

MIRAGE: microRNA-targeted imaging for monitoring and prognostic stratification in neuroendocrine tumours

*Convegno_MIRAGE: tumori neuroendocrini, uno sguardo al futuro.
Nuovo Arcispedale S. Anna Cona, Ferrara. 3 ottobre 2026*

Unità operativa di Meldola (UO 2): Hsa-miR-5096 e riprogrammazione metabolica nei tumori neuroendocrini pancreatici

PhD Student: **Simona Capobianco**

Supervisor: **Dott.ssa Patricia Borges de Souza**

AIM 1: Validazione della correlazione tra miRNA circolanti (*c-miRNA: hsa-miR-5096, hsa-let-7i-3p, and hsa-miR-4311*) e positività alla PET/CT con ^{18}F -FDG nei PanNET

Task 1.2	Analisi comparativa in silico dell'espressione genica per verificare se i 3 miRNA identificati siano espressi e conservati nel topo
Task 1.3	Valutazione dei livelli di espressione dei miRNA mediante ibridazione in situ (ISH) su sezioni di tessuto sano disponibili in commercio
Task 1.4	Saggi in vitro per la valutazione del metabolismo dei NET e del profilo SSTR in linee cellulari a seguito di modulazione di hsa-miR-5096 tramite mimico/inibitori
Task 1.5	Valutazione dei livelli di c-miRNA e analisi del profilo dei SSTR in campioni di NET

OBIETTIVO 1: Validazione e caratterizzazione della firma di RNA circolanti (*c-miRNA: hsa-miR-5096, hsa-let-7i-3p, and hsa-miR-4311*)

Arruolamento	Selezione della coorte di pazienti e raccolta dei campioni clinici (UO 1 e UO 4)
Analisi in biopsia liquida	Valutazione della presenza della firma di c-miRNA mediante PCR quantitativa in tempo reale (RT-qPCR)
Caratterizzazione tissutale	Profilazione dell'espressione di SSTR2 e di hsa-miR-5096 nei tessuti NET tramite RT-qPCR, western blot e FISH su FFPE
Correlazione clinico-radiologica	Valutazione del legame tra i livelli di hsa-miR-5096 circolante e la positività alla PET/CT con ^{18}F -FDG. Validazione della correlazione precedentemente identificata*



Impiego di approcci biomolecolari e cellulari per l'analisi e la validazione dell'espressione dei c-miRNA e di SSTR2 nell'intera coorte di campioni NET

*Bocchini M, Tazzari M, Ravaioli S, Piccinini F, Foca F, Tebaldi M, Nicolini F, Grassi I, Severi S, Calogero RA, Arigoni M, Schrader J, Mazza M and Paganelli G (2023). *Circulating hsa-miR-5096 predicts 18F-FDG PET/CT positivity and modulates somatostatin receptor 2 expression: a novel miR-based assay for pancreatic neuroendocrine tumors*. Front. Oncol. 13:1136331. doi: 10.3389/fonc.2023.1136331

OBIETTIVO 2: Caratterizzazione metabolica e analisi del profilo di SSTR in seguito a modulazione dell'espressione di hsa-miR-5096 in modelli cellulari di NET

Modelli cellulari di PanNET sono stati trasfettati con **oligonucleotidi senso (mimic) o antisenso (inibitori/ASO) per hsa-miR-5096 e relativi controlli (scramble)** al fine di valutare **l'effetto della sua modulazione** nei seguenti ambiti:

Analisi del metabolismo	Saggi: Attività dell'esochinasi, produzione di piruvato/lattato, uptake di glucosio e tasso di consumo di ossigeno (OCR), integrati da analisi di immunoblotting.
Riprogrammazione trascrizionale	Piattaforme: Sequenziamento dell'RNA (RNA-seq) e analisi dei pathway metabolici tramite tecnologia NanoString (pannello nCounter Metabolism).
Modulazione del profilo SSTR	Analisi dell'espressione di SSTR2 a livello transcrittomico (RT-qPCR) e proteico (Western blot)



Decifrare come la modulazione di hsa-miR-5096 sia in grado di guidare la riprogrammazione trascrizionale e metabolica nei NET

Comprendere il meccanismo biologico e molecolare alla base dell'azione di hsa-miR-5096 per identificare nuovi pathway terapeutici e bersagli metabolici specifici nei NET

ASO COMMERCIALI (Qiagen)

miRCURY LNA miRNA inhibitor (Y104106313-ADA): Inibitore sintetico di hsa-miR-5096 (loss-of-function). È un oligonucleotide antisenso modificato con LNA (Locked Nucleic Acid).

miRCURY LNA mimic (YM00473500-ADA): Mimico sintetico di microRNA (gain-of-function). È un RNA a triplo filamento modificato con LNA che mima l'attività di hsa-miR-5096 endogeno.

