioni dei cloni a livello di singola cellula.

Qui, intendiamo sfruttare questo approccio per mappare sistematicamente l'interazione ligando-recettore a livello di singola cellula in compartimenti topologicamente distinti delle seguenti condizioni neoplastiche: 1) campioni pre e post terapia di due pazienti con mielofibrosi primaria (PMF) sottoposti a terapia con Navitoclax e Ruxolitinib; campioni pre e post terapia di due pazienti con mieloma multiplo (MM) sottoposti a anticorpi bispecifici anti-BCMA; 2) glioma primario e recidivante (dello stesso paziente; n=3); 3) cancro al seno associato alla gravidanza (n=3). Ciò fornirà una comprensione globale dei tipi cellulari e delle nicchie delle malattie, determinerà i mediatori molecolari delle comunicazioni intercellulari e identificherà interazioni ligando-recettore cruciali per la neoplasia, nonché possibili bersagli di terapie esistenti (riprogrammazione/riprogrammazione dei farmaci).

Materiali (descrizione dettagliata dei reagenti e delle apparecchiature necessarie per l'esecuzione del progetto)

Per questo progetto utilizzeremo la seguente strumentazione: Chromium Controller (10X Genomics) per la creazione di librerie destinate a scRNA-Seq e preparazione delle librerie per single cell RNAseq e single cell V(D)J; GeoMx Digital Spatial Profiler (Nanostring) per gli esperimenti di spatial transcriptomic (ST); NextSeq2000 (Illumina) per il sequenziamento dopo ST; nCounter Flex (Nanostring) per la lettura di proteine o pannelli genici dopo ST; immunocoloratori Dako o Ventana per reazioni di immunohistochimica (validazione)

Reagenti: Per scRNA-Seq: useremo il Single Cell 5' Reagent kits v1.1 (10X Genomics, PN-1000165) e il protocollo Chromium Single-cell V(D)J Enrichment (10X Genomics, PN-1000016) (CG000207 Rev B). I campioni verranno analizzati mediante Chromium Single Cell Chip G (PN-1000120). Per la spatial transcriptomics: GeoMx Seq Code Pack, RNA slide prep kit & buffers, Human Whole Transcriptome Atlas, Solid Tumor TME Morphology Kit, nCounter Master Kit & panels; immunohistochimica: anticorpi specifici, detection kits.

Risultati e prodotti conseguiti

Studi recenti hanno evidenziato come l'utilizzo combinato della tecnologia di scRNA-seq e spatial transcriptomic abbia permesso di identificare cambiamenti dinamici di specifici sotto-popolazioni tumorali (le cellule metastatiche soprattutto) contestualizzandole nel tessuto tumorale e permettendo l'identificazione puntuale di interazioni cellula-cellula (Liu Y-M et al, Adv Sci 2023; Ding S et al., Cancer Commun 2023; Wang F et al., Sci Adv 2023).

In Ematologia abbiamo effettuato sc-RNAseq in >100 casi di MM per caratterizzare l'interazione tra plasmacellule tumorali e microambiente. Abbiamo analizzato 5 pazienti con MM per evidenziare il potenziale dell'applicazione per definire diversi sottocloni tumorali direttamente dal trascrittoma o attraverso la deconvoluzione dei riarrangiamenti V(D)J (Lazzaroni et al., sottomesso). Ciò apre grandi opportunità traslazionali. Stiamo implementando la tecnica del single-cell per analizzare la malattia minima misurabile dopo immunoterapia in pazienti con MM. In ambito di spatial biology stiamo studiando la milza di pazienti con MFI al fine di identificare interazioni tra cellule clonali e microambiente.

In ambito di tumori solidi, nostre evidenze ottenute in casistiche di glioma hanno



**Ministero dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale della Ricerca**

evidenziato come la sottopopolazione staminale tumorale esprima alti livelli del gene ATP6V1G1 e questo supporti l'invasione del parenchima cerebrale e la sua "riprogrammazione" verso un fenotipo pro-oncogenico (Bertolini I et al, EBioMed 2019; Bertolini I et al., Mol Cancer Res 2020) e come le cellule tumorali metastatiche al cervello di tumori del polmone e del colon attino un rimodellamento epigenetico per adattarsi al nuovo microambiente (Morotti et al., Cancers 2023).

Attività previste (metodi-trasferibilità)

Ematologia: Studieremo pre- e post-4 cicli di terapia 2 pazienti affetti da MM sottoposti a terapia con anticorpi bispecifici anti-BCMA e 2 pazienti affetti da MFI che stanno ricevendo trattamento con Navitoclax-Ruxolitinib o inibitori di CALR, trattamenti che influenzano l'interazione tra le cellule tumorali e il microambiente. Useremo anche la tecnica CiTE-seq per caratterizzare il fenotipo del microambiente e le cellule tumorali, e i cambiamenti associati al trattamento. L'analisi bioinformatica includerà CellChat per definire possibili interazioni cellula-cellula basate su espressione di recettori e rispettivi ligandi. I risultati verranno validati nelle biopsie di midollo osseo mediante trascrittomico spaziale per studiare topograficamente l'interazione cellula-cellula.

