



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata**

**Ruolo di differenti isoforme di CXCL12 su modelli tumorali e
pre-tumorali pancreatici: cambiamenti di espressione e modifiche
fenotipiche**

**Role of different CXCL12 isoforms in pancreatic tumor and
pre-tumor models: expression and phenotypic modification**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Elisa Rocconi

Relatore:
Chiar.mo Dott. Francesco Piva

Correlatore:
Dott.ssa Monia Cecati

**Sessione straordinaria
Anno Accademico 2018/2019**

INDICE

1.INTRODUZIONE	5
1.1 Adenocarcinoma Pancreatico Duttale.....	5
1.2 Patogenesi dell'adenocarcinoma Pancreatico Duttale.....	7
1.3 Mutazioni genetiche correlate al PDAC.....	10
1.3.1 K-RAS.....	11
1.3.2 CDKN2A.....	17
1.3.3 TP53.....	18
1.3.4 SMAD4.....	18
1.3.5 BRCA2.....	19
1.3.6 Accorciamento dei telomeri.....	20
1.4 Metabolismo del PDAC.....	21
1.4.1 Riprogrammazione del metabolismo del glucosio dipendente dal K-RAS.....	22
1.4.2 Metabolismo della glutammina e omeostasi redox.....	23
1.4.3 Autofagia e macropinocitosi.....	25
1.5 Il microambiente tumorale.....	25
1.5.1 Ruolo dei CAF nel carcinoma pancreatico.....	29
1.6 Chemochine.....	38

1.7 CXCL12.....	40
1.7.1 Differenti isoforme di CXCL12.....	43
1.7.2 Recettori di CXCL12.....	47
1.8 CXCL12 e analgia.....	54
1.9 CXCL12 e PDAC.....	56
2. SCOPO DELLA TESI	59
3. MATERIALI E METODI.....	60
3.1 Colture cellulari.....	60
3.2 Trattamento delle cellule con CXCL12- α , β e γ	61
3.3 Western Blot.....	63
3.3.1 Estrazione proteica.....	63
3.3.2 Determinazione della concentrazione dell'estratto proteico.....	64
3.3.3 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE).....	65
3.3.4 Trasferimento su membrana di nitrocellulosa.....	66
3.3.5 Bloccaggio.....	67
3.3.6 Incubazione con anticorpo primario e secondario.....	67
3.3.7 Rilevazione del segnale.....	69
3.4 Estrazione dell'RNA.....	69
3.5 Quantificazione dell'RNA estratto con Nanodrop.....	70
3.6 Retrotrascrizione.....	71

3.7 Real-Time PCR.....	72
3.7.1 Curva di Melting.....	75
3.7.2 Quantizzazione.....	76
3.8 Wound Healing.....	77
4. RISULTATI.....	79
4.1 Western Blot.....	79
4.2 Real-Time PCR.....	103
4.3 Wound Healing.....	108
5. DISCUSSIONE.....	113
6. BIBLOGRAFIA.....	117
7. RINGRAZIAMENTI.....	123

1. INTRODUZIONE

1.1 Adenocarcinoma Pancreatico Duttale

L'adenocarcinoma pancreatico duttale (PDAC) rappresenta tutt'oggi una delle forme più letali di tumore solido con una prognosi infausta documentata da un tasso di sopravvivenza dell'8% a cinque anni dalla manifestazione della malattia.

I bassi tassi di sopravvivenza associati al PDAC sono dovuti principalmente a diagnosi tardive, all'elevata incidenza di recidive e alla mancanza di trattamenti efficaci per la malattia in stadio avanzato con solo una minoranza di pazienti candidabili all'intervento chirurgico (*A. Bittoni et al. 2015*).

Il ritardo nella diagnosi è essenzialmente dovuto al fatto che solitamente nelle fasi iniziali della malattia i sintomi non si manifestano, oppure non sono sufficientemente specifici da suscitare il sospetto di una neoplasia; inoltre la complessità genetica, la mancanza di marcatori prognostici e la mancanza di screening programmati non agevolano la diagnosi precoce del PDAC, per cui essa viene formulata solo quando il tumore è già in uno stadio avanzato e si è diffuso in altre parti del corpo.

In base allo stadio clinico del tumore, il carcinoma pancreatico è classificato in quattro tipi:

- I (non diffuso o resecabile), il tumore è limitato al pancreas ed è cresciuto più di 2 cm o meno di 4 cm ;
- II (diffusione locale o borderline resecabile), le dimensioni del tumore sono maggiori di 4 cm e la sua localizzazione è limitata al pancreas, oppure è diffuso localmente ai linfonodi vicini;
- III (più ampia o non resecabile), il cancro può essersi espanso ai vasi sanguigni o ai nervi vicini, ma non è metastatizzato in siti distanti;
- IV (metastatico), il cancro si è diffuso ad organi distanti.

L'età media per la diagnosi del PDAC è di 71 anni, con il 75% dei casi diagnosticati tra i 55 e gli 84 anni ed è più comune negli uomini che nelle donne con un rapporto di 1,5:1, ma per entrambi i sessi il tasso di incidenza aumenta con l'età. Dati statistici, inoltre, mostrano che il tasso di incidenza varia non solo tra i sessi ma anche tra le diverse aree geografiche: Europa e Nord America riportano rispettivamente un'incidenza di 7,7 e 7,6 individui affetti ogni 100.000 abitanti, mentre in Africa è stata registrata una minor frequenza (2,2 individui affetti ogni 100.000 abitanti). I motivi di tali differenze non sono ancora stati chiariti, tuttavia può essere possibile che

l'ambiente e/o l'esposizione a determinati fattori di rischio spieghino le variazioni osservate nell'incidenza del cancro del pancreas.

(Rawla P. et al. 2019).

L'eziologia del carcinoma del pancreas è stata ampiamente studiata e, ad oggi, i fattori di rischio sono stati suddivisi in due categorie: fattori di rischio modificabili e non modificabili. Tra i fattori di rischio modificabili sono stati individuati il fumo di sigaretta, l'obesità, l'abuso di alcol, l'esposizione professionale a sostanze tossiche quali il nichel e fattori dietetici, in particolare, l'elevato consumo di carni rosse, carni trasformate e di cibi fritti; mentre i fattori di rischio non modificabili includono sesso, età, etnia, diabete mellito (considerato anche come uno dei primi sintomi del PDAC), storia familiare di carcinoma pancreatico, fattori genetici (mutazioni a livello della linea germinale), infezioni croniche (come l'epatite B e il virus C HBV e HCV), infezioni sostenute da *Helicobacter Pylori*, gruppo sanguigno non-O e pancreatite cronica *(Rawla et al. 2019)*.

1.2 Patogenesi dell'Adenocarcinoma Pancreatico Duttale (PDAC)

Studi istologici suggeriscono che l'insorgenza del PDAC è preceduta da una serie di lesioni precursori non invasive che interessano i dotti pancreatici, le quali si differenziano in tre diversi tipi:

- ❖ Neoplasia cistica mucosa (MCN). Sono lesioni cistiche epiteliali colonnari che producono mucina supportate da stroma di tipo ovarico che si trova, di solito, nel corpo e nella coda del pancreas, riscontrate spesso in donne di mezza età.
- ❖ Neoplasie intraduttali papillari mucinose (IPMN). Sono caratterizzate da un epitelio colonnare secernente mucina presentante uno stroma analogo a quello delle MCN; generalmente si presentano nel dotto pancreatico principale o nei suoi rami principali e sono più frequenti nell'uomo che nella donna.
- ❖ Neoplasia intraepiteliale pancreatica (PanIN). Rappresentano le lesioni di principale interesse. Le lesioni non invasive PanIN vengono classificate in tre stadi in base al grado di atipia delle cellule epiteliali: PanIN1, PanIN2 e PanIN3.
 - PanIN1 sono lesioni caratterizzate da epitelio mucinoso colonnare con lieve atipia nucleare e vengono a loro volta suddivise in PanIN1A (lesione piatta) e PanIN1B (lesione di tipo micropapillare);
 - PanIN2 sono lesioni che presentano un moderato grado di atipia, tra cui perdita di polarità, ingrossamento cellulare, ipercromasia con frequente formazione papillare;

- PanIN3 sono lesioni avanzate con grave atipia nucleare, necrosi luminale e mitosi atipica (*Ying et al. 2016*).

Più recentemente, questa classificazione a tre livelli è stata sostituita da una classificazione a due livelli che differenzia le lesioni PanIN di basso grado (PanIN-1 e PanIN-2) e di alto grado (PanIN-3). Tra le 3 tipologie di lesioni, le PanIN risultano essere quelle maggiormente correlate allo sviluppo del PDAC anche se non possono essere considerate un vero e proprio fattore prognostico in quanto sono state riscontrate anche in pazienti affetti da pancreatite cronica. Studi genetici, inoltre, hanno rilevato che la progressione dal basso grado di displasia (PanIN-1A e PanIN-1B) all'alto grado di displasia (PanIN-2, PanIN-3) fino al carcinoma invasivo, avviene parallelamente all'accumulo progressivo di mutazioni genetiche (*Fig.1*).

Il carcinoma del pancreas, infatti, può essere definito come una malattia genetica caratterizzata da una media di 63 geni mutati e diversi pathway alterati.

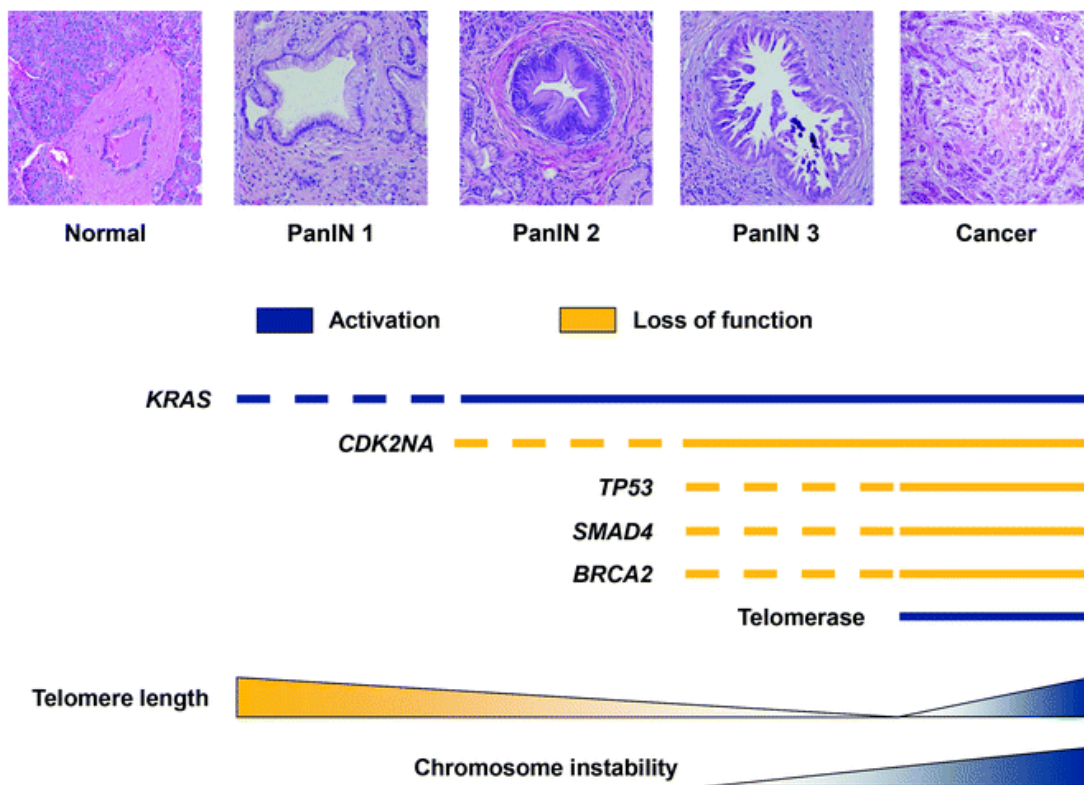


Figura 1. La figura mostra le differenti alterazioni istologiche e molecolari associate all'adenocarcinoma pancreatico duttale (www.oncohemakey.com).

1.3 Mutazioni genetiche correlate al PDAC

Negli ultimi anni la ricerca si è concentrata nell'identificare gli eventi molecolari che si verificano nei vari stadi di sviluppo dell'adenocarcinoma pancreatico. Le lesioni genetiche più comunemente riscontrate sono a livello degli oncogeni e dei geni soppressori del tumore; di seguito analizzeremo le mutazioni di principale interesse.

1.3.1 K-RAS

K-ras (oncogene del virus del sarcoma di Kirsten Rat) è uno dei 3 protooncogeni appartenenti alla famiglia RAS (H-RAS, N-RAS, K-RAS) che codifica per 2 diverse GTPasi ottenute in seguito a splicing alternativo a livello dell'esone 4: KRAS4A e KRAS4B (isoforma predominante nella maggior parte dei tessuti). Le proteine RAS presentano due domini principali, il dominio G e il dominio di legame alla membrana. Il dominio G comprende i residui 1-164 e corrisponde alla regione della proteina responsabile del legame e dell'idrolisi del GTP. Il dominio di legame alla membrana è invece composto dai rimanenti 24/25 residui al C terminale.

Normalmente, le singole proteine RAS si trovano nello stato inattivo quando sono legate al GDP, e attivo quando sono legate al GTP. Il ciclo RAS-GDP-GTP è regolato da fattori di scambio guaninici (GEF) che promuovono l'attivazione di RAS consentendo lo scambio del GDP con GTP, e da proteine attivanti le GTPasi (GAP) che guidano l'idrolisi del GTP mediata da RAS, la quale ritorna così nello stato inattivo (*Fig.2B*).

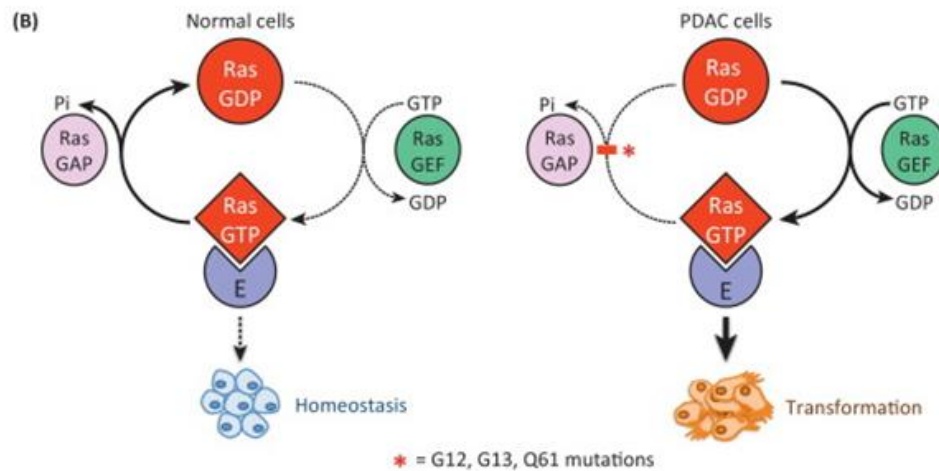


Figura 2B. Meccanismo di attivazione di K-Ras (L. Bryant et al. 2014).

L'attivazione della proteina Ras da parte dei fattori di scambio guaninici si ha nel momento in cui un ligando extracellulare (in genere un fattore di crescita) si lega ad un recettore tirosin chinasi (RTK) posto sulla membrana plasmatica. Il legame del recettore tirosin chinasi al proprio ligando causa una riorganizzazione della struttura recettoriale e l'autofosforilazione delle tirosine localizzate nella porzione intracellulare del recettore. L'autofosforilazione promuove l'interazione del recettore con i domini di alcune proteine citoplasmatiche le quali, a loro volta, legano ed attivano i fattori di scambio guaninici (GEF) che a questo punto potranno interagire con la proteina Ras e sostituire il GDP con il GTP. Una volta attivata, RAS-GTP, interagendo con numerosi effettori a valle, gioca un ruolo essenziale nel

controllo dell'omeostasi cellulare, regolando i processi di proliferazione, crescita e sopravvivenza cellulare (Fig. 3).