ASO CUSTOM

*(Sintetizzate nei laboratori
della Prof.ssa Daniela
Perrone - Dipartimento di
Scienze dell'Ambiente e
della Prevenzione,
Università di Ferrara)*

Sequenza 1: Scheletro di RNA modificato con 2'-OMe (2'-O-metile) e legami PS con modifiche LNA in posizione x. **Meccanismo d'azione → Blocco sterico**

Sequenza 2: Scheletro di RNA modificato con 2'-OMe (2'-O-metile) e legami PS con modifiche LNA in posizione y. **Meccanismo d'azione → Blocco sterico**

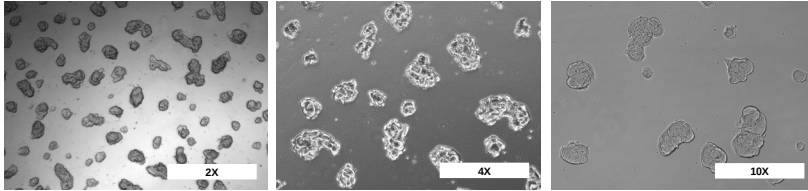
Sequenza 3 (mixmer): Alterna nucleotidi di DNA e RNA (mantenendo i cappucci 2'-OMe e gli LNA della Sequenza 1). **Meccanismo d'azione → Blocco sterico**

Sequenza 4 (gapmer): Ha una porzione centrale di nucleotidi di DNA affiancata alle estremità da nucleotidi di RNA modificati (2'-OMe/LNA). **Meccanismo d'azione → Attivazione RNase H**

Agente trasfettante: **Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, #13778030)**

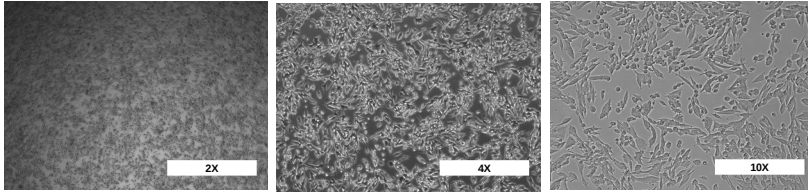
Modelli cellulari utilizzati

Linea NT-3



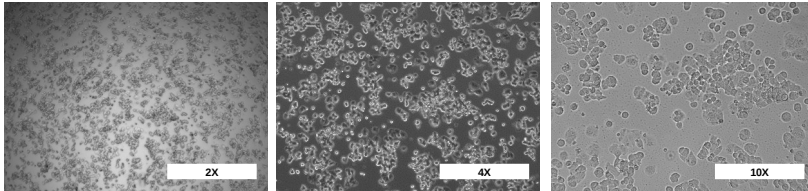
- Derivata da una **metastasi linfonodale** di un NET pancreatico (G2)
- Secernono **insulina**
- Per la coltura necessitano di coating con collagene IV e supplemento di EGF/FGF

Linea NT-18P



- Derivata da un **tumore primario** in situ del pancreas (G3)
- Secernono **cromogranina A e sinaptofisina**
- Per la coltura necessitano di coating con collagene IV e supplemento di EGF/FGF

Linea QGP-1



- Derivata da un **carcinoma neuroendocrino pancreatico** (G3)
- Secernono **somatostatina**

Screening *in vitro* delle sonde: valutazione dell'affinità di legame con hsa-miR-5096 e identificazione del range di concentrazione