Gliomi (primi 12 mesi): analizzeremo con tecnologia scRNA-seq tre margini di invasione (campioni freschi) di pazienti operati per glioma al fine di identificare cloni tumorali con potenziale invasivo e le molecole coinvolte nella comunicazione tumore-microambiente cerebrale. In parallelo analizzeremo con metodica spatial transcriptomic le seguenti aree tumorali da cinque pazienti di cui si dispone di campioni chirurgici d'archivio del glioma primario e della sua recidiva: area necrotica/ipossica, margini tumorali, parenchima a distanza morfologicamente privo di cellule neoplastiche. Gli istotipi cellulari che verranno analizzati nelle diverse aree saranno cellule GFAP+, Nestin+, Iba1+. Carcinoma mammario gravidanza-associato. Nei primi 12 mesi arruoleremo pazienti per eseguire analisi di scRNA-seq (stimiamo 2/3 casi) ed eseguiremo analisi del microambiente e delle interazioni cellula-cellula mediante spatial transcriptomic in aree centrali del tumore, nel fronte di invasione e (se presente) nelle aree con componente neoplastica non infiltrante (carcinoma in situ). Gli istotipi cellulari che verranno analizzati saranno cellule citokeratina+, Vimentin+, CD45+.

Successivamente, prevediamo che questo approccio possa essere applicato ad altre patologie neoplastiche ad alto impatto clinico, come i tumori del colon-retto e i tumori con componente endocrina.

Altre strutture della Fondazione IRCCS eventualmente coinvolte:

S.C. Ematologia, S.C. Oncologia Medica, S.C. Neurochirurgia, S.C. Anatomia Patologica, S.C. Chirurgia Generale e Mini-Invasiva

Altri Enti eventualmente coinvolti: nessuno

Classificazioni IRG-SS:

IRG: OBT Oncology 1 Basic Translational - SS: Tumor Microenvironment - TME

IRG: OTC Oncology 2 Translational Clinical - SS: Basic Mechanisms of Cancer Therapeutics - BMCT

IRG: GGG Genes, Genomes and Genetics- SS: Genomics, Computational Biology and Technology - GCAT



**Ministero dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale della Ricerca**

Project Background (versione inglese)

Tumor heterogeneity is the most complex contributor to therapeutic resistance/failure, disease relapse, and cancer-related death. The interplay between the different cancer clones with the surrounding microenvironment decides for cancer cells spread, sensitivity to therapeutics and taming of the immune system. This interplay is governed by ligand-receptor interactions. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is a powerful tool that can provide expression profiling of human cancer at the resolution of individual cells, which allows the identification and characterization of specific subclusters with unique biological features. However, scRNA-seq lack spatial information and cannot properly characterize cell-cell interactions to extrapolate where and how neighboring cells affect proinflammatory and transcriptional networks inside the tissue. Spatial transcriptomics (ST) is a novel technique that allows visualization and quantitative analysis of the transcriptome with spatial resolution in tissue sections. The combination of ST and scRNA-seq with the support of specific algorithms (such as multimodal intersection analysis) helps to overcome the limitations of both techniques providing meaningful biological insight.

Hypothesis and Significance (versione inglese)

Recent studies have shown how the combined use of scRNA-seq and spatial transcriptomic technology has made it possible to identify dynamic changes in specific tumor sub-populations (especially metastatic cells) contextualizing them in the tumor tissue and allowing the precise identification of cell-cell interactions cell (Liu Y-M et al, Adv Sci 2023; Ding S et al., Cancer Commun 2023; Wang F et al., Sci Adv 2023). The use of this combinatorial approach provides unprecedented opportunities to understand the cellular heterogeneity in the spatial context allowing the exploration of clones' localizations and interactions at single-cell level. Therefore, we believe that our study will deliver insightful information of key molecules and active signaling (ligand-receptor interaction) in different neoplastic context helpful in designing/rescheduling/repurposing therapeutic approaches, besides providing molecular mechanisms exploited by tumors to progress, escape from immune surveillance and resist to therapies.

Specific Aims (versione inglese)

Here, we plan to exploit this combinatorial approach to systematically map the ligand-receptor interplay at the single-cell level in topologically distinct compartments of the following neoplastic conditions: 1) pre- and post-therapy samples of two Primary myelofibrosis (PMF) patients undergoing Navitoclax and Ruxolitinib therapy; pre- and post-therapy samples from two Multiple Myeloma (MM) patients undergoing anti-BCMA bispecific antibodies; 2) matched primary and recurrent glioma (n=3 patients); 3) pregnancy-associated breast cancer (n=3 patients).