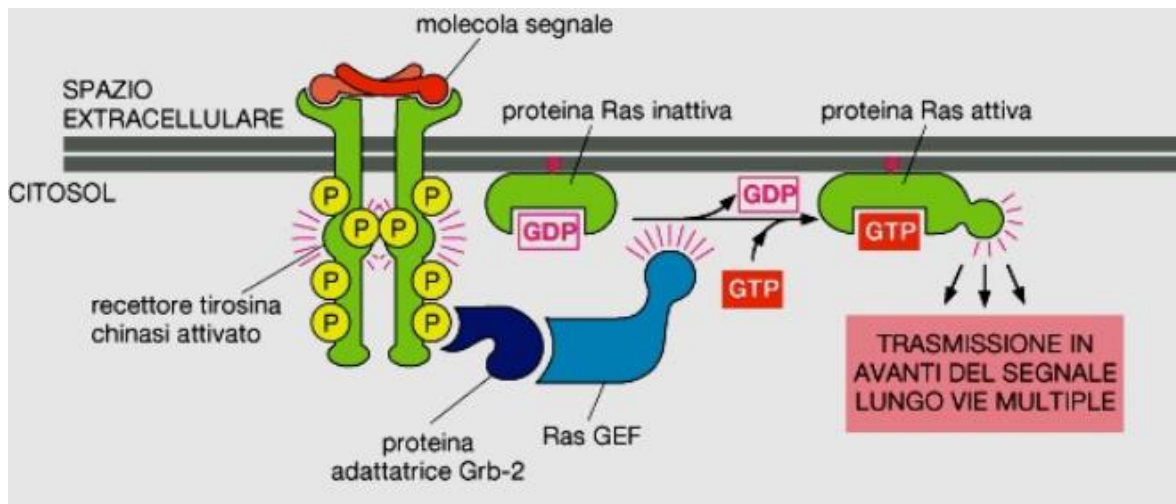


Figura 3. Meccanismo di attivazione della proteina Ras.

Numerosi studi hanno confermato che nel 90% dei pazienti affetti da PDAC è presente una mutazione puntiforme a carico di K-Ras, in particolare, la mutazione missenso più frequente è a livello del codone 12 e consiste nella sostituzione della G12 (98%) con aspartato, valina o arginina; meno frequenti sono invece le mutazioni puntiformi a livello della G13 (21%) e Q61 (28%). Queste mutazioni compromettono l'attività idrolitica di K-Ras e, inoltre, rendono la proteina insensibile alla stimolazione mediata da GAP, facendo sì che la proteina si trovi in uno stato sempre attivo. Gli effetti di K-Ras a livello cellulare dipendono da quanto ne è attivo nella cellula. Livelli molto elevati di proteine Ras attive, in genere, portano all'arresto del ciclo cellulare e alla

senescenza. Tuttavia, se i meccanismi di senescenza sono compromessi, alti livelli di proteine Ras attive portano alla trasformazione neoplastica.

Una volta attiva, K-Ras si rende responsabile dell'innesco di una serie di vie di segnalazione; in particolare, quelle principalmente coinvolte nella progressione del PDAC sono: MAPK/ERK, PI3K e RalGDS.

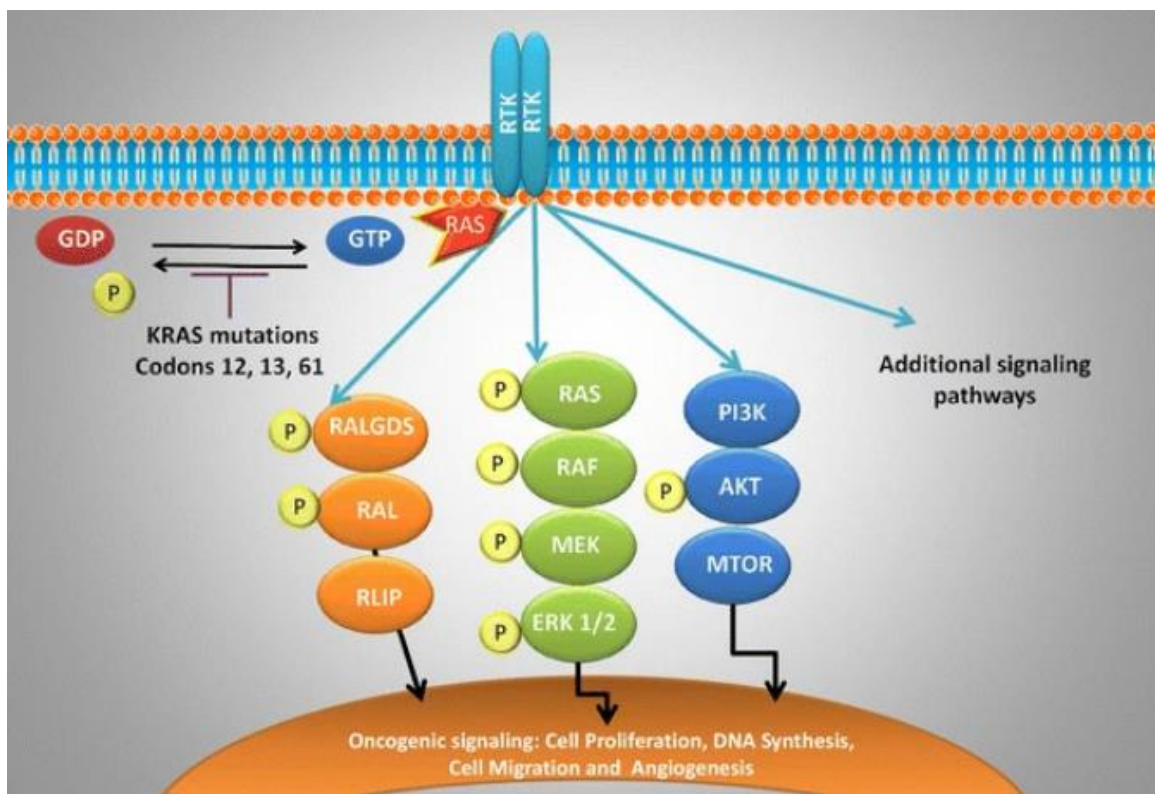


Figura 4. Differenti vie di segnalazione attivate da K-Ras (Bhattacharya et al. 2015).

MAPK/ERK

La cascata di segnalazione Ras, RAF, MEK e ERK ha inizio in seguito all'attivazione della proteina K-Ras. Questa attivazione comporta la fosforilazione della serina/treonina chinasi RAF-1 che, a sua volta, fosforila MEK, un'altra proteina-chinasi. MEK fosforilato porta alla fosforilazione di ERK (noto anche come MAPK) il quale può attivare, direttamente o indirettamente, molti fattori di trascrizione. Tale attivazione determina l'espressione di geni che regolano la proliferazione e la sopravvivenza della cellula. Riassumendo, la forma costitutivamente attiva di K-Ras, attraverso questa via di segnalazione, determina un fenotipo proliferativo nelle cellule. Inoltre è noto che anche il gene BRAF, responsabile della trascrizione della proteina RAF, può essere frequentemente mutato in 1/3 di pazienti affetti da PDAC ma, in questo caso, il gene K-Ras si trova nella forma wild type. In altre parole, le mutazioni a carico di K-Ras e BRAF sembrerebbero essere mutualmente esclusive.

PI3K

La via della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) che viene attivata in seguito alla fosforilazione di PI3K mediata da K-Ras porta alla fosforilazione di vari substrati; tra questi vi è il fosfatidil inositolo 4,5 bifosfato (PIP2) che viene

fosforilato a fosfatidil inositolo 3,4,5 trifosfato (PIP3) il quale rimane sulla membrana plasmatica ed attiva Akt. Questo, una volta attivato, disattiva, mediante fosforilazione, vari bersagli proteici che portano alla crescita cellulare e alla resistenza all'apoptosi.

Studi genomici sul PDAC umano hanno rivelato una riduzione dell'espressione del gene codificante per PTEN, un importante regolatore negativo di PI3K. Tale diminuzione di espressione è causata da una mutazione o da un'ipermetilazione. Tali studi hanno inoltre sottolineato che l'insufficienza o la carenza completa di PTEN promuove in modo drammatico lo sviluppo del PDAC guidato da K-Ras, sottolineando l'importanza della via di PI3K nella tumorigenesi pancreaticca.

RalGDS

RalGDS è uno dei numerosi fattori di scambio guanidinici (GEF) regolati da K-Ras, che controlla l'attività delle GTPasi RalA e RalB. Sebbene RalA e RalB condividano un numero di nucleotidi significativo (85%), e le rispettive proteine abbiano una notevole similarità ed interagiscano con effettori comuni, ci sono sempre più evidenze che le due forme abbiano ruoli distinti nel contesto della neoplasia pancreaticca; in particolare, Lim et al. hanno

osservato che RalA promuove la crescita tumorigenica mentre RalB sembra essere maggiormente coinvolto nell'invasione e nella metastasi.

1.3.2 CDKN2A

Il gene CDKN2A, noto anche come p16INK4A, si trova sul braccio corto del cromosoma 9 (9p), ed è uno dei geni oncosoppressori che più frequentemente risulta inattivato nel cancro del pancreas. Le mutazioni dei geni oncosoppressori sono recessive, di conseguenza è necessario che entrambi gli alleli siano mutati affinché si verifichi una perdita di funzione del gene. Il gene CDKN2A codifica per la proteina p16, la quale appartiene alla famiglia degli inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti (CDK). Questa proteina svolge un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare in quanto normalmente blocca la crescita e la proliferazione anormale delle cellule legandosi ai complessi ciclina D-Cdk4 e ciclinaD-Cdk6. Tale legame non permette più alle chinasi di fosforilare Rb e liberare E2F1, per cui il ciclo cellulare si arresta in fase G1. La perdita di p16INK4A/CDKN2A provoca una maggiore fosforilazione di Rb, facilitando così la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 a S contribuendo alla trasformazione tumorale.

1.3.3 TP53

La proteina p53 codificata, dal gene p53 localizzato sul cromosoma 17, svolge un ruolo centrale nel modulare le risposte cellulari allo stress citotossico contribuendo sia all'arresto del ciclo cellulare sia alla morte cellulare programmata. Nel carcinoma pancreatico, il gene soppressore del tumore p53 viene inattivato nel 50-75% dei casi e si manifesta principalmente attraverso una singola perdita allelica accoppiata a una mutazione intragenica del secondo allele. La perdita di funzione del gene p53 si traduce quindi in una crescita cellulare inappropriata e in un aumento della sopravvivenza cellulare (*Koorstra JB et al. 2008*).

1.3.4 SMAD4

SMAD4, noto anche come DPC4, è un gene oncosoppressore localizzato sul cromosoma 18p che risulta essere inattivo nel 55% dei pazienti affetti da PDAC. L'inattivazione avviene nel 30% dei casi attraverso la delezione omozigote, mentre nel restante 25% attraverso la perdita di un allele accoppiata ad una mutazione intragenica nel secondo allele (*Koorstra JB et al. 2008*). Il fattore di trascrizione SMAD4 è un importante regolatore della via di segnalazione del fattore di crescita trasformante beta (TGF β), in quanto, in seguito all'attivazione dei recettori del TGF β , SMAD4 forma un complesso

eterotrimerico SMAD2/SMAD3/SMAD4 e migra nel nucleo dove attiva la trascrizione di specifici geni. La perdita di SMAD4/DPC4 interferisce con le cascate di segnalazione intracellulari a valle del TGF- β , con conseguente riduzione dell'inibizione della crescita attraverso la perdita di segnalazione pro-apoptica o attraverso un'inappropriata transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, contribuendo così alla trasformazione tumorale.

1.3.5 BRCA2

BRCA2 appartiene alla famiglia dei geni oncosoppressori e il suo prodotto genico è coinvolto nella riparazione dei tratti cromosomici danneggiati, con un ruolo importante nella riparazione degli errori e delle rotture nel doppio filamento di DNA. Solitamente le mutazioni di BRCA2 consistono in inserzioni o delezioni di un piccolo numero di coppie di basi del DNA. Il risultato di tali mutazioni è la codifica di una proteina anomala da parte del gene BRCA2, che non funziona in maniera corretta. I ricercatori ritengono che la proteina BCRA2 difettosa sia incapace di riparare le mutazioni che si presentano in altri geni. Di conseguenza tali mutazioni si sommano e possono indurre le cellule a dividersi in maniera incontrollata, dando vita ad una massa neoplastica.

1.3.6 Accorciamento dei telomeri

Il telomero è la regione terminale di un cromosoma composta di DNA altamente ripetuto che protegge l'estremità del cromosoma stesso dal deterioramento o dalla fusione con cromosomi confinanti. Il telomero ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi, poiché la DNA polimerasi non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione.

L'accorciamento telomerico è uno dei primi eventi genetici riscontrabili nelle lesioni precursori del carcinoma pancreatico invasivo. Questi telomeri accorciati possono portare alla fusione anomala delle estremità cromosomiche e quindi all'instabilità cromosomica, promuovendo un'ulteriore progressione neoplastica in queste cellule. Nella maggior parte dei casi, le cellule che presentano questo grado di instabilità genomica vengono eliminate mediante l'attivazione di p53. Tuttavia, i riarrangiamenti cromosomici probabilmente persistono nelle cellule con mutazioni di p53 e queste cellule accumuleranno rapidamente ulteriori alterazioni genomiche. Pertanto la disfunzione telomerica e la perdita di p53 cooperano per promuovere lo sviluppo di carcinomi, in quanto, l'instabilità cromosomica fornisce al tumore la diversità genetica per superare alcune barriere nella carcinogenesi (*Koorstra JB et al. 2008*).

1.4 Metabolismo del PDAC

È noto da tempo che le cellule tumorali per far fronte al loro elevato fabbisogno energetico, utilizzano una quantità di glucosio molto maggiore rispetto alle cellule sane. Una delle caratteristiche classiche del metabolismo tumorale è la glicolisi alterata e la conversione del glucosio in lattato anche quando l'ossigeno è disponibile; questo fenomeno, noto come effetto Warburg, è osservato nel PDAC e in molti altri tipi di tumore. Le ragioni che portano le cellule tumorali ad effettuare la glicolisi anche in presenza di ossigeno non sono ancora del tutto chiare tuttavia sono state formulate alcune ipotesi:

- 1) La glicolisi, anche se meno efficiente da un punto di vista energetico, è un processo molto più rapido rispetto alla completa ossidazione del glucosio; di conseguenza le cellule tumorali potrebbero prediligere la velocità alla resa, una strategia che le renderebbe più competitive in caso di risorse limitate o condivise.
- 2) Per sostenere la loro proliferazione, le cellule tumorali non hanno bisogno solo di energia, ma anche di materia prima e la glicolisi rappresenta una fonte di precursori per la biosintesi dei “mattoni” che compongono la cellula, come acidi nucleici, lipidi, proteine.

3) L'effetto Warburg proteggerebbe il tumore e ne aumenterebbe l'aggressività e la resistenza. La fermentazione del piruvato produce acido lattico, che acidifica il micro-ambiente circostante, creando condizioni sfavorevoli, ad esempio, all'ingresso di cellule immunitarie. Allo stesso tempo, permette di sopravvivere anche in scarsità di ossigeno, una condizione frequente nelle regioni più interne dei tumori solidi o a seguito di terapie (Matthew G. et al. 2009).

1.4.1 Riprogrammazione del metabolismo del glucosio dipendente dal K-Ras

Nel PDAC, l'oncogene K-Ras svolge un ruolo importante nella riprogrammazione del metabolismo del glucosio in quanto è in grado di aumentarne l'assorbimento e aumentare la glicolisi. Ciò è reso possibile dal fatto che il mutante K-Ras aumenta l'espressione di GLUT-1 e di molti altri geni che codificano per enzimi glicolitici. Inoltre, la segnalazione oncogena di K-Ras induce nelle cellule PDAC l'espressione del trasportatore di monocarbossilato 4 (MCT4), necessario per promuovere l'efflusso di lattato che altrimenti si accumulerebbe a livello intracellulare a causa dell'elevata glicolisi. Infine, il K-Ras oncogenico promuove l'espressione di enzimi metabolici limitanti la velocità attraverso i quali K-Ras mutato dirige gli

intermedi della glicolisi in vie biosintetiche, tra cui la via del pentoso fosfato non ossidativo (PPP) per la biosintesi nucleotidica e la via della biosintesi dell'esosamina (HBP) per supportare la glicosilazione (Fig. 5) (Ying et al. 2016).

1.4.2 Metabolismo della glutammina e omeostasi ROS

A causa di alterazioni metaboliche e di segnalazione, le cellule tumorali sono caratterizzate da elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Se da un lato diversi studi stabiliscono che i ROS sono essenziali per la proliferazione delle cellule tumorali pancreatiche, dall'altro livelli eccessivamente alti di ROS risultano dannosi. Le cellule tumorali necessitano quindi di potenti meccanismi di difesa ossidativa in grado di garantire l'equilibrio redox. In particolare, il meccanismo di detossificazione utilizzato dalle cellule pancreatiche tumorali si basa su un percorso metabolico alternativo della glutammina, la quale viene convertita, a livello mitocondriale, in aspartato ad opera dell'enzima GOT2. L'aspartato viene poi trasferito al citoplasma e ulteriormente convertito da GOT1 in ossalacetato, utilizzato per la generazione di NADPH, il quale è essenziale per mantenere l'omeostasi redox e sostenere la crescita del PDAC. Questa via non canonica del metabolismo della glutammina è indotta dal mutante K-Ras il quale regola

l'espressione dell'enzima GOT1 e NRF2, quest'ultimo un regolatore trascrizionale per i geni antiossidanti (Fig. 5) (Ying et al. 2016).