Stabilità del legame tra hsa-miR-5096 e gli inibitori

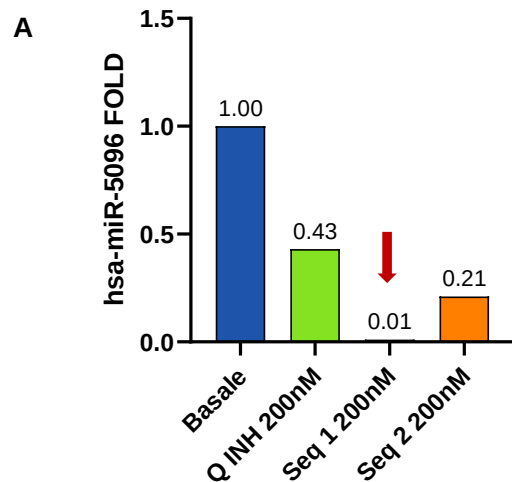


Fig A. La Sequenza 1 lega hsa-miR-5096 con stabilità maggiore rispetto le altre. RT-qPCR per valutare quale sequenza lega hsa-miR-5096 con più affinità e stabilità. I dati sono espressi come Fold Change rispetto al basale (senza inibitori). L'espressione di hsa-miR-5096 è stata normalizzata su U6 snRNA. Gli ASO sono stati aggiunti direttamente alla miscela di reazione RTqPCR contenente i primer specifici per il miR-5096. Maggiore è l'efficienza di legame tra il miRNA e l'inibitore, minore è l'amplificazione e dunque il fold di hsa-miR-5096.

Vitalità cellulare a 72h dal trattamento

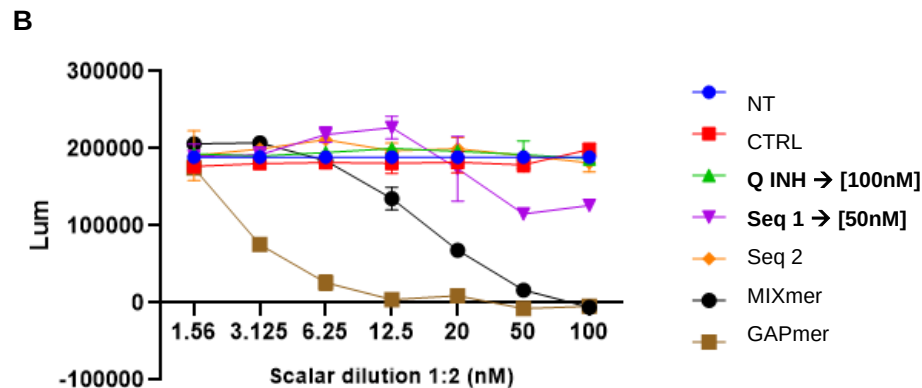


Fig B. Effetto degli inibitori di hsa-miR-5096 sulla vitalità cellulare. La vitalità cellulare è stata valutata tramite il saggio di luminescenza CellTiter-Glo dopo 72h di trattamento con concentrazioni scalari dei diversi inibitori. L'asse Y mostra i valori di luminescenza, proporzionali ai livelli di ATP intracellulare. I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.

Modulazione dell'espressione genica di SSTR2

Il trattamento con il Mimic riduce del ~43% l'espressione genica di SSTR2 in cellule QGP-1 a 72h