Specifically, aims are:

- AIM1: single cell characterization of tumor heterogeneity and microenvironment;
- AIM2: Spatially resolved microanatomy and cell-cell interaction shaping in the different neoplastic conditions
-



**Ministero dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale della Ricerca**

Expected Outcomes (versione inglese)

This study will provide a global understanding of the cell types and niches in the diseases, determine the molecular mediators of intercellular communications, and identify cancer key ligand-receptor interaction possibly target of existing therapeutics (drug repurposing/rescheduling).

Eventually, our project reveals the cellular and spatial organization of cancer niches and offers a systematic approach to dissect and target the complex organization and evolution of cancer cells.

Subsequently, we expect that this approach can be applied to other neoplastic pathologies with a high clinical impact, such as colorectal cancers and tumors with an endocrine component.

Significance and Innovation (versione inglese)

We performed sc-RNAseq in over 100 cases of MM to characterize at the molecular level the interaction between tumor plasma cells and the bone marrow microenvironment. We analyzed five newly diagnosed MM patients showing the potential of applying single cells to define different tumor subclones (Lazzaroni et al., submitted). This opens great translational opportunities. We are implementing the single-cell technique to analyze minimal measurable disease after immunotherapy in patients with MM. In the field of spatial biology we are studying the spleen of patients with MFI in order to identify interactions between clonal cells and the microenvironment.

Our evidence obtained in glioma series has shown that the tumor stem subpopulation expresses high levels of the ATP6V1G1 gene and this supports the invasion of the brain parenchyma and its "reprogramming" towards a pro-oncogenic phenotype (Bertolini I et al, EBioMed 2019; Bertolini I et al., Mol Cancer Res 2020) and how metastatic brain tumor cells from lung and colon tumors implement epigenetic remodeling to adapt to the new microenvironment (Morotti et al., Cancers 2023).

We believe that our study will deliver insightful information of key molecules and active signaling (ligand-receptor interaction) in different neoplastic context helpful in designing/rescheduling/repurposing therapeutic approaches, besides providing molecular mechanisms exploited by tumors to progress, escape from immune surveillance and resist to therapies.

Translational Relevance and Impact for the National Health System (SSN) (versione inglese)

The transformative impact of this proposal is due to its translational application in clinical practice and to its novelty in single cell and spatial transcriptomic approaches development. We envisage implementation of single cell approaches as tool able to dissect and track the clonal evolution and the tumor microenvironment architecture shaping upon targeted therapies in MM and PMF, during tumor progression in glioma and in pregnancy-associated breast cancer. The results obtained from the sequential design of this proposal will facilitate the development of novel prognostic models and help to identify signatures of cell-cell interaction which will represent new actionable targets. Indeed, each of these endpoints might promote a remarkable improvement in the still largely disappointing effects of treatment on the quality and duration of life of cancer patients. Finally, the data generated within this grant have the potential to set a standard benchmark for the initial implementation of molecularly stratified clinical decision making.



Ministero dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale della Ricerca

Nominativo legale rappresentante	Dott. Ezio Belleri
----------------------------------	--------------------

Contributo percepito

Data percezione	ANNO 2021: 19/10/2022 ANNO 2022: 21/09/2023
Importo	ANNO 2021: € 77.157,27 ANNO 2022: € 84.920,25

Spese sostenute ²

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
DI FUNZIONAMENTO		
Risorse umane <i>Dettaglio spese:</i> 1. ... 2. ...		
Acquisto beni e servizi <i>Dettaglio spese:</i> 1. Reagenti e materiale di consumo, servizi 2. ...		
ALTRE VOCI DI SPESA ³		
<i>Dettaglio spese:</i> 1. Spese di pubblicazione 2. Partecipazione a congressi		
ACCANTONAMENTI PROGETTI PLURIENNALI ⁴		
<i>Dettaglio spese:</i> 1. Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota a parte) 2. Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci, ecc.) 3. Partecipazione a congressi 4. Spese di pubblicazione	€ 35.000,00 € 123.000,00 € 10.000,00 € 10.000,00	€ 35.000,00 € 107.077,52 € 10.000,00 € 10.000,00
TOTALE	€ 178.000,00	€ 162.077,52

Il seguente rendiconto è pubblicato al seguente indirizzo web: www.policlinico.mi.it

² Evidenziare la loro riconduzione alle finalità ed agli scopi istituzionali del soggetto beneficiario.

³ Altre voci di spesa comunque destinate ad attività direttamente riconducibili alle finalità e agli istituzionali del soggetto beneficiario.

⁴ Eventuali accantonamenti delle somme percepite per la realizzazione di progetti pluriennali, con durata massima triennale, fermo restando l'obbligo di rendicontazione successive al loro utilizzo.



**Ministero dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale della Ricerca**

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs.196/2003 e al Regolamento (UE) 2016/679 (GDPR).

Milano,

IL RESPONSABILE DEL PROGETTO

(Prof.ssa Valentina Vaira)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Valentina Vaira'.

IL DIRETTORE GENERALE

(Dott. Ezio Belleri) *

* = (per conto del Legale Rappresentante Arch. Marco Giachetti - Deliberazione Consiliare n. 21 del 30.4.2019)