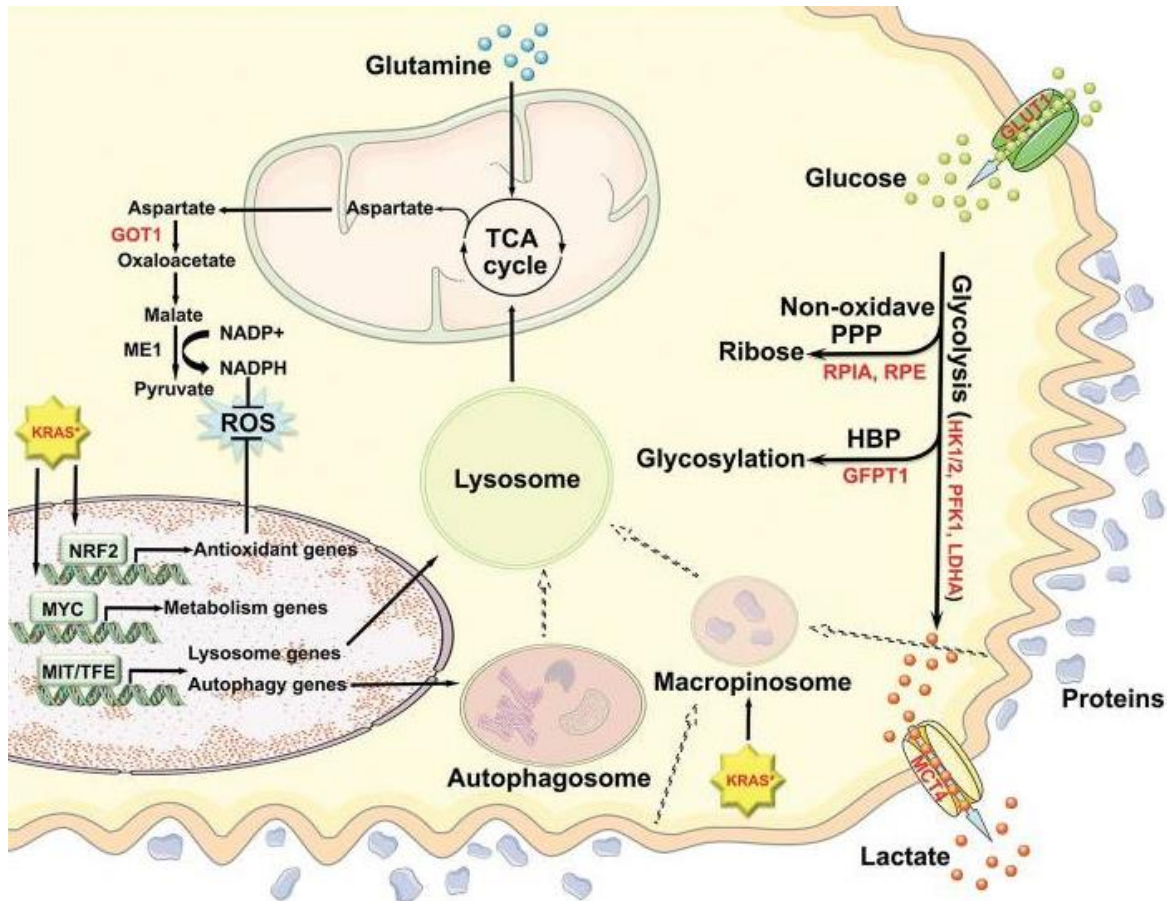


Figura 5. Riprogrammazione del metabolismo nel PDAC. Il KRAS oncogenico aumenta la glicolisi inducendo l'espressione di GLUT1, promuove l'efflusso di lattato, dirige gli intermedi della glicolisi in vie biosintetiche quali: PPP e HBP, induce l'espressione di GOT1 e l'attivazione di NRF2 necessari per mantenere l'omeostasi redox ed infine induce la macropinositosi e l'autofagia (Ying et al. 2016).

1.4.3 Autofagia e macropinosi.

L'autofagia e la macropinosi sono altre caratteristiche distintive del metabolismo del PDAC. L'autofagia è un processo che consente di riciclare componenti cellulari danneggiati quali organelli, lipidi e proteine all'interno di autofagosomi, che andranno poi a fondersi con i lisosomi. All'interno dei lisosomi il contenuto viene degradato ad opera degli enzimi lisosomiali ottenendo così amminoacidi, lipidi e nucleosidi che possono essere riutilizzati per la biosintesi di macromolecole e per la produzione di energia. L'autofagia quindi attraverso la sua funzione di riciclaggio, fornisce alle cellule tumorali vari nutrienti necessari per la crescita.

Oltre a riciclare i substrati intracellulari, le cellule PDAC sono anche in grado di assorbire macromolecole extracellulari attraverso la macropinosi. La macropinosi indotta dal KRAS oncogeno nelle cellule PDAC porta al recupero delle proteine extracellulari; le quali vengono inglobate all'interno del macropinosoma ed infine consegnate al lisosoma dove vengono degradate per alimentare i processi anabolici (Fig.5) (Ying et al. 2016).

1.5 Il microambiente tumorale

L'adenocarcinoma pancreatico duttale è caratterizzato da un microambiente altamente desmoplastico. Il tessuto stromale può infatti rappresentare fino al

90% della massa tumorale ed è costituito da componenti cellulari e acellulari, come fibroblasti associati al cancro (CAF), miofibroblasti, cellule immunitarie, vasi sanguigni, matrice extracellulare e proteine solubili come citochine e fattori di crescita. Tutte queste componenti insieme formano un microambiente favorevole per la crescita, la proliferazione e la progressione delle cellule tumorali del pancreas; inoltre è importante sottolineare che il microambiente tumorale (TEM) non è un'entità statica ma dinamica, di conseguenza la sua composizione e le sue dimensioni cambiano durante la progressione del tumore (A.Bulle et al. 2017).

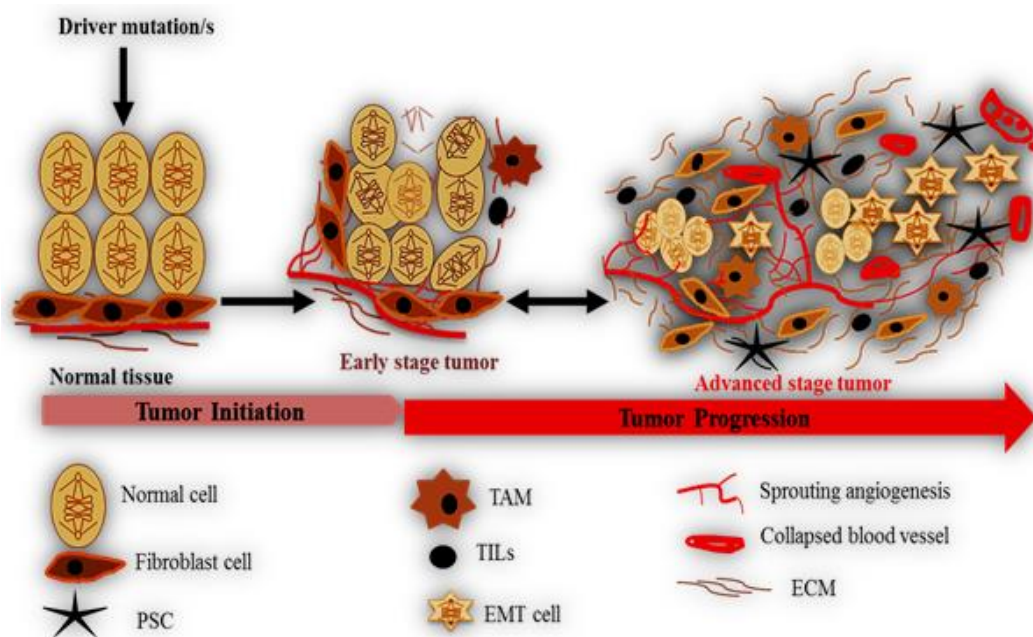


Figura 6. Il microambiente tumorale del PDAC. Il microambiente tumorale è composto da cellule tumorali a diversi stadi di invasività, fibroblasti, cellule stellate pancreatiche (PSC), matrice extracellulare (ECM), cellule endoteliali vascolari e linfatiche e una varietà di cellule derivate dal midollo osseo (linfociti infiltranti il tumore (TIL), Macrofagi associati al tumore (TAM) ecc.) (A.Bulle et al. 2017).

La componente cellulare predominante dello stroma nel carcinoma del pancreas sono i fibroblasti attivati, chiamati CAF (fibroblasti associati al cancro). I CAF sono cruciali per la formazione dello stroma desmoplastico e sono caratterizzati dal fatto di avere molteplici origini; in particolare possono derivare dall'attivazione di cellule stellate pancreatiche (PSC) e fibroblasti residenti, dal reclutamento e differenziazione di cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (MSC); infine è stato ipotizzato che anche le cellule epiteliali, attraverso la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT), possano essere una fonte di CAF. Tuttavia le cellule stellate del pancreas rappresentano la fonte più importante di CAF nel PDAC. In condizioni normali le PSC sono presenti in forma quiescente nel pancreas dove sono deputate allo stoccaggio della vitamina A; inoltre partecipano al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) attraverso la produzione di metalloproteinasi della matrice (MMP-2, MMP-9 e MMP13) e dei corrispondenti inibitori. Durante la carcinogenesi, la stimolazione derivante dai fattori rilasciati dalle cellule tumorali porta all'attivazione delle cellule stellate pancreatiche (aPSC). Una volta attivate, le cellule mostrano una perdita di riserve di vitamina A, acquisendo un fenotipo simile ai miofibroblasti, secernono grandi quantità di componenti della matrice

strutturale come collagene e fibronectina ed esprimono il marker di attivazione dei fibroblasti l' α -actina muscolare liscia (α SMA).

I fibroblasti quiescenti (residenti) possono infatti acquisire fenotipi attivati attraverso diversi meccanismi; in particolare, è stato osservato che le cellule pancreatiche tumorali rilasciano nel microambiente interleuchine (IL-1, IL-6) e fattori di crescita come il fattore di crescita trasformante β (TGF- β), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), in grado di stimolare il richiamo e l'attivazione dei CAF (Fig.7) (Q. Sun et al. 2018).

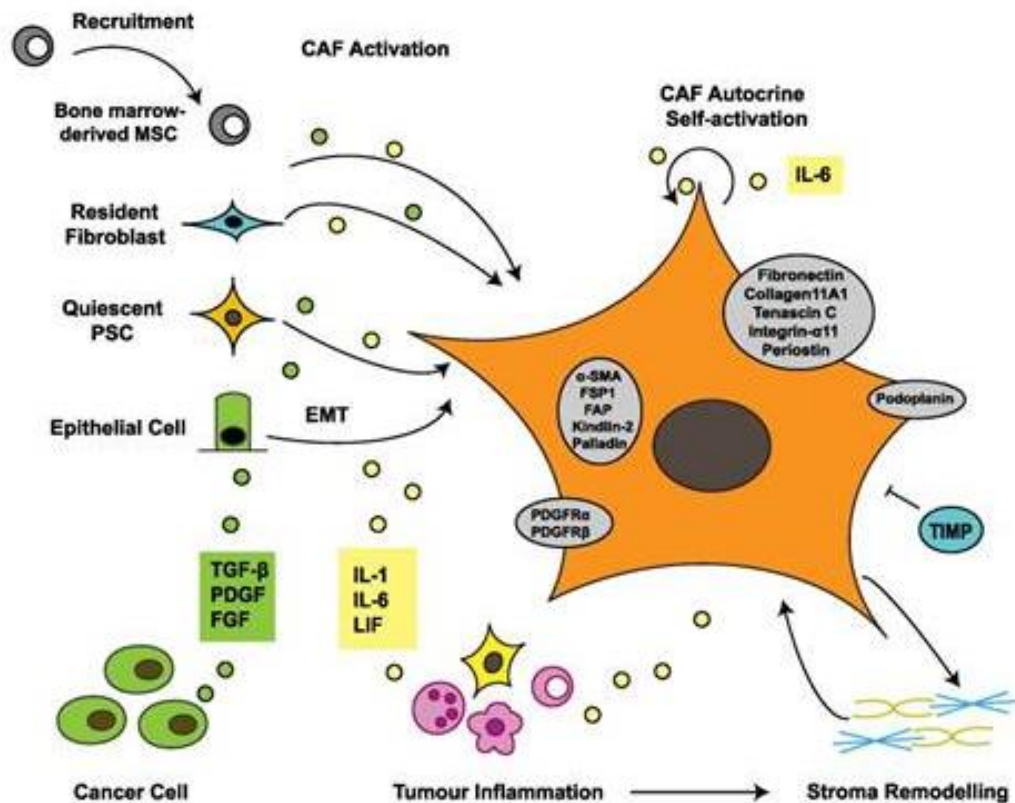


Figura7. Origini eterogenee e attivazione dei fibroblasti associati al cancro (Q.Sun et al. 2018).

1.5.1 Ruolo dei CAF nel carcinoma pancreatico

Numerosi studi hanno dimostrato che, attraverso il cross-talk con il microambiente tumorale, i fibroblasti associati al cancro (CAF) sono in grado di promuovere la proliferazione e la crescita del tumore, accelerare l'invasione e la metastasi, indurre angiogenesi, promuovere l'infiammazione e l'immunosoppressione, regolare il metabolismo del tumore e indurre chemioresistenza (Fig. 8). Di seguito analizzeremo in che modo i fibroblasti

associati al cancro regolano i principali segni distintivi del PDAC (Q.Sun et al. 2018).

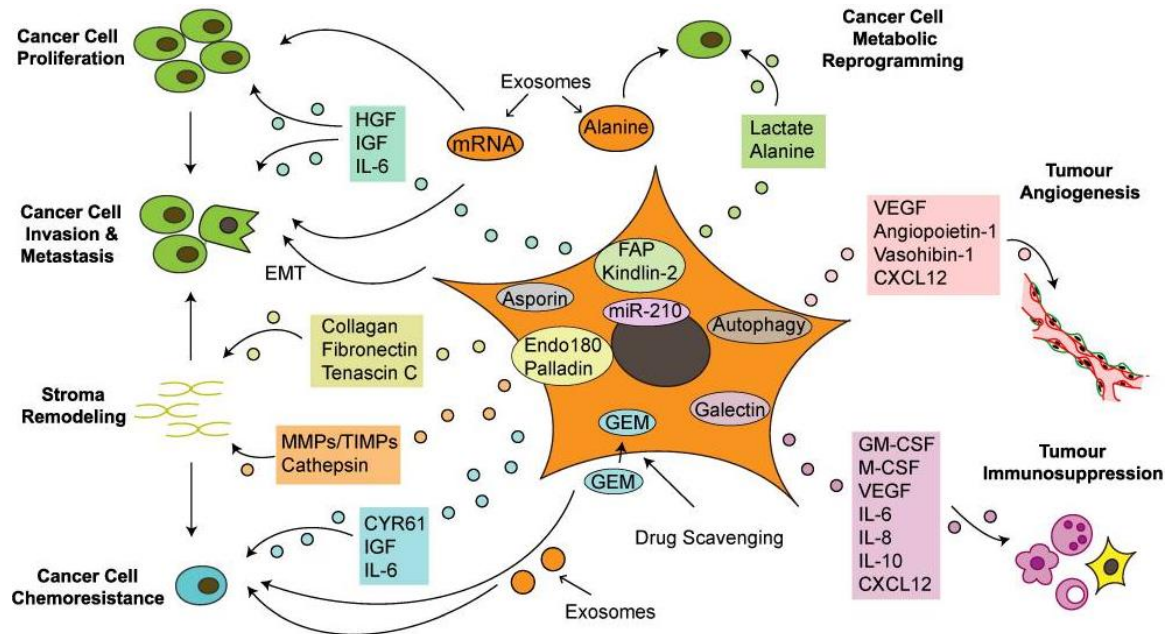


Figura 8. Cross-talk dei fibroblasti associati al cancro con il microambiente tumorale (Qiqing et al. 2018).

1) I CAF INFLUENZANO LA PROLIFERAZIONE E LA CRESCITA DEL PDAC

Diverse proteine espresse dai CAF sono coinvolte nella promozione della crescita tumorale. In particolare, si è osservato che kindlin-2, una proteina che regola l'attivazione delle β -integrine, e la proteina di attivazione dei fibroblasti FAP svolgono un ruolo importante nel promuovere la crescita e la progressione del PDAC.

Oltre ad una comunicazione di tipo paracrina, i CAF possono interagire con le cellule cancerose pancreatiche (PCC) anche attraverso gli esosomi. Takikawa et al. hanno dimostrato che i PSC umani rilasciano esosomi contenenti una varietà di microRNA incluso miR-21-5p, che stimolano la proliferazione, la migrazione e l'espressione di mRNA di chemiochine nei PCC. A loro volta, gli esosomi derivati dalle PCC potrebbero aiutare a mantenere il fenotipo CAF attivato (Q.Sun et al. 2018).