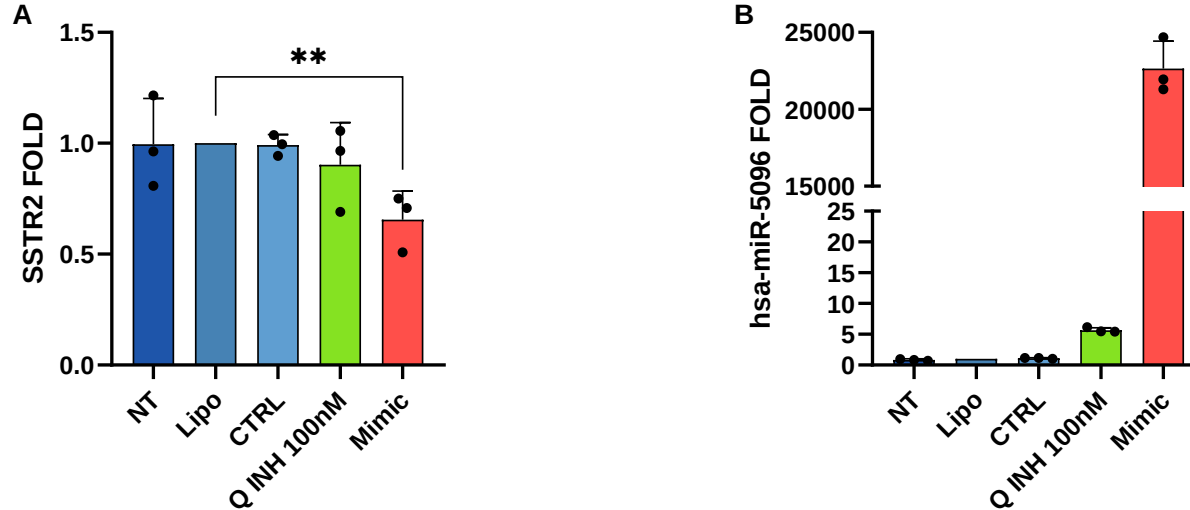


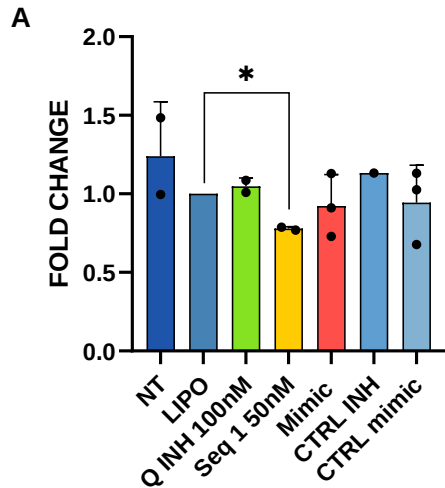
Fig. RT-qPCR per la linea cellulare QGP-1 a 72h dal trattamento. I dati dell'espressione genica di SSTR2 (A) e hsa-miR-5096 (B) sono espressi come Fold Change rispetto al basale (veicolo: Lipofectamina). Ogni punto rappresenta un replicato biologico indipendente (N=3), calcolato come media dei rispettivi replicati tecnici. Le barre d'errore indicano la deviazione standard ($\pm$ SD). La significatività statistica è stata determinata mediante Unpaired t-test ad una coda, eseguito sui valori originali di Δ Ct (**p=0.0038 rispetto al basale).



Modulazione del metabolismo cellulare indotta da hsa-miR-5096

La Seq 1 induce una riduzione significativa della captazione del glucosio nelle linee cellulari **NT-3** e **NT-18P**

NT-3
Riduzione del 35,9% a 48h post-trasfezione



NT-18P
Riduzione del 50% a 72h post-trasfezione

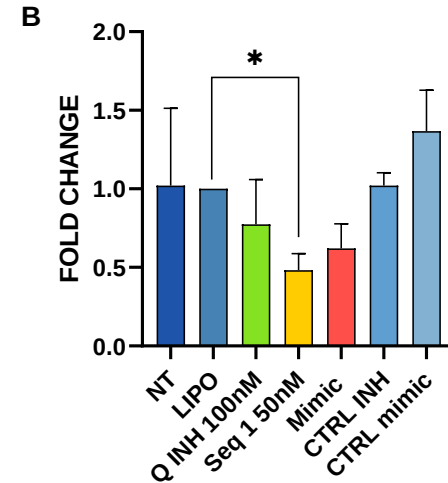


Fig. Effetto dell'inibizione di hsa-miR-5096 sull'uptake del glucosio. (A) L'inibizione di hsa-miR-5096 con la Seq 1 riduce l'uptake di oltre il 35% a 48h nelle NT-3 (* $p = 0,01$) e (B) del 50% a 72h nelle NT-18P (* $p = 0,043$). L'uptake relativo è stato valutato tramite saggio bioluminescente e normalizzato sulla vitalità cellulare ($RLU_{uptake}/RLU_{viability}$). Ogni punto rappresenta un replicato biologico indipendente, calcolato come media dei rispettivi replicati tecnici. Le barre d'errore indicano la deviazione standard ($\pm SD$). La significatività statistica è stata determinata mediante Unpaired t-test a una coda, eseguito sui valori originali della luminescenza normalizzata ($RLU_{uptake}/RLU_{viability}$). I dati sono espressi come Fold Change rispetto al basale.