2) I CAF REGOLANO L'INVASIONE E LA METASTASI DEL PDAC

È stato dimostrato che le aPSC possono regolare l'invasione e la metastasi del PDAC promuovendo la transizione epitelio mesenchimale (EMT) nelle cellule tumorali del pancreas. L'EMT favorisce la metastatizzazione del tumore primario in quanto è un processo che consente alle cellule tumorali di perdere le loro caratteristiche epiteliali e di acquisire un fenotipo mesenchimale. Le modalità con cui i CAF promuovono l'EMT nelle PCC non sono state del tutto chiarite; tuttavia Wu et al. hanno osservato che l'IL-6 secreta dalle aPSC potrebbe indurre la transizione epitelio mesenchimale attraverso la via di segnalazione Stat3/Nrf2, in quanto l'IL-6 secreto dalle aPSC può legarsi ai recettori di membrana delle PCC ed attivare la via di segnalazione JAK/Stat3 la quale a sua volta attiva Nrf2. Nrf2 a questo punto

attiva i fattori di trascrizione correlati all'EMT i quali guidano l'espressione dei geni che inducono EMT nelle PCC. (Fig. 8)

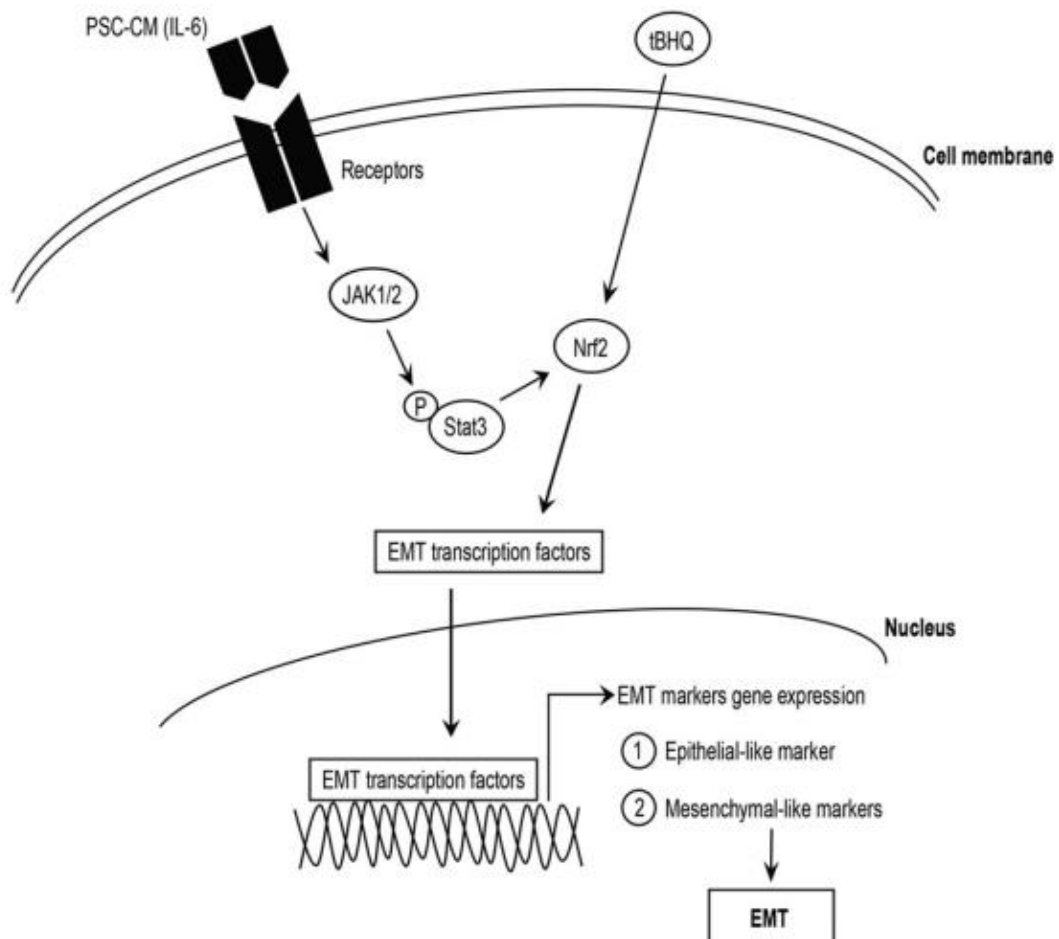


Figura 8. Ruolo dell'IL-6 secreta dalle PSC nell'induzione di EMT tramite la via di segnalazione Stat3 / Nrf2. (Y.S. Wu et al. 2017).

Un'altra modalità con cui i CAF possono indurre EMT è attraverso l'espressione dell'asporina; questa proteina altamente espressa dai CAF interagendo con il recettore transmembrana CD44 presente sui PCC, porta all'attivazione di NF- κ B/p65 promuovendo così la transizione epitelio mesenchimale nei PCC. Oltre all'asporina anche il fattore di crescita degli epatociti (HGF) è coinvolto nel cross-talk tumore-CAF. L'HGF, secreto principalmente dalle cellule stromali, promuove la mitosi e la motilità cellulare legandosi allo specifico recettore, c-Met, che è espresso sulla superficie dei PCC. Infine anche i miRNA possono essere coinvolti nell'EMT indotta da PSC, in quanto nei PCC è stata riscontrata un aumento di espressione di miR-210 quando sono stati coltivati con i CAF, inoltre l'inibizione dei miR-210 ha ridotto la migrazione cellulare e l'EMT indotta dai CAF nei PCC (Q.Sun et al. 2018).

3) CAF E ANGIOGENESI NEL PDAC

L'angiogenesi tumorale, ovvero la formazione di nuovi vasi a partire dai preesistenti, rappresenta un processo cruciale nello sviluppo e nella progressione del tumore in quanto portano nutrimento al tumore in crescita e costituiscono un'ottima via di disseminazione del tumore. I CAF attraverso la produzione costante del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) intervengono nel promuovere l'angiogenesi tumorale. Oltre al VEGF, i CAF

esprimono diverse molecole che regolano l'angiogenesi come i recettori VEGF (VEGFR), l'angiopoietina-1 e il suo recettore Tie-2 e il vasohibin-1. Inoltre è stato dimostrato che la chemochina CXCL12 prodotta dai CAF può cooperare con CXCL8 che è, invece, secreto dalle cellule tumorali pancreatiche, nel promuovere l'angiogenesi.

4) CAF E METABOLISMO TUMORALE NEL PDAC

Il microambiente stromale tipico del PDAC limita la circolazione ematica in prossimità delle cellule tumorali e riduce l'efficienza dei vasi nel trasporto di ossigeno e sostanze nutritive creando così un ambiente altamente ipossico e povero di nutrienti. Studi recenti hanno dimostrato l'esistenza di un cross-talk metabolico CAF-PCC, attraverso il quale i fibroblasti associati al cancro aiutano le cellule del carcinoma pancreatico a crescere e proliferare in un ambiente ostile. In particolare, è stato scoperto che l'alanina secreta dai CAF attraverso l'autofagia, viene importata in cellule PDAC e convertita in piruvato dall'alanina transaminasi per supportare il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA), riducendo così la dipendenza del tumore dal glucosio e dai nutrienti derivati dal siero che sono limitati nel microambiente tumorale. Inoltre è interessante notare che la secrezione di alanina da parte delle PSC dipende dall'autofagia delle PSC e tale processo viene stimolato dalle cellule

tumorali probabilmente attraverso la segnalazione paracrina, sebbene il fattore induttore rimanga sconosciuto.

Esiste una seconda modalità di comunicazione metabolica CAF-PCC che consiste nell'induzione di glicolisi aerobica da parte delle cellule tumorali nei CAF vicini. Le PCC infatti attraverso la produzione di ROS riducono l'espressione di caveolina-1 (Cav-1) nei fibroblasti associati al cancro (CAF). La riduzione di Cav-1 è sufficiente per indurre glicolisi aerobica nei CAF i quali inizieranno così a produrre lattato e piruvato (metaboliti energetici derivanti dalla glicolisi aerobica) che potranno essere assorbiti dalle cellule tumorali supportandone la crescita. I CAF instaurano quindi un rapporto simbiotico con le cellule tumorali in cui è possibile osservare un trasferimento di energia unilaterale dalle cellule stromali alle cellule tumorali (Q.Sun et al. 2018).

5) CAF E CHEMIORESISTENZA NEL PDAC

È stato dimostrato che i CAF promuovono la chemioresistenza attraverso differenti modalità; in particolare, i CAF, interagendo con le PCC, possono ostacolare l'assorbimento della gemcitabina agendo come fonti di induttore angiogenico 61 (CYR61) ricco di cisteina, il quale regola negativamente i trasportatori nucleosidici (hENT1 e hCNT3) che mediano l'assorbimento cellulare della gemcitabina.

I CAF possono inoltre fungere da barriera biofisica ai farmaci in quanto sono in grado di sequestrare la gemcitabina, limitando così la disponibilità del farmaco per le cellule tumorali. Alcuni ricercatori hanno scoperto che i CAF possono indurre chemioresistenza anche attraverso la secrezione dei fattori di crescita insulino-simili (IGF1-IGF2) i quali attivano i recettori IGF sulle cellule tumorali del pancreas. La combinazione di gemcitabina con l'anticorpo anti-IGF ha infatti aumentato la risposta dei tumori del pancreas alla gemcitabina in vivo (L. Ireland et al. 2016).

Long et al. hanno rilevato la presenza di una seconda via di segnalazione paracrina CAF-PCC che media la comunicazione intercellulare: IL-6. Infatti è stato osservato che l'attivazione di STAT3 nei PCC indotta da IL-6, derivata dai CAF, potrebbe mediare la chemioresistenza nel PDAC; quindi l'interruzione della segnalazione di IL-6 usando anticorpi anti-IL6R potrebbe migliorare l'efficacia chemioterapica nel PDAC. Recentemente è stato scoperto che anche gli esosomi partecipano alla comunicazione tumore-CAF associato alla chemioresistenza in quanto il trattamento dei CAF esposti alla gemcitabina con un inibitore del rilascio di esosomi, GW4869, ha ridotto significativamente la sopravvivenza nelle cellule epiteliali in co-cultura (Long et al. 2017).

6) I CAF REGOLANO L'IMMUNITÀ TUMORALE NEL PDAC

L'immunosoppressione è una delle caratteristiche distintive del PDAC ed è sostanzialmente dovuta ad una inefficace infiltrazione di linfociti T, alla produzione di citochine immunosoppressive e ad un aumento delle cellule immunosoppressive quali le cellule T regolatorie (Treg), i macrofagi associati al tumore (TAM) e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC). I fibroblasti associati al cancro, producendo grandi quantità di citochine e chemochine, contribuiscono in modo importante alla formazione di un microambiente immunosoppressivo. In particolare, il TGF- β secreto dai CAF sopprime l'attivazione delle cellule natural killer (NK), dei linfociti T citotossici (CTL) e innesca la differenziazione delle cellule immunosoppressive Treg; inoltre i CAF attraverso la secrezione paracrina di M-CSF (fattore stimolante le colonie macrofagiche) e di ROS inducono i TAM a differenziarsi nel fenotipo

anti-infiammatorio (M2). I macrofagi associati al tumore, a seconda degli stimoli ambientali, possono differenziarsi in un fenotipo pro-infiammatorio (M1) o anti-infiammatorio (M2). I macrofagi con fenotipo M2 sono incapaci di indurre l'attivazione dei linfociti T e al tempo stesso rilasciano una serie di fattori come TGF- β , IL-10, MMP e fattori pro-angiogenici considerati pro-tumoralmente. L'M-CSF è anche coinvolto insieme ad altre citochine

immunosoppressive come IL-6, IL-8, IL-10 (prodotte sia dai CAF che dalle cellule tumorali), nel promuovere il reclutamento e la differenziazione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC). Le MDSC sono una popolazione eterogenea di cellule mieloidi immature che si mobilitano dal midollo osseo e si attivano per inibire la capacità delle cellule T e delle cellule NK di eliminare le cellule tumorali attraverso l'esaurimento dei nutrienti richiesti dai linfociti, la generazione di stress ossidativo e altri meccanismi. L'attività delle cellule T può anche essere compromessa dalla galectina 1 secreta dai CAF, in quanto questa proteina è in grado di indurre l'apoptosi. Infine i CAF attivati possono ridurre ulteriormente la risposta immunitaria antitumorale attraverso la produzione di CXCL12, un'importante chemochina capace di sequestrare le cellule T CD8 + che esprimono alti livelli di CXCR4 sulla loro superficie riducendo così la migrazione delle cellule T CD8 + verso i compartimenti stromali vicini al tumore, impedendo il loro accesso alle cellule tumorali.

1.6 Chemochine

La comunicazione tra le varie tipologie cellulari che compongono il microambiente tumorale è essenziale nel promuovere la progressione del PDAC e si realizza attraverso il rilascio di molteplici componenti quali: fattori di crescita, citochine e chemochine. Negli ultimi anni le chemochine stanno

emergendo come mediatori chiave nel cross-talk tra cellule tumorali e il microambiente tumorale, in quanto oltre a svolgere un ruolo essenziale in processi di embriogenesi, angiogenesi e chemiotassi hanno anche un'importante funzione nel controllare e regolare lo sviluppo del tumore.

Le chemochine sono una famiglia di proteine a basso peso molecolare (8-14KDa) che possiedono una struttura comune caratterizzata da residui di cisteina conservati all'N-terminale. In base al numero e alla posizione dei residui di cisteina, vengono divise in 4 sottofamiglie: CXC (2 residui di cisteina separati da un amminoacido qualsiasi), CX3C (due residui separati da tre amminoacidi qualsiasi), CC (2 residui di cisteina adiacenti l'uno all'altro,) e C (un solo residuo di cisteina). Sulla base della loro produzione costitutiva o inducibile, sono classificate rispettivamente in chemochine omeostatiche e infiammatorie. Le chemochine omeostatiche sono prodotte nel timo e nei tessuti linfoidei e hanno un ruolo nel regolare il traffico e il posizionarsi dei globuli bianchi e di altre cellule dell'organismo, mentre le chemochine infiammatorie sono regolate da citochine pro-infiammatorie e agiscono reclutando monociti, neutrofilo e altre cellule effettrici dal sangue verso siti di infezione o di danno tissutale. I recettori delle chemochine sono principalmente ancorati alla superficie dei leucociti e sulla base del loro meccanismo d'azione sono divisi in due gruppi: recettori accoppiati a proteine

G e recettori atipici, che agiscono attraverso il legame con la β -arrestina; inoltre l'interazione tra chemochina e recettore non è completamente esclusiva, infatti, ogni recettore può legare più di una chemochina e una chemochina può riconoscere più di un recettore (Righetti et al., 2019).

In particolare, in PDAC è stato osservato che la chemochina CXCL12 oltre ad essere un segnale importante nei processi biologici, avrebbe il ruolo di promuovere la crescita del tumore, l'angiogenesi e la metastasi. Tuttavia alcuni studi mostrano funzioni opposte, per tale motivo questa chemochina è oggetto di numerose ricerche volte a chiarire il ruolo pro-tumorale o anti-tumorale di CXCL12.

1.7 CXCL12

CXCL12, nota anche come fattore 1 derivato dalle cellule stromali (SDF-1), è una chemochina omeostatica che interviene non solo in processi fisiologici quali embriogenesi, ematopoiesi, angiogenesi, proliferazione e sopravvivenza cellulare, ma ha un ruolo importante anche in processi patologici caratterizzati da infiammazione cronica, infezioni da HIV, crescita tumorale e fenomeni metastatici. CXCL12 si distingue rispetto ad altri membri della famiglia delle chemochine CXC per la sua posizione cromosomica; mentre la maggior parte dei geni per le chemochine CXC si trovano sul cromosoma 4q21; il gene che codifica per CXCL12 si trova sul cromosoma 10q11. Nell'uomo sono state

identificate 7 differenti isoforme di CXCL12 (α , β , γ , δ , ϵ , θ e iso 7) derivanti da eventi di splicing. Queste isoforme vengono secrete sotto forma di pro-peptide e, in seguito, sono sottoposte al taglio proteolitico di 21 AA all'N-terminale. CXCL12 è espresso da numerose tipologie cellulari come cellule stromali, epiteliali, dendritiche e fibroblasti appartenenti a tessuto pancreatico, epatico e cardiaco. Inoltre CXCL12 viene secreto nel microambiente tumorale dai CAF. L'espressione e l'attività di CXCL12 sono regolate da tre diversi fattori: ipossia, degradazione da parte di CXCR7 e modifiche post-traduzionali. L'ipossia, che è una condizione caratteristica degli stadi infiammatori, attraverso il fattore HIF-1 (fattore inducente ipossia) induce l'espressione e la secrezione di CXCL12; al contrario, il recettore atipico CXCR7 (anche noto come ACKR3) può agire come "scavenging" in quanto è in grado di sequestrare e internalizzare CXCL12 dall'ambiente extracellulare. Infine, le modifiche post-traduzionali, sia chimiche che enzimatiche, possono alterare le funzioni di CXCL12; in particolare, le modifiche chimiche come la citrullinazione mediata dall'enzima PAD (peptidilarginina deiminasi) e la nitratura indotta dal perossinitrito inibiscono la trasduzione del segnale e la chemiotassi attivata da CXCL12. Mentre per quanto riguarda le modifiche enzimatiche, CXCL12 può essere proteoliticamente degradata sia all'estremità N-terminale che C-terminale; la proteolisi dell'N-terminale

mediata da serine proteasi (DPP4) avviene lentamente, è indipendente dalla variante di splicing e si verifica sia nel sangue che nei tessuti. Al contrario, la degradazione del C-terminale ad opera delle carbossipeptidasi e della catepsina X è rapida, è dipendente dalla variante di splicing e si verifica solo nel sangue. La proteolisi all’N-terminale disattiva l'attività di CXCL12 e diminuisce la sua affinità di legame al recettore, mentre la proteolisi al C-terminale non inattiva CXCL12 ma diminuisce la sua attività della metà, attenuando la stabilizzazione GAG-dipendente di CXCL12 sulla superficie cellulare (M. Janowski 2009). Tuttavia, solo CXCL12 α , è suscettibile a questo processo in quanto la degradazione proteolitica delle chemochine al C terminale nel sangue è impedita dal quarto esone (Fig.9).

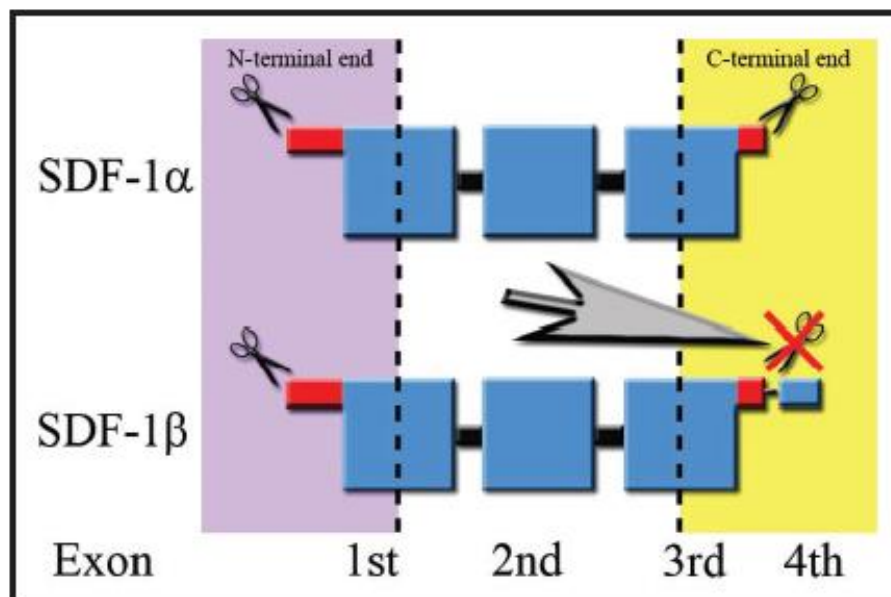


Figura 9. Siti di taglio delle proteasi; il quarto esone non rende disponibile il sito di taglio alle peptidasi (M. Janowski 2009).

1.7.1 Differenti isoforme di CXCL12

Nell'uomo sono state identificate sette diverse isoforme della chemochina CXCL12: l'isoforma alfa (α), l'isoforma beta (β), l'isoforma gamma (γ), l'isoforma delta (δ), l'isoforma epsilon (ϵ), l'isoforma teta (θ), mentre l'isoforma iso-7 è stata solo predetta (Fig.10).

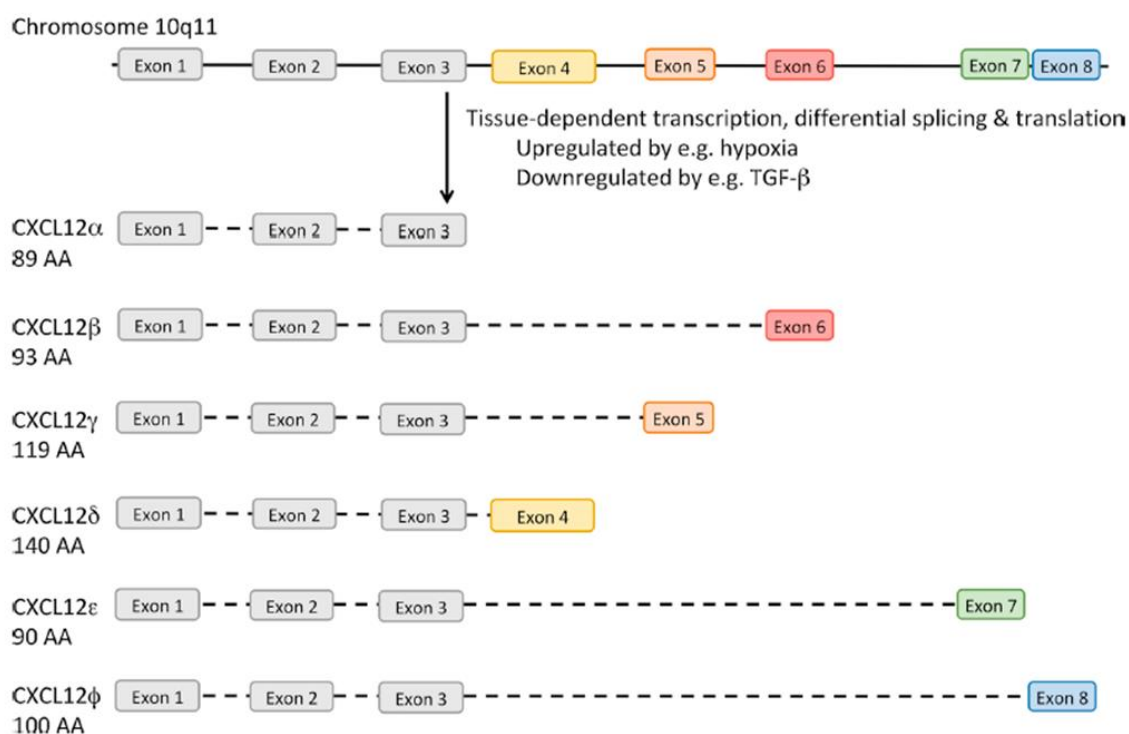


Figura10. A partire da un unico mRNA sono prodotte 7 differenti isoforme che condividono i primi tre esoni ma si differenziano per il quarto. L'immagine non riporta l'iso-7 (R. Janssens et al, 2018).

Tutte queste varianti di splicing presentano un'identica sequenza per i primi tre esoni, mentre si differenziano per il quarto esone al C-terminale che, oltre a determinare la lunghezza di ciascuna isoforma, potrebbe anche essere il responsabile della differente attività svolta dalle 7 varianti (Fig.10).

Inoltre, tutte le varianti presentano la stessa struttura secondaria posta tra le estremità disordinate N e C-terminale che consiste di tre foglietti β anti-paralleli e un' α -elica sovrastante.

I primi otto residui all'N-terminale svolgono un ruolo importante nell'interazione di CXCL12 con il recettore di membrana; in particolare, i primi due AA (Lys-1 e Pro-2) attivano CXCR4, mentre gli altri sei consentono il legame ligando-recettore. Il legame di CXCL12 al recettore viene inoltre stabilizzato dai GAG (glicosamminoglicani) come l'eparina e l'eparan solfato che si possono trovare sulla superficie cellulare attaccati alle proteine a formare i proteoglicani, oppure come componenti della matrice extracellulare. I GAG sono lunghi polimeri carichi negativamente in grado di interagire con la porzione ordinata e l'estremità C-terminale di CXCL12 cariche positivamente. L'affinità delle differenti isoforme ai GAG varia in funzione della lunghezza del quarto esone, di conseguenza l'isoforma gamma essendo quella con il quarto esone più esteso mostra la massima affinità per i GAG (Fig.11) ed è per questo motivo che SDF-1 γ non si trova quasi mai in forma libera; inoltre l'interazione chemochina-GAG genera nella matrice extracellulare quel gradiente indispensabile all'attività chemiotattica della chemochina e protegge CXCL12 dal taglio proteolitico del terminale NH₂.

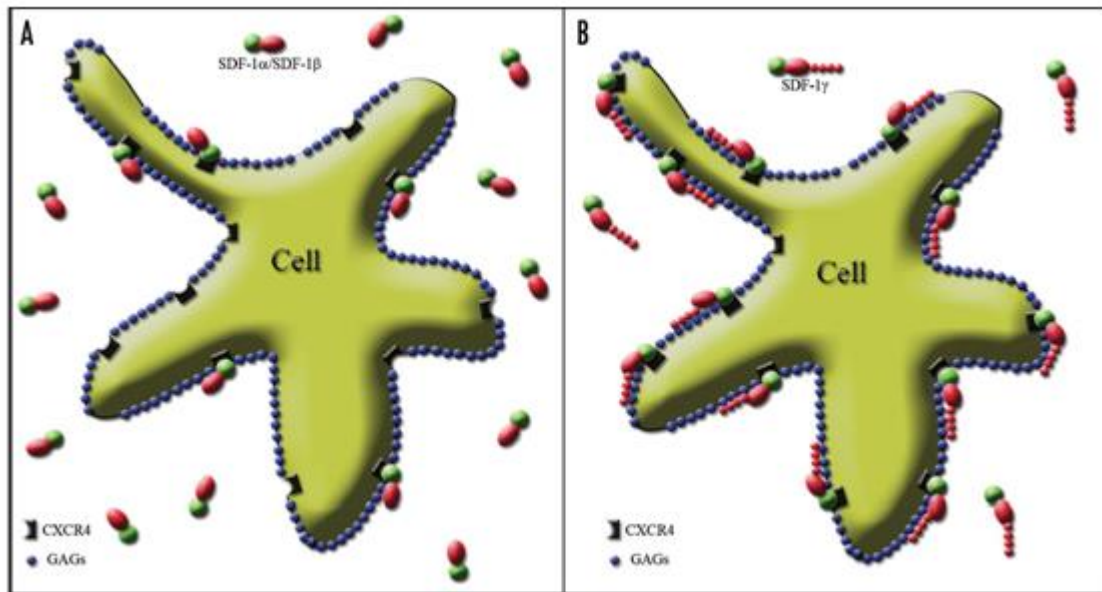


Figura 11. Differente forza del legame di CXCL12 (SDF-1) con CXCR4 sulla superficie cellulare dipendente dalla variante di splicing. La parte attiva della molecola SDF-1 che si lega al recettore è contrassegnata in verde, mentre e la parte carica positivamente della molecola SDF-1 è rappresentata in rosso (M. Janowski 2009).

- ❖ **CXCL12 α:** è l'isoforma più conosciuta e più studiata. Questa variante è altamente espressa nei tessuti ma non si ritrova nel sangue in quanto nel circolo ematico è sottoposta ad una rapida degradazione enzimatica. In particolare è stata individuata nel: midollo osseo, pancreas, fegato, polmoni, milza, cuore, linfonodi e intestino. CXCL12α partecipa a molti processi fisiologici specifici del tessuto da cui è rilasciata quali, ad esempio, la regolazione delle cellule staminali ematopoietiche nel midollo osseo, la guida delle cellule germinali primordiali durante lo sviluppo, la neuromodulazione nel sistema nervoso centrale; inoltre la

sua interazione con i recettori CXCR4 e CXCR7 innesca il processo di angiogenesi (*Righetti et al., 2019; M. Janowski, 2009*).

- ❖ **CXCL12 β** : la funzione di questa isoforma è analoga a quella dell'isoforma α in quanto anch'essa è implicata nel processo di angiogenesi, ma a differenza di quest'ultima grazie alla presenza del quarto esone non è soggetta alla degradazione C-terminale nel circolo ematico. CXCL12 β presenta cinque residui amminoacidici in più all'estremità N-terminale in grado di legarsi all'eparan solfato della matrice extracellulare. Questa variante è particolarmente espressa in organi altamente vascolarizzati come fegato, milza e reni, ma è stata rilevata anche nel midollo osseo e pancreas (*Righetti et al., 2019*).
- ❖ **CXCL12 γ** : è l'isoforma con la maggiore affinità di legame ai GAG. Tale interazione consente a CXCL12 γ di formare un legame stabile con il recettore riducendo la sua presenza in forma libera nel circolo ematico e la sua degradazione all'N-terminale, mentre la degradazione al C-terminale è inibita dalla presenza del quarto esone. Questa isoforma, a differenza delle precedenti, è altamente espressa negli organi con scarsa vascolarizzazione, come cuore e cervello mentre è del tutto assente nei tessuti fetali. Grazie alla sua interazione stabile con il recettore l'effetto di questa variante dura più a lungo nel tempo ed è

l'isoforma che maggiormente stimola la chemiotassi in vivo (*Righetti et al., 2019*).

- ❖ **CXCL12 δ, ϵ, θ e iso-7:** Queste tre isoforme sono abbondantemente espresse nel pancreas. L'isoforma δ è espressa anche nel fegato, nella milza e nei polmoni, mentre le isoforme ϵ e θ sono state osservate in cuore, rene e fegato (*Righetti et al., 2019*).

1.7.2 Recettori di CXCL12

La chemochina CXCL12 svolge le sue funzioni interagendo con due differenti recettori localizzati sulla membrana cellulare: CXCR4 e CXCR7.

1) **CXCR4** noto anche come cluster di differenziazione 184 (CD184) è il tipico recettore dotato di sette domini transmembrana accoppiato a proteine G (GPCR). Inizialmente fu identificato come co-recettore dell'HIV e solo dopo alcuni anni si scoprì che CXCL12 è il ligando naturale di CXCR4. Questo recettore è espresso in differenti tipologie cellulari, cellule tumorali comprese. In particolare lo si ritrova nei leucociti, nei linfociti, nelle cellule staminali progenitrici epiteliali e ematopoietiche, nelle cellule degli organi linfoidei come il midollo osseo, nel timo e nei linfonodi, nel polmone, nell'intestino tenue, nelle cellule non ematopoietiche, come le cellule endoteliali, epiteliali e fibroblasti.

Esistono due isoforme alternative di CXCR4: CXCR4-A e CXCR4-B. L'isoforma CXCR4-B è più espressa e subisce un processo di splicing, mentre l'isoforma CXCR4-A non subisce lo splicing ma differisce di 5 amminoacidi ed è quattro amminoacidi più lungo al terminale NH₂; tuttavia entrambe le isoforme risultano attive.

L'espressione di CXCR4 può essere regolata da numerose molecole, in particolare i fattori di crescita (BFGF, VEGF) le citochine (Interleuchine e TGF- β) così come i secondi messaggeri (AMP ciclico e calcio) inducono la trascrizione del recettore, mentre il fattore respiratorio nucleare 1 (NRF-1) e il repressore trascrizionale YY1 (Yin Yang 1) inibiscono la sua espressione.

Il legame di CXCL12 alla porzione extracellulare di CXCR4 induce un cambiamento conformazionale che coinvolge il dominio citoplasmatico del recettore con l'acquisizione di uno stato ad alta affinità per la proteina G eterotrimerica $\alpha\beta\gamma$. L'associazione del trimero $\alpha\beta\gamma$ con il recettore determina il rilascio del GDP legato alla subunità α e la sua sostituzione con il GTP; questa modificazione a sua volta causa la dissociazione della proteina G eterotrimerica nella subunità α ($G\alpha$) legata al GTP e nel dimerio $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$). Entrambe le unità ora dissociate possono interagire con proteine bersaglio che sono generalmente canali ionici oppure degli enzimi quali adenilciclasti, fosfolipasi, fosfodiesterasi. Sulla base della somiglianza di sequenza, le

subunità $G\alpha$ sono state divise in quattro famiglie: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_{12}$. Queste subunità attivano diverse vie di segnalazione, di conseguenza a seconda della subunità legata CXCR4 può attivare differenti pathway. In particolare la subunità $G\alpha_s$ attiva l'adenilato ciclasi, quindi la sintesi dell'AMP ciclico (cAMP) il quale si lega alla protein-chinasi dipendente da cAMP (PKA). Le PKA fosforilano serine o treonine di una vasta gamma di proteine bersaglio che possono essere altre proteine di segnalazione così come proteine effettrici. La $G\alpha_i$ invece inibisce la via di segnalazione PKA in quanto determina l'attivazione della fosfodiesterasi e della fosfolipasi, inoltre induce l'attivazione di PI3K che può essere attivato anche dal dimero $G\beta\gamma$. Una volta attivato PI3K va a fosforilare diversi fattori importanti per l'adesione e la migrazione cellulare quali PYK2 (tirosin-chinasi ricca in prolina), PAXILLINA, CRK e P130cas. PI3K inoltre può portare all'attivazione della serina-treonina chinasi AKT che interviene nel promuovere la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali, del fattore di trascrizione NF-kB e di MEK1; quest'ultimo è un membro della cascata di segnalazione MAPK che a sua volta attiva ERK1/2.