Il Mimic induce un incremento significativo della captazione del glucosio del 26,52% nella linea cellulare NT-18P a 48h

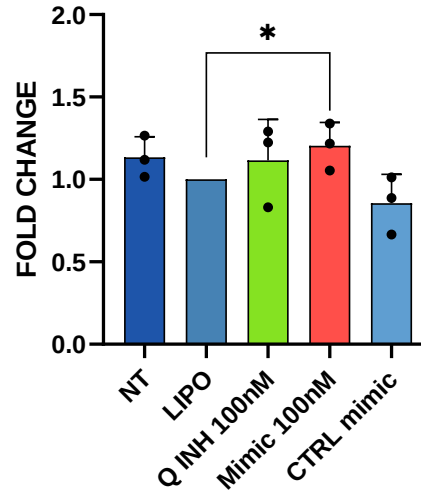
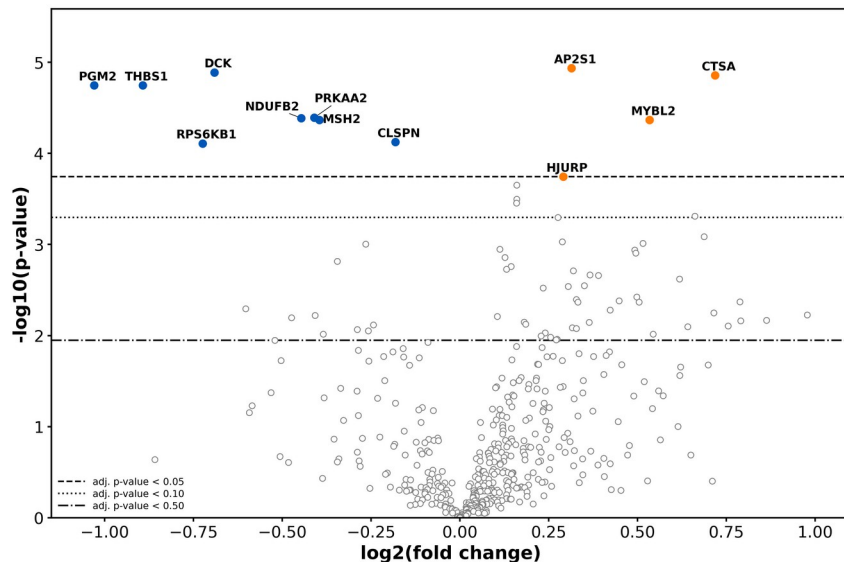


Fig. Effetto del mimic di hsa-miR-5096 sull'uptake del glucosio. L'incremento dei livelli endogeni di hsa-miR-5096 determina un aumento dell'uptake superiore al 26% dopo 48h nelle cellule NT-18P (* $p = 0,0383$). L'uptake relativo è stato valutato tramite saggio bioluminescente e normalizzato sulla vitalità cellulare ($RLU_{uptake}/RLU_{viability}$). Ogni punto rappresenta un replicato biologico indipendente, calcolato come media dei rispettivi replicati tecnici. Le barre d'errore indicano la deviazione standard ($\pm SD$). La significatività statistica è stata determinata mediante Unpaired t-test a una coda, eseguito sui valori originali della luminescenza normalizzata ($RLU_{uptake}/RLU_{viability}$). I dati sono espressi come Fold Change rispetto al basale.

Riprogrammazione trascrizionale

L'incremento dei livelli di hsa-miR-5096 endogeno altera l'espressione di specifici geni associati al metabolismo nella linea cellulare QGP-1 a 48h



Ciclo cellulare, mitosi e risposta ai danni al DNA:

- MYBL2, HJURP
- CLSPN, MSH2

Metabolismo energetico e pathway di mTOR:

- PRKAA2, PGM2, NDUF2, RPS6KB1

Traffico vescicolare e lisosomiale:

- AP2S1, CTSA

Matrice cellulare e risposta ai farmaci:

- THBS1, DCK

Profonda riprogrammazione metabolica e potenziamento del traffico vescicolare e lisosomiale

Fig. Profilo di espressione genica differenziale indotto da hsa-miR-5096 nella linea cellulare QGP-1 a 48h rispetto al controllo basale (Lipofectamine). Volcano Plot, giallo: up-regolazione, blu: down-regolazione (adj. p-value: 0.0112). Per il controllo del false discovery rate, è stata applicata la procedura di Benjamini-Yekutieli. La visualizzazione dei dati e i risultati sono stati generati tramite il software nSolver Analysis 4.0 (NanoString) e in Python utilizzando i moduli matplotlib e seaborn.