ERK1 / 2 (protein chinasi extracellulare regolata dal segnale) ha un ruolo importante nel fornire segnali extracellulari al nucleo e questi segnali regolano il ciclo cellulare, la proliferazione cellulare e lo sviluppo cellulare.

Infine la subunità $G\alpha_q$ attiva fosfolipasi specifiche del fosfatidilinositolo come la fosfolipasi C-gamma (PLC-gamma), che idrolizza il fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato (PIP2) per generare inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). Il DAG attiva diverse isoforme PKC che si sono dimostrate importanti per la chemiotassi indotta da CXCL12, mentre IP3 è idrosolubile e diffonde nel citosol legandosi ai canali di rilascio del Ca^{2+} (recettori dell'IP3), immersi nella membrana del reticolo endoplasmatico liscio (REL). Il legame di IP3 con tali canali induce la fuoriuscita di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico liscio, facendone rapidamente aumentare la concentrazione nel citosol. Il Ca^{2+} può attivare la calmodulina, una proteina molto abbondante nel citoplasma che non possiede attività enzimatica e si lega ad altre proteine della cellula attivandole. Un bersaglio molto comune del complesso Ca^{2+} /calmodulina è la Calcineurina, una chinasi Ca^{2+} dipendente che attiva il fattore di trascrizione NFAT.

Anche la subunità $G\beta\gamma$ interviene a mediare la segnalazione indotta dal legame di CXCL12 al recettore CXCR4, in quanto oltre ad attivare PI3K, stimola i fattori di scambio di nucleotidi di guanidina (GEF) quali TIAM1 e PREX1 specifici per le GTPasi della famiglia Rho come Rac, Rho e CDC42. Queste GTPasi a loro volta attivano percorsi che regolano il citoscheletro.

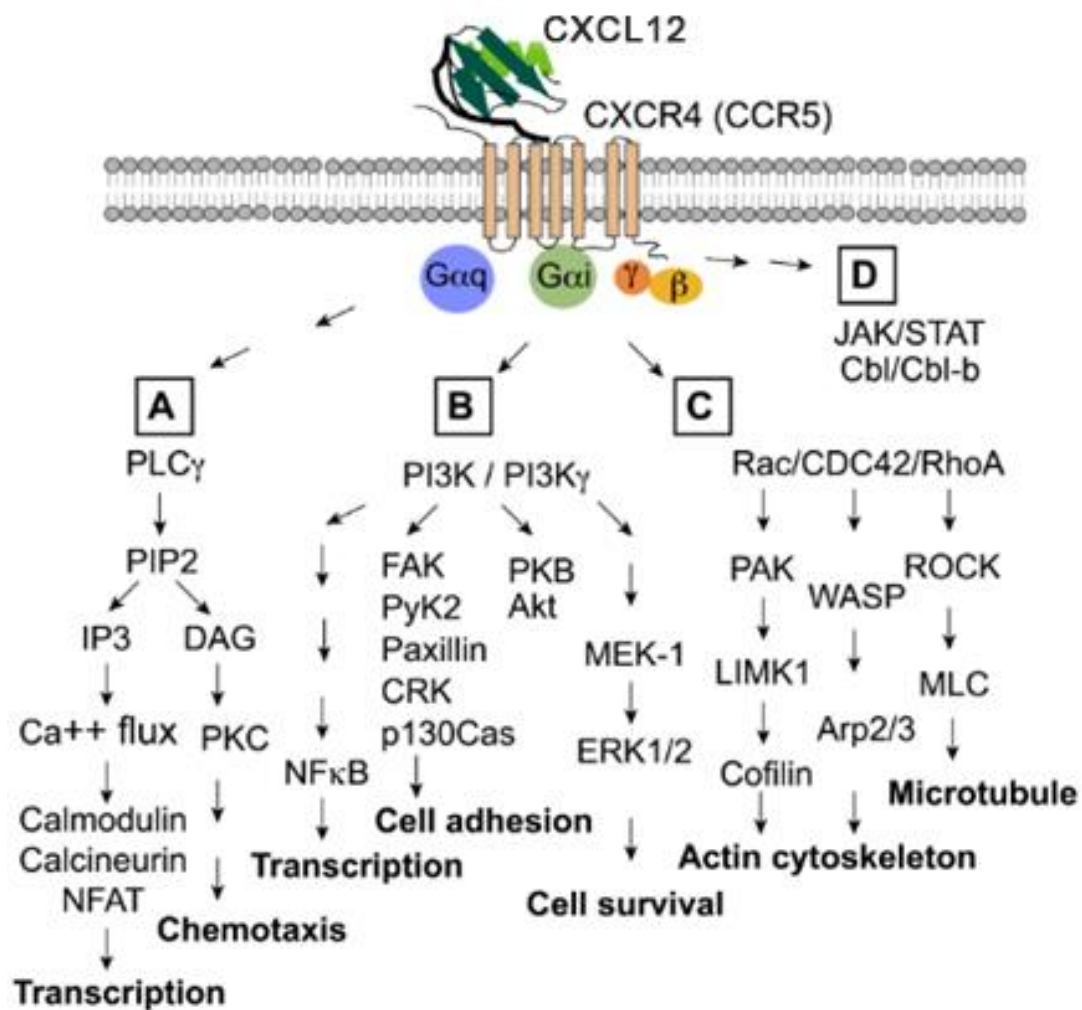


Figura 12. Pathway attivati dall'interazione di CXCL12 con CXCR4 (Y. Wu , A. Yoder 2009).

I recettori CXCR4 e CXCR7 si possono trovare sulla membrana cellulare sia sotto forma di monomeri che di dimeri (omo o etero-dimeri). Quando CXCL12 si lega al CXCR4 monomero, abbiamo visto che la segnalazione viene mediata dalla proteina G, mentre la formazione di eterodimeri CXCR4 / CXCR7 sposta la segnalazione dalle proteine G alla β -arrestina; infine alcuni autori hanno osservato che l'omodimerizzazione di CXCR4 indotta dal

legame di CXCL12 dà origine a segnali indipendenti dalle proteine G attraverso la via di segnalazione JAK / Stat.

Una volta avviato il meccanismo di trasduzione del segnale, CXCR4 viene internalizzato e trasportato nei lisosomi dove verrà degradato, escludendo la possibilità che possa essere riutilizzato per una nuova interazione con CXCL12.

2) CXCR7

CXCR7 è un secondo recettore per CXCL12 ed è anche noto come recettore per le chemochine "atipico" ACKR3 a causa del suo differente metodo di attivare la trasduzione del segnale, ossia mediato esclusivamente dalla β -arrestina. Oltre a legare CXCL12 con un'affinità 10 volte superiore a CXCR4, CXCR7 mostra affinità anche per la chemochina CXCL11. Questo recettore è espresso da diversi tipi di cellule, come cellule ematopoietiche, cellule endoteliali, cellule della placenta e cellule endoteliali di tessuti tumorali; inoltre è altamente espresso in molti tipi di cellule tumorali e sulla superficie cellulare dei linfociti T, coinvolti nel fenomeno della chemiotassi mediata da CXCL12. La funzione di CXCR7 ad oggi non è stata del tutto compresa, infatti alcuni autori ritengono che abbia un ruolo pro-tumorale in quanto mediante la beta arrestina attiva la via di segnalazione MAPK, mentre altri sostengono che agendo da scavenging possa avere una funzione anti-

tumorale. Secondo quest'ultimi, CXCR7 agirebbe sottraendo CXCL12 dall'ambiente extracellulare ed impedendo il suo legame a CXCR4, in quanto una volta che CXCL12 si è legato al recettore il complesso ligando-recettore viene internalizzato ma a differenza di CXCR4, CXCR7 non viene degradato ma riciclato sulla superficie cellulare.

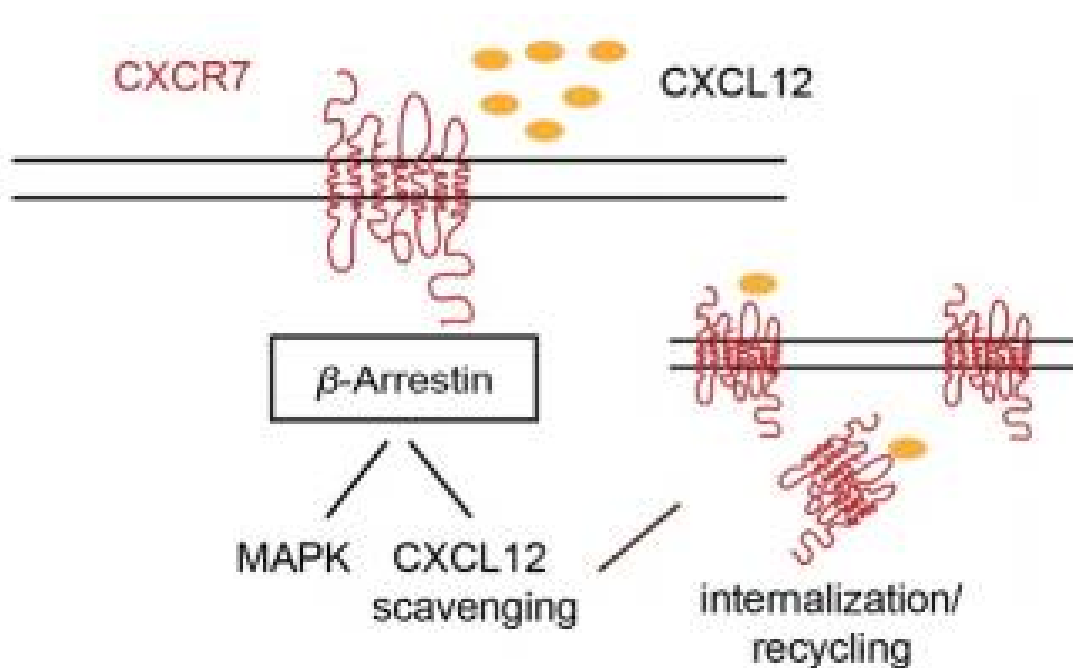


Figura 13. Pathway attivati dall'interazione di CXCL12 con CXCR7 (ACKR3) (Tulotta et al. 2019).

1.8 CXCL12 e analgia

I bassi tassi di sopravvivenza associati al PDAC sono dovuti principalmente a diagnosi tardive in quanto nelle fasi iniziali della malattia i sintomi non si manifestano. Uno Studio recente ha infatti dimostrato che le lesioni precoci del carcinoma del pancreas sono in grado di sopprimere il dolore attraverso la chemioattrazione mediata da CXCL12 delle cellule di Schwann. È noto da tempo che le PCC hanno un'elevata propensione a metastatizzare precocemente nei nervi intratumorali che secernano chemochine; tuttavia Demir et al. nel loro lavoro sono andati “contro” la teoria classica di NI (invasione neuronale) ipotizzando che le cellule pancreatiche precancerose secernono la chemochina CXCL12 che attrae le cellule di Schwann (SC) dei nervi periferici durante la carcinogenesi. I ricercatori hanno considerato questa nuova possibilità dopo aver osservato la presenza delle SC intorno alle lesioni precursori precancerose di diversi tumori gastrointestinali umani e murini, in quanto ciò implica che sono le cellule nervose e non le cellule tumorali a migrare per prime durante la NI entrando così in contrasto con il presupposto tradizionale. La successiva scoperta del fatto che le cellule di Schwann esprimono i recettori CXCR4/CXCR7 ha ulteriormente supportato questa nuova teoria.

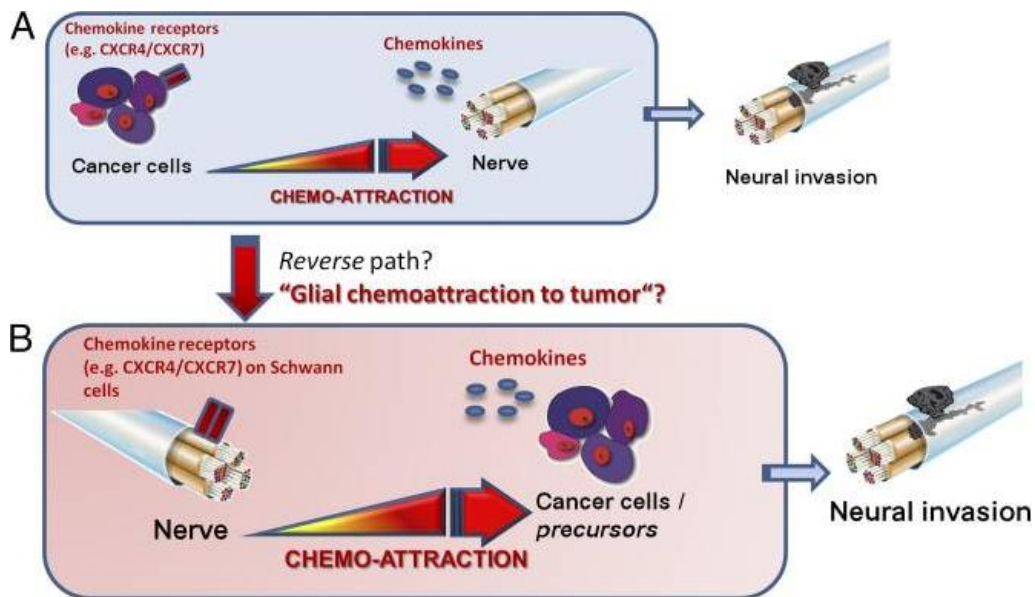


Figura 14. (A) Teoria classica di NI nel cancro; (B) Percorso inverso (Demir et al. 2016).

Demir et al. nel loro studio hanno quindi dimostrato che le cellule SC dei nervi periferici che esprimono CXCR4 / CXCR7 sono attratte dalla chemochina CXCL12 intorno alle lesioni precursori del PDAC dando così inizio all'invasione neuronale; inoltre l'ipossia così come le citochine (in particolare IL-6) presenti nel microambiente tumorale determinano l'attivazione delle cellule SC le quali a loro volta sopprimono l'attività dell'astroglia e della microglia spinale, riducendo così la sensazione di dolore sia nel PDAC murino che umano (fig. 15).

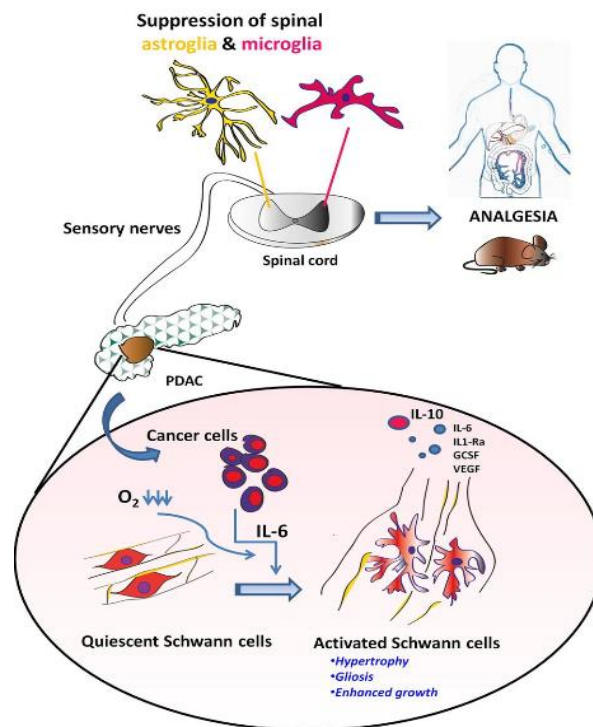


Figura 15. Effetto dell'attivazione delle SC in PDAC murino e umano (I.E. Demir, et al. Gut 2016).

1.9 CXCL12 E PDAC

Numerosi studi condotti per fare luce sul ruolo della chemochina CXCL12 e sulla sua interazione con i recettori CXCR4 e CXCR7 hanno rilevato che l'asse CXCL12/CXCR4 sembra giocare un ruolo importante nei processi di:

1) **Invasione e migrazione** → è stato osservato che CXCL12 aumenta l'espressione e l'attività delle metalloproteasi MMP nelle cellule tumorali del pancreas promuovendo così l'invasione della matrice extracellulare in quanto questa viene degradata dalle MMP. Inoltre la segnalazione CXCL12/CXCR4 svolge un ruolo importante nel promuovere invasione e migrazione,

inducendo nelle PCC l'attivazione della cascata di segnalazione MEK1/2-ERK1/2 e l'espressione delle molecole di adesione.

2) **Metastasi** → la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) è un passo necessario per la metastasi del cancro. L'asse CXCL12/CXCR4 induce EMT nelle cellule tumorali del pancreas attraverso l'attivazione del percorso Hedgehog e Wnt. Studi recenti hanno inoltre rilevato che nel PDAC il recettore CXCR4 è espresso nelle cellule tumorali pancreatiche ma non è stato rilevato nelle cellule stellate presenti nel microambiente tumorale; viceversa, la chemochina CXCL12 è altamente espressa dai CAF (soprattutto dalle PSC) e nei siti comuni di metastasi pancreatiche come fegato e polmone mentre non è espressa dalle cellule tumorali pancreatiche. Questi dati suggeriscono che l'asse di segnalazione CXCL12 CXCR4 può svolgere un ruolo importante nell'indurre le cellule tumorali del pancreas a metastatizzare in organi specifici.

3) **Angiogenesi** → L'asse di segnalazione CXCL12/CXCR4 è associato alla formazione di vasi sanguigni nel carcinoma del pancreas in quanto è stato osservato che tra i vari recettori delle chemochine, CXCR4 è quello che presenta il livello di espressione maggiore nelle cellule endoteliali vascolari. Di conseguenza, la chemochina CXCL12 secreta dalle cellule stromali del cancro del pancreas può promuovere l'angiogenesi tumorale attirando le

cellule endoteliali nello stroma tumorale e aumentando la loro proliferazione tramite l'asse CXCL12 / CXCR4.

4) *Chemioresistenza* → La chemochina CXCL12 può proteggere le cellule pancreatiche tumorali dall'apoptosi indotta da Gemcitabina mediante l'inattivazione post-traduzionale del meccanismo di morte cellulare (CXCL12 può attivare Akt e ERK con conseguente inattivazione della proteina di morte cellulare BAD) e inducendo una maggiore trascrizione di geni correlati alla sopravvivenza cellulare.

Tuttavia il ruolo pro-tumorale di CXCL12 è stato messo in dubbio da alcuni studi che hanno invece ipotizzato un'attività anti-tumorale di questa chemochina nel PDAC. In recenti indagini inducendo l'espressione costitutiva del gene CXCL12 nelle cellule MiaPaca2, normalmente silenziato attraverso processi epigenetici, è stata osservata una evidente riduzione della capacità di crescita e migrazione. In vivo tale fenomeno è stato confermato da una significativa riduzione delle dimensioni del tumore primario associato ad un incremento del tasso di sopravvivenza.

Sono quindi necessarie ulteriori indagini per comprendere non solo il ruolo pro o anti-tumorale di CXCL12, ma anche l'effettivo ruolo che ciascuna isoforma di CXCL12 svolge nel PDAC. Potrebbe infatti emergere che le diverse isoforme di CXCL12 abbiano funzioni differenti; tuttavia ad oggi

sono necessari ulteriori studi, in parte perché nei lavori condotti finora non è sempre chiaro quale isoforma sia stata studiata e, in parte, perché le isoforme ricombinanti di δ , ε , θ non sono ancora commercialmente disponibili.

2. SCOPO DELLA TESI

L'ipotesi emersa dalle ricerche condotte fino ad ora sulla chemochina CXCL12 è che ciascuna isoforma potrebbe esercitare effetti differenti sul PDAC.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare gli effetti indotti dal trattamento con le isoforme commercialmente disponibili di CXCL12 quali: CXCL12- α , CXCL12 β , CXCL12 γ su quattro differenti linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico: Panc-1, Mia PaCa-2, AsPC-1, Capan-2 e su una linea cellulare pre-tumorale hTERT-HPNE E6 / E7 / K-RasG12D.

In particolare, in questo studio è stato valutato l'effetto del trattamento con CXCL12- α , CXCL12 β , CXCL12 γ in termini di variazione di espressione genica e modifiche fenotipiche, cercando di comprendere se le differenti isoforme abbiano un ruolo pro o anti tumorale in PDAC.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

In questo studio sono state utilizzate quattro differenti linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico umano quali: Panc-1, Mia PaCa-2, AsPC-1, Capan-2 e una linea cellulare pre-tumorale hTERT-HPNE E6 / E7 / K-RasG12D, ottenuta a seguito della trasfezione con il plasmide pLXSN che ne ha indotto una mutazione puntiforme G12D sul gene K-Ras. Le AsPC-1 sono cellule tumorali pancreatiche metastatiche; il sito metastatico da cui derivano le AsPC-1 è l'ascite. Per il mantenimento in coltura delle Panc-1, Mia PaCa-2 e hTERT-HPNE viene utilizzato il terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM/ HIGH) complementato con il 10% v/v di siero fetale bovino (FBS) inattivato per riscaldamento a 56°C, l'1% v/v degli antibiotici streptomicina e penicillina e l'1% v/v dell'amminoacido L-Glutamina. Per le AsPC-1 invece il terreno utilizzato è l'RPMI-1640 complementato con il 20% v/v di siero fetale bovino (FBS), l'1% v/v di L-Glutamina, l'1% v/v degli antibiotici streptomicina e penicillina e 1mM di Sodio Piruvato. Infine le Capan-2 vengono mantenute in coltura con il terreno McCoy's 5A complementato con il 10% v/v di FBS e l'1% v/v degli

antibiotici streptomicina e penicillina. Le cellule vengono mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C con il 5% di CO₂ e il 95% di umidità. Al raggiungimento di una confluenza di circa l'80%, il terreno viene rimosso e le cellule vengono lavate con 3 ml di PBS al 1% (Phosphate Buffered Saline) sterile. Successivamente le cellule vengono staccate dalla superficie della fiasca con 500 µl di Tripsina-EDTA (1 ml di Tripsina-EDTA x Capan-2) e dopo 10 minuti di incubazione a 37°C, la tripsina viene inattivata grazie all'aggiunta di 3 ml di terreno. Dopo aver recuperato le cellule che si sono staccate in una falcon da 15 ml le Panc-1 e Mia PaCa-2 vengono centrifugate a 2100 rpm per 5 minuti, le hTERT-HPNE a 2500 rpm per 7 minuti mentre le cellule AsPC-1 e le Capan-2 a 1700 rpm per 5 minuti. Il pellet di cellule che si ottiene viene poi risospeso in 1 ml di terreno. Per eseguire la conta cellulare si preleva un'aliquota di 30 µl di cellule, successivamente si diluiscono prima 1:4 con PBS poi 1:2 con il colorante Trypan Blue, poi vengono analizzate attraverso la camera di Burker.

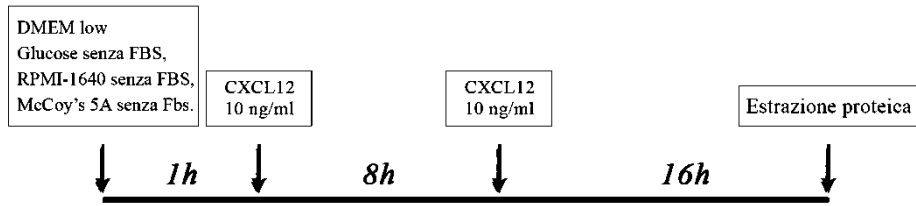
3.2 Trattamento delle cellule con CXCL12 α , β e γ

Per eseguire i trattamenti con le differenti isoforme di CXCL12 su tutte e 5 le linee cellulari, 1.000.000 di cellule Panc-1, Mia PaCa-2 e 1.800.000 di cellule AsPC-1, Capan-2 e hTERT-HPNE sono state piastrate in piastre di coltura

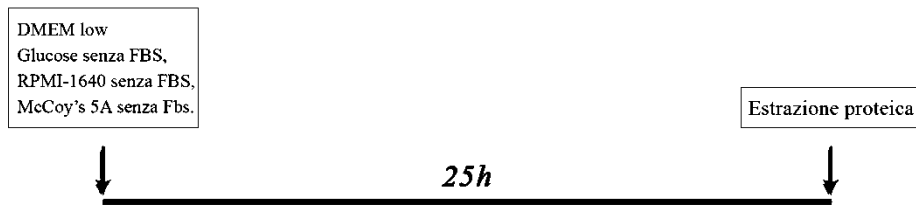
sterili Petri P100 con l'aggiunta di 10 ml dei corrispondenti terreni di coltura.

Una volta raggiunta una confluenza del 70/80%, i terreni sono stati rimossi e le cellule sono state lavate con 4 ml di PBS sterile.

Successivamente prima di eseguire i trattamenti le Panc-1, Mia PaCa-2 e hTERT-HPNE sono state messe in coltura per 1 ora con DMEM low Glucose senza FBS mentre le cellule AsPC-1 con RPMI-1640 senza FBS e le Capan-2 con il terreno McCoy's 5A sempre senza FBS. In seguito, le cellule sono state trattate per 24h ad intervalli di tempo di 8 e 16 ore con 10 ng/ml delle seguenti isoforme: CXCL12- α (PHC1346, Thermo), CXCL12- β (2716-SD, R&D) e CXCL12 γ (6448-SD, R&D). Queste uniche varianti commercialmente disponibili sono state prodotte in Escherichia Coli, ma non viene chiarito quale porzione proteica ci sia veramente nei prodotti acquistati. Le cellule non trattate, ma mantenute nei medesimi terreni usati per i trattamenti sono state utilizzate come controllo.



Rappresentazione grafica dei trattamenti eseguiti.



Cellule non trattate utilizzate come controllo.

3.3 Western Blot

Il western blot o immunoblot è una tecnica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Questa metodica prevede sei differenti fasi elencate di seguito.

3.3.1 Estrazione proteica

L'estrazione proteica delle cellule trattate con le diverse isoforme in piastre Petri da 10cm prevede come prima cosa la rimozione del terreno di coltura e il lavaggio delle cellule adese alla superficie della piastra con 2 lavaggi da 2ml di PBS freddo, così da poter eliminare gli eventuali residui di terreno rimasti.

Dopo di che in ciascuna Petri vengono aggiunti 300 μ l di una soluzione contenente il RIPA buffer, gli inibitori delle proteasi e gli inibitori delle fosfatasi (Sodio Ortovanadato, Sodio Fluoride e PMSF (phenylmethyl sulfonylfluoride)). Dopo un periodo di incubazione in ghiaccio di 30 minuti le cellule vengono rimosse dalla piastra mediante l'utilizzo dello scraper e il lisato viene trasferito in eppendorf da 1.5ml, per poi essere centrifugato a 15.000xg per 15 minuti a 4°C. Successivamente si recupera il surnatante e si procede alla determinazione della concentrazione proteica mediante il metodo colorimetrico "Bradford".

3.3.2 Determinazione della concentrazione dell'estratto proteico

Il metodo Bradford è un saggio colorimetrico che si basa sull'interazione non-covalente di un colorante (il Coomassie Brilliant Blue G250) con le proteine. Il colorante si lega primariamente ai residui basici ed aromatici, e la formazione di questi complessi determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465nm a 595 nm, che può essere misurato spettrofotometricamente. I valori ottenuti allo spettrofotometro vengono confrontati con i valori ottenuti da una retta di taratura, dalla quale si ricava l'assorbanza di 1 mg/ml, dato necessario affinché si possa risalire alla concentrazione dei campioni in esame. Per la costruzione della retta di taratura, è necessario preparare diluizioni seriali di diverse quantità di BSA

(Albumina Sierica Bovina). Dopo aver determinato la concentrazione degli estratti proteici, ai campioni viene aggiunto il Sample Buffer 4x e il β -mercaptoetanolo, per poi essere conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

3.3.3 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE) è una tecnica di separazione elettroforetica delle proteine in condizioni denaturanti e consente di separare le proteine in base al loro peso molecolare grazie alla presenza dell'SDS, un detergente anionico che annulla la carica propria delle proteine e le carica negativamente: le proteine avranno tutte carica negativa netta e migreranno verso il polo positivo; la velocità di migrazione delle singole proteine dipenderà così solo dal loro peso molecolare. Prima di effettuare la corsa, i campioni diluiti nel buffer di caricamento contenente β -mercaptoetanolo (un agente denaturante che rompe i ponti disolfuro essenziale per mantenere la struttura della proteina), vengono mantenuti alla temperatura di $95-100^{\circ}\text{C}$ per 5 minuti per poi essere raffreddati in ghiaccio in modo da consentire la denaturazione delle proteine. Successivamente viene caricato un determinato quantitativo di proteina, circa $30-40\mu\text{g}$ per ciascun pozzetto. Un pozzetto è usualmente riservato per un marcatore, una miscela commerciale di proteine con peso molecolare definito,

tipicamente colorate così da formare bande colorate visibili. Quando la tensione elettrica è applicata lungo il gel in presenza del buffer di corsa, le proteine migrano attraverso esso a velocità differenti, in funzione della loro dimensione. Queste differenti velocità di avanzamento generano bande dentro ciascuna corsia. La corsa viene effettuata a 130 Volt per un'ora e mezza.

3.3.4 Trasferimento su membrana di nitrocellulosa

Le proteine separate mediante SDS-PAGE sono trasferite elettricamente su un foglio di nitrocellulosa per renderle accessibili ad uno specifico anticorpo. Le proteine si muovono dal gel alla membrana mantenendo l'organizzazione presente nel gel. Per eseguire il trasferimento è stato allestito un sandwich costituito, nell'ordine dall'anodo al catodo, da una spugna, 2 fogli di carta assorbente, dalla membrana di nitrocellulosa, dal gel di poliacrilamide, da altri 2 fogli di carta assorbente e spugna; i quali sono stati precedentemente immersi per qualche minuto nel tampone di trasferimento. La procedura di trasferimento viene eseguita applicando una corrente di 250 mA per circa 2 ore. Il corretto trasferimento delle proteine dal gel viene verificato colorando la membrana di nitrocellulosa con Rosso Ponceau in 5% di acido acetico preparato per una colorazione rapida che si ottiene immergendo la membrana per pochi minuti nella soluzione e poi effettuando dei lavaggi più volte con TBST.

3.3.5 Bloccaggio

Dopo aver trasferito le proteine sulla membrana di nitrocellulosa è necessario prevenire le interazioni tra la membrana e l'anticorpo usato per rilevare la proteina bersaglio. Il bloccaggio dei legami non specifici si ottiene immergendo la membrana in una soluzione diluita di proteina (soluzione di blocking), in genere BSA (Albumina Sierica Bovina) al 5% in TBST per un'ora in agitazione a temperatura ambiente. La proteina nella soluzione diluita attecchisce alla membrana in tutti i punti dove le proteine bersaglio non hanno attecchito. Questo riduce il "rumore" di fondo, portando risultati più puliti, e eliminando falsi positivi.

3.3.6 Incubazione con anticorpo primario e secondario

Dopo la fase di bloccaggio la membrana viene incubata overnight in agitazione a 4°C con l'anticorpo primario che si legherà con la proteina di interesse. L'anticorpo primario viene diluito 1:2000 in una soluzione di TBS 1X e BSA 1%. Successivamente si eseguono 3 lavaggi in TBST (TBS 1X, TWEEN-20 0.1%) per poi incubare la membrana con l'anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con l'enzima HRP (Horseradish Peroxidase) diluito 1:3000 in una soluzione di TBS1X e BSA 1% per 1 ora a temperatura ambiente al buio.

Gli anticorpi primari utilizzati negli esperimenti effettuati sono i seguenti:

- Anticorpo monoclonale anti-CD44 (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-CD133 (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-PDL1 (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-Vimentina (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-E-caderina (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-N-caderina (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-CD24 (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-Bcl-XL (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-Caveolina-1 (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-NFkb (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-pNFkb (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-p38 MAPK (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-Pp38 MAPK (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-STAT3 (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-pSTAT3 (Cell Signalling);
- Anticorpo monoclonale anti-GAPDH (Cell Signalling).

3.3.7 Rilevazione del segnale

I complessi antigene-anticorpo sono analizzati mediante una reazione di chemiluminescenza. Questa reazione avviene in condizione di buio bagnando la membrana con una soluzione chemiluminescente (ECL). Tale soluzione contiene luminolo e H_2O_2 che interagendo con l'enzima coniugato all'anticorpo secondario, genera una reazione chemiluminescente. Il segnale viene visualizzato attraverso l'esposizione in camera oscura di una lastra fotografica appoggiata sulla membrana precedentemente coperta da una pellicola. La lastra viene mantenuta in esposizione per un tempo sufficiente affinché avvenga la reazione di luminescenza tale da impressionarla. Le bande ottenute sono state poi quantizzate mediante il software imageJ.