Riprogrammazione metabolica in risposta all'incremento dei livelli di hsa-miR-5096 nella linea cellulare QGP-1 a 48h

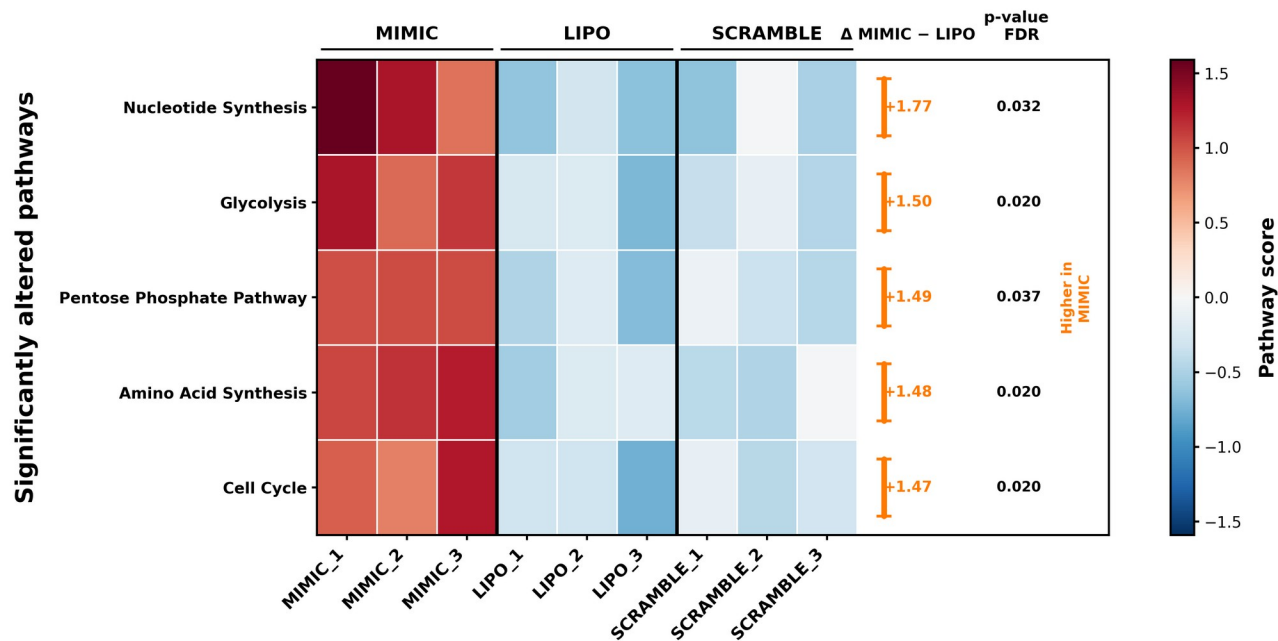


Fig. Alterazione delle vie metaboliche indotta dal trattamento con hsa-miR-5096. Heatmap delle vie metaboliche significativamente alterate in risposta al trattamento nella linea cellulare QGP-1 a 48h. I dati ottenuti tramite la tecnologia Nanostring nCounter sono stati normalizzati e convertiti in Pathway Score tramite l'Analisi delle Componenti Principali, sull'espressione coordinata dei geni di ciascun set (rosso: up-regolazione – blu: down-regolazione). La visualizzazione dei dati e i risultati sono stati generati tramite il software nSolver Analysis 4.0 (NanoString) o in Python utilizzando i moduli matplotlib e seaborn.

L'incremento dei livelli di hsa-miR-5096 endogeno altera l'espressione di specifici geni associati al metabolismo nella linea cellulare **NT-18P a 48h**

Ciclo cellulare, mitosi e risposta ai danni al DNA:

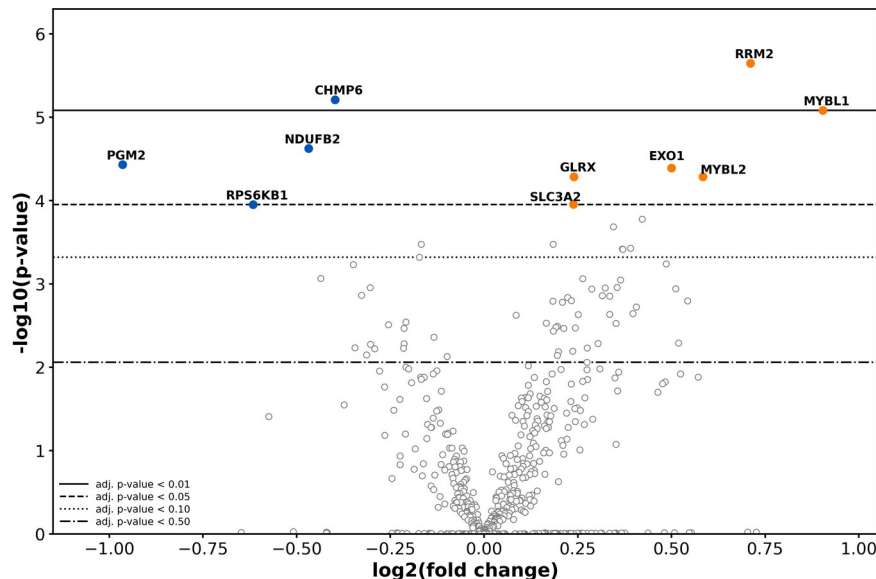
- **MYBL1, MYBL2, RRM2, EXO1**

Metabolismo energetico e pathway di mTOR:

- **PGM2, NDUFB2, RPS6KB1,**
- **SLC3A2, GLRX**

Traffico vescicolare e lisosomiale:

- **CHMP6**



Riprogrammazione metabolica e marcata attivazione della proliferazione

Fig. Profilo di espressione genica differenziale indotto da hsa-miR-5096 nella linea cellulare NT-18P a 48h rispetto al controllo basale (Lipofectamine). In giallo i geni significativamente up-regolati, mentre in blu i geni significativamente down-regolati (adj. p-value: 0.0112). Per il controllo del false discovery rate, è stata applicata la procedura di Benjamini-Yekutieli. La visualizzazione dei dati e i risultati sono stati generati tramite il software nSolver Analysis 4.0 (NanoString) e in Python utilizzando i moduli matplotlib e seaborn.

L'incremento dei livelli di hsa-miR-5096 risulta in una spinta mitotica e gestione della sopravvivenza nella linea cellulare **NT-18 a 48h**

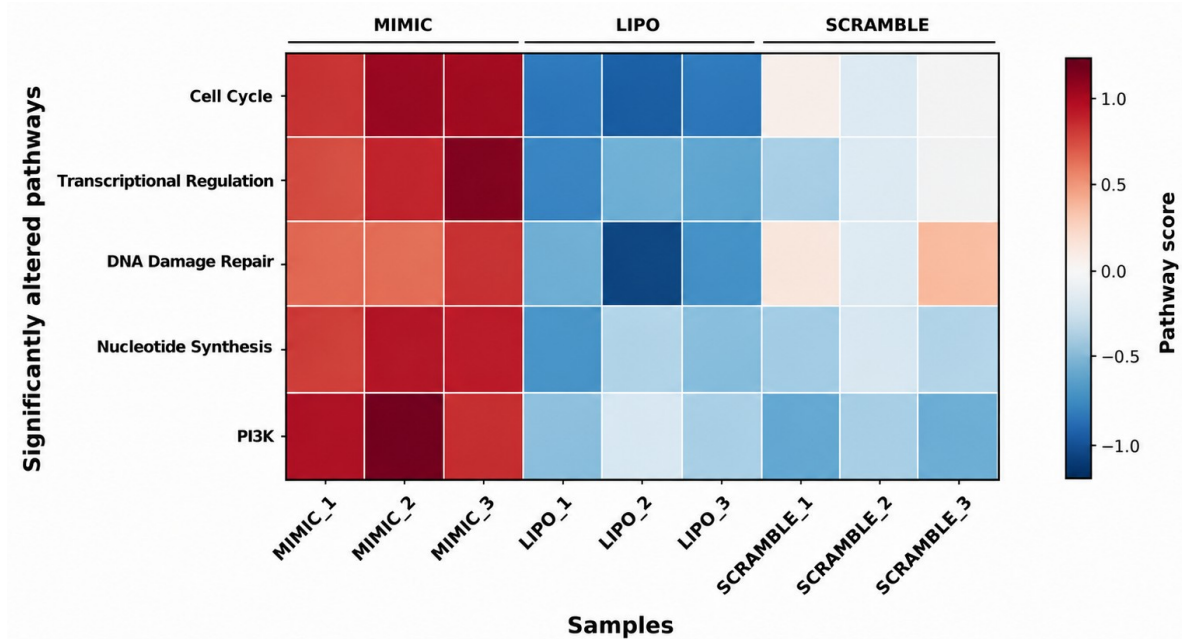


Fig. Alterazione delle vie metaboliche indotta dal trattamento con hsa-miR-5096. Heatmap delle vie metaboliche significativamente alterate in risposta al trattamento nella linea cellulare NT-18P a 48h. I dati ottenuti tramite la tecnologia Nanostring nCounter sono stati normalizzati e convertiti in Pathway Score tramite l'Analisi delle Componenti Principali, sull'espressione coordinata dei geni di ciascun set (rosso: up-regolazione – blu: down-regolazione). La visualizzazione dei dati e i risultati sono stati generati tramite il software nSolver Analysis 4.0 (NanoString) o in Python utilizzando i moduli matplotlib e seaborn.

TAKE HOME MESSAGE

DATI PRELIMINARI

Correlazione con la sovraespressione di hsa-mir-5096:

↑ captazione di ^{18}F -FDG alla PET/CT

↓ sopravvivenza libera da progressione (PFS)

↓ risposta alla terapia PRTT

MODULAZIONE DI SSTR2

Il trattamento con hsa-mir-5096 induce una riduzione dell'espressione genica di SSTR2 del

~43%

Nella linea cellulare QGP-1 a 72h

CAPTAZIONE DEL GLUCOSIO

Trattamento con

- **Inibitore di miR5096 (Seq1):**

- 36% (NT-3 a 48h)

- 50% (NT-18P a 72h)

- **Mimic di miR5096:**

- + 26% (NT-18P a 48h)

RIPROGRAMMAZIONE METABOLICA

Trattamento con hsa-miR-5096 induce un profondo riarrangiamento metabolico:

- **QGP-1:**

- Alterazioni dell'asse AMPK/mTOR
 - Potenzimento del traffico vescicolare
 - Spinta proliferativa

- **NT-18P**

- Forte spinta mitotica
 - Sistemi di riparo ai danni e controllo dello stress ossidativo

Validazione e caratterizzazione della firma di RNA circolanti:

Analisi dei plasmi, campioni FFPE e correlazione con i dati clinici

Meccanismo d'azione di hsa-miR-5096 in modelli cellulari di PanNET:

- *Approfondire le analisi sul metabolismo*
- *Analisi dei dati di sequenziamento*
- *Analisi del profilo di SSTR a livello proteico*

Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara:

Prof.ssa Maria Chiara Zatelli (PI)
Prof. ssa Maria Rosaria Ambrosio (co-PI)
Prof. ssa Daniela Perrone
Elena Marchesi
Vanessa Trombin
Margherita Medici
Camilla Cattaneo

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Cefalù

Prof. Giorgio Russo
Francesco Paolo Cammarata
Cristiana Alberghina
Alessandro Stefano
Giovanni Pasini

Università di Catania

Prof. Giuseppe Romeo
Chiara Bonanno

**Azienda Ospedaliera Universitaria Gaetano Martino,
Messina:**

Prof. ssa Rosaria Maddalena Ruggeri
Alessandra Piccione

Azienda Ospedaliera Cannizzaro di Catania:
Fabrizio Scopelliti



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

IRCCS Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori (IRST)

"Dino Amadori", Meldola:

Prof. Massimiliano Mazza
Patricia Borges de Souza
Matteo Zurlo
Miriana Ghirelli
Anna De Lucia
Chiara Magnoni
Anna Gaimari