3.4 Estrazione dell'RNA

Per eseguire l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il Kit di estrazione RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, il quale si basa sull'utilizzo di colonne ad affinità con matrice di silice. Tali colonne consentono di purificare l'RNA direttamente dal lisato cellulare. Come prima cosa quindi, le cellule hTERT-HPNE trattate con le diverse isoforme e le cellule di controllo non trattate sono state staccate dalla superficie della piastra mediante Tripsina-EDTA. Una volta ottenuto il pellet sono stati aggiunti 300 μ l del reagente Protect Cell, in

grado di stabilizzare l'RNA ancora presente nelle cellule. Successivamente si esegue una centrifuga a 7500 RPM in modo da rimuovere il surnatante in cui si concentrerà il reagente per poi procedere con la lisi cellulare aggiungendo il buffer RLT. Il lisato così ottenuto viene prima trasferito in colonnine gDNA Eliminator, in modo da rimuovere tutto il DNA, dopo di che si aggiunge etanolo al 75% (v/v) e si trasferisce il campione in colonnine RNeasy spin per poi essere centrifugato a 13000 RPM per 15 secondi. In questo modo si ottiene il legame selettivo dell'RNA totale alla membrana, rimuovendo ogni tipo di contaminante. Infine vengono eseguiti dei lavaggi della membrana con opportuni tamponi per poi procedere all'eluizione dell'RNA con acqua RNase-free. Una volta quantificata la concentrazione di RNA estratto i campioni vengono conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

3.5 Quantificazione dell'RNA estratto con Nanodrop

Il Nanodrop è uno spettrofotometro che consente di ottenere una rapida quantificazione di proteine e acidi nucleici a partire da microvolumi senza la necessità di utilizzare cuvette. Una volta inserito un volume di 2µl del campione da quantificare sulla superficie ottica di rilevazione, il software collegato allo strumento misura l'assorbanza alle diverse lunghezze d'onda e calcola i rapporti di concentrazione e purezza. In particolare, viene letta

l'assorbanza a 260 nm per gli acidi nucleici, a 230nm per polisaccaridi e a 280 nm per le proteine. Il software restituisce come valore l'assorbanza e la concentrazione del campione espressa in ng/ μ l. Per determinare la purezza del campione di RNA, viene calcolato il rapporto tra le assorbanze emesse a 260/230 nm e 260/280 nm; il primo deve essere ~2 mentre il secondo deve essere compreso tra 1.8 e 2. Rapporti di purezza significativamente differenti possono indicare una possibile contaminazione fenolica o proteica.

3.6 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione è una tecnica che consente di retrotrascrivere l'RNA in una molecola di DNA complementare (cDNA), il quale può essere utilizzato come stampo in una successiva reazione di amplificazione. Per tale scopo è stato utilizzato il kit HyperScript™ First strand Synthesis Kit che comprende tutti i componenti necessari per effettuare la sintesi del cDNA, quali la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (M-MLV), ingegnerizzata in modo da possedere ridotta attività RNAsi H e una maggiore stabilità termica, l'inibitore della RNAsi, i primer oligo dT, i dNTP e l'acqua Nuclease free. I primer oligo dT sono sequenze oligonucleotidiche di timidina pensate per appaiarsi alla coda poliadenilata degli mRNA, in questo modo solo gli mRNA presenti nel campione costituiscono un template per la sintesi

del cDNA. La reazione di retrotrascrizione inizia con la preparazione di un mix di reazione contenente RNA, dNTPs, H₂O e i primer oligo dT. La miscela di reazione viene incubata a 65°C per 5 minuti e poi mantenuta in ghiaccio per 1 minuto allo scopo di denaturare tutte le strutture secondarie dell'RNA. Successivamente al campione sono stati aggiunti la trascrittasi inversa, il DTT (ditiotreitolo, agente stabilizzante della retrotrascrittasi), il buffer di reazione 10x RTase e l'inibitore dell'RNasi. I campioni sono stati quindi trasferiti nel termociclatore dove è avvenuta la reazione di sintesi del cDNA. Il cDNA così ottenuto è stato poi utilizzato in reazioni di real-time PCR per quantificare i livelli di espressione di determinati geni target.

3.7 Real-Time PCR

La Real-Time PCR o qPCR (PCR quantitativa), è una tecnica che consente la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA o cDNA stampo, attraverso il monitoraggio in tempo reale, dell'intensità di fluorescenza che si libera dal prodotto di amplificazione durante la reazione a catena della DNA polimerasi. Ciò è possibile grazie all'utilizzo di fluorofori, coloranti fluorescenti in grado di legarsi alle copie di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione. Il SYBER GREEN è uno dei fluorofori più utilizzati nelle reazioni di Real-time PCR. Esso si lega in modo aspecifico al solco minore

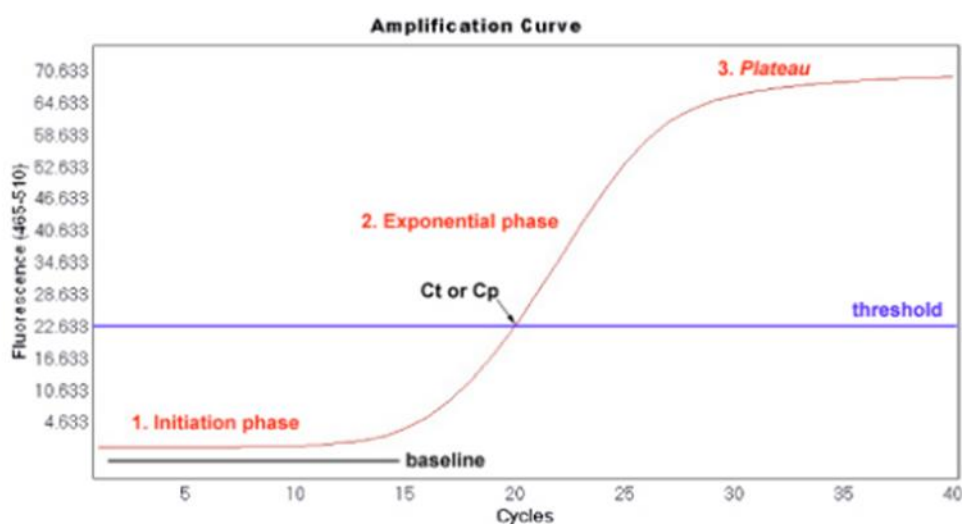
della doppia elica di DNA e se eccitato ad una lunghezza d'onda di 490 nm emette un segnale fluorescente. La lettura della fluorescenza avviene alla fine di ogni ciclo di amplificazione e sarà quindi direttamente proporzionale alle molecole di DNA a doppio filamento presente in ogni campione. Al termine del processo lo strumento fornirà la curva di amplificazione relativa a ciascun campione, in cui è riportato il segnale di fluorescenza rilevato ad ogni ciclo. Tale diagramma esibisce un andamento tipicamente sigmoide, caratterizzato fondamentalmente da tre fasi:

- ❖ una prima fase in cui al susseguirsi dei cicli di amplificazione non corrisponde un significativo incremento di fluorescenza; ciò è dovuto al fatto che la quantità di prodotto amplificato genera un segnale fluorescente che si mantiene al di sotto della soglia di rilevabilità dello strumento;
- ❖ una fase esponenziale in cui, con l'avanzare dei cicli termici, inizia a diventare significativo l'incremento di fluorescenza dovuto all'accumulo di prodotto di amplificazione; in questa fase tutti i reagenti sono nel loro rapporto ottimale di concentrazione e per questo la quantità di amplificato che si forma risulta direttamente proporzionale alla quantità di stampo (template) iniziale;

- ❖ una fase di plateau in cui l'intensità di fluorescenza non aumenta in maniera significativa al progredire del numero dei cicli a causa di una ridotta disponibilità dei substrati consumati nel corso della reazione: la quantità di amplificato che si forma non è più direttamente proporzionale alla quantità di DNA stampo.

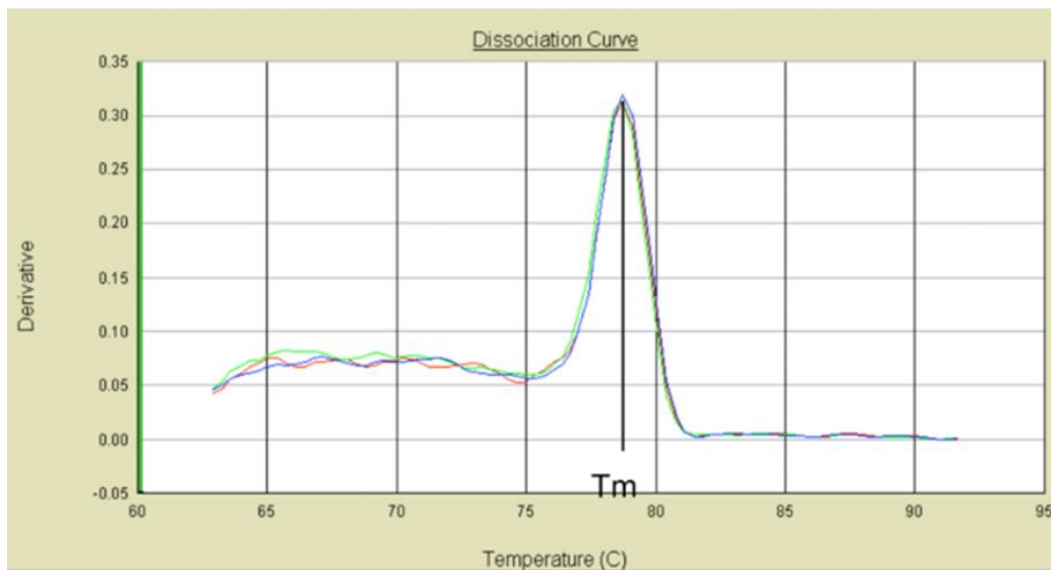
Sul grafico sono inoltre riportati due parametri importanti: la linea base della curva (baseline) e la linea soglia (threshold). La linea base della curva è una linea orizzontale dove si trovano i primi cicli di Real-Time PCR in cui non è misurabile la variazione nel segnale della fluorescenza. La linea soglia, invece, è una linea parallela alla linea base che interseca le curve dei campioni nella fase esponenziale. Il punto di intersezione rappresenta il ciclo soglia (threshold cycle) CT , valore fedele della quantità iniziale del DNA. Il CT di ogni campione è inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale: infatti minore è la quantità di materiale di partenza, più cicli saranno necessari per raggiungere la linea soglia.

In questo studio è stato utilizzato il kit TB Green Premix EX Taq (Takara).



3.7.1 Curva di Melting

Negli esperimenti di Real-Time PCR condotti mediante l'impiego di sostanze fluorescenti che si intercalano in modo aspecifico alla doppia elica del DNA amplificato (SYBER GREEN), al termine del processo di amplificazione, il software elabora la curva di melting. Tale curva fornisce, importanti indicazioni sulla "purezza" del prodotto di amplificazione e quindi sull'attendibilità del risultato ottenuto. Ogni amplificato di PCR ha la sua curva di melting caratteristica, in quanto ciascun frammento di DNA a doppio filamento avrà uno specifico valore di T_m che dipenderà dalla sua lunghezza e dalla sua composizione in basi. Quindi, conoscendo la T_m dell'amplicone che si deve quantizzare mediante Real-Time PCR, è possibile indagare sulla specificità del prodotto di reazione. La curva di melting si ottiene alla fine della reazione dei cicli di amplificazione incrementando la temperatura da 65 a 95°C con step di 0.5°C ed effettuando la lettura della fluorescenza ad ogni step. In questa maniera, all'aumentare della temperatura, si assiste ad un graduale decremento della fluorescenza generato dalla denaturazione del prodotto di reazione (DNA a doppio filamento) e dal conseguente rilascio nel mezzo di reazione del colorante intercalante. La curva di melting consente quindi di verificare la presenza di fluorescenza aspecifica generata da dimeri di primers o da amplificati diversi dall'amplicone di interesse.



Esempio di curva di dissociazione (curva di melting): in ascissa viene riportata la temperatura (T) mentre in ordinata la derivata della fluorescenza (-dF/dT). Con Tm viene indicata la temperatura di melting che contraddistingue l'amplificato.

3.7.2 Quantizzazione

La Real-Time PCR è una metodica estremamente versatile; tuttavia, l'analisi dell'espressione genica risulta il settore di ricerca in cui questa tecnica di biologia molecolare mostra il suo più ampio impiego. La Real-Time PCR infatti viene spesso usata in combinazione con la reazione di retro-trascrizione (RT), in modo da quantificare i livelli di espressione di specifici geni di interesse. Per effettuare una quantificazione relativa dei trascritti che sono stati amplificati è stato utilizzato il metodo del $\Delta\Delta C_t$. Allo scopo di garantire la corretta normalizzazione tra i campioni, per ciascuno è stato considerato il ciclo soglia (C_t) del gene housekeeping GAPDH. Il metodo $\Delta\Delta C_t$ è basato sul calcolo aritmetico della differenza dei valori C_t (ΔC_t) tra il gene target del

campione trattato ed il GAPDH dello stesso campione. Allo stesso modo si calcola il valore ΔCT del gene target e del GAPDH nel campione di controllo. Il $\Delta\Delta CT$ sarà la differenza tra ΔCT del campione trattato e ΔCT del controllo. Il valore ottenuto sarà successivamente riportato in forma esponenziale (n-fold) secondo la formula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Un valore di n-fold < 1 indica una sottoespressione del gene di interesse nel campione trattato, rispetto al campione di controllo; viceversa un valore > 1 indica un incremento di espressione del gene nel campione trattato rispetto al controllo.

3.8 Wound Healing

Il Wound Healing è un saggio che viene utilizzato per valutare in vitro la capacità di migrazione cellulare. Questa metodica si basa sulla creazione di una “ferita” in un monostrato cellulare e nella cattura delle immagini subito dopo aver creato il solco e ad intervalli regolari durante la chiusura della ferita. Infine, le immagini vengono confrontate per quantificare la velocità di migrazione delle cellule. Le cellule tumorali pancreatiche Panc-1, Aspc-1 (60000 cellule per pozzetto) e le cellule pre-tumorali H-tert (50000 cellule per pozzetto) sono state seminate in piastre 24 well. Ciascuna delle 3 linee cellulari sono state seminate in 4 pozzetti e mantenute in coltura con terreni

DMEM (per Panc-1 e Htert) e RPMI (per Aspc-1) al 10 % di FBS. Una volta raggiunta la confluenza dell'80% i terreni sono stati rimossi e sostituiti con DMEM/RPMI all'1% di FBS. Il giorno seguente è stato creato un solco con un puntale sterile (p2000); il monostrato cellulare è stato dunque lavato con PBS per rimuovere le cellule galleggianti e per ciascun pozzetto è stato aggiunto 1ml di terreno di coltura DMEM/RPMI all'1% di FBS. A questo punto le cellule sono state trattate con le diverse isoforme di CXCL12 secondo il seguente schema: nel primo pozzetto di ciascuna delle 3 linee cellulari sono stati addizionati 10 ng/ml di CXCL12- α , nel secondo 10 ng/ml di CXCL12- β , nel terzo 10 ng/ml di CXCL12- γ , mentre il quarto è stato utilizzato come controllo, di conseguenza non è stata aggiunta alcuna isoforma. I trattamenti sono stati poi ripetuti dopo 8 e 12 ore. Le foto sono state scattate appena è stato effettuato il solco e ad intervalli regolari (di 6 h per 2 gg). La velocità di migrazione cellulare è stata valutata per 2 giorni.

4. RISULTATI

4.1 Western Blot

Mediante western blot è stato valutato se i trattamenti con le isoforme commercialmente disponibili di CXCL12: CXCL12- α , CXCL12- β , CXCL12- γ nelle cellule Panc-1, Mia PaCa-2, AsPC-1, Capan-2 e hTERT-HPNE inducono una variazione di espressione delle seguenti proteine: CD44, CD133, PDL-1, Vimentina, E-caderina, N-caderina. I livelli di espressione delle proteine: Bcl-XL, p38MAPK, Pp38 MAPK, NFkb, pNFkb, STAT3, pSTAT3 e Caveolina-1 sono stati invece valutati in Panc-1, AsPC-1 e hTERT-HPNE. I risultati ottenuti sono riportati in seguito raggruppati in base alle differenti funzioni proteiche.

1. CD44, CD24 e CD133

- **CD44** è una molecola di adesione espressa nella maggior parte delle cellule umane ed è implicata in un'ampia varietà di processi fisiologici e patologici, tra cui la ricerca e l'attivazione dei linfociti, la guarigione delle ferite, la migrazione cellulare e la regolazione della crescita e delle metastasi delle cellule tumorali. CD44 è noto per interagire con vari ligandi; In particolare CD44 ha capacità di legame verso l'acido ialuronico (HA, ligando principale), l'osteopontina (OPN), il collagene e le metalloproteinasi di matrice (MMP). HA e OPN sono molto

abbondanti nella nicchia delle cellule staminali leucemiche e nei tumori solidi di vari tipi di cancro, dove contribuiscono al mantenimento della staminalità delle cellule maligne. Di conseguenza, CD44 è stato riconosciuto come marcatore di cellule staminali tumorali (cellule tumorali altamente maligne e chemoresistenti) (I.Morath et al. 2016). Il recettore transmembrana CD44 è costituito da 4 domini: il dominio extracellulare (o ectodominio) che contiene motivi che fungono da siti di attracco per i vari ligandi, il dominio transmembrana responsabile dell'homing linfocitario e il dominio intracellulare / dominio citoplasmatico responsabile dell'interazione con le proteine del citoscheletro e dell'attivazione della segnalazione oncogenica intracellulare.



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina CD44 in cellule Panc-1 , hTERT-HPNE e Mia PaCa-2 sottoposte al trattamento con CXCL12- α , β , γ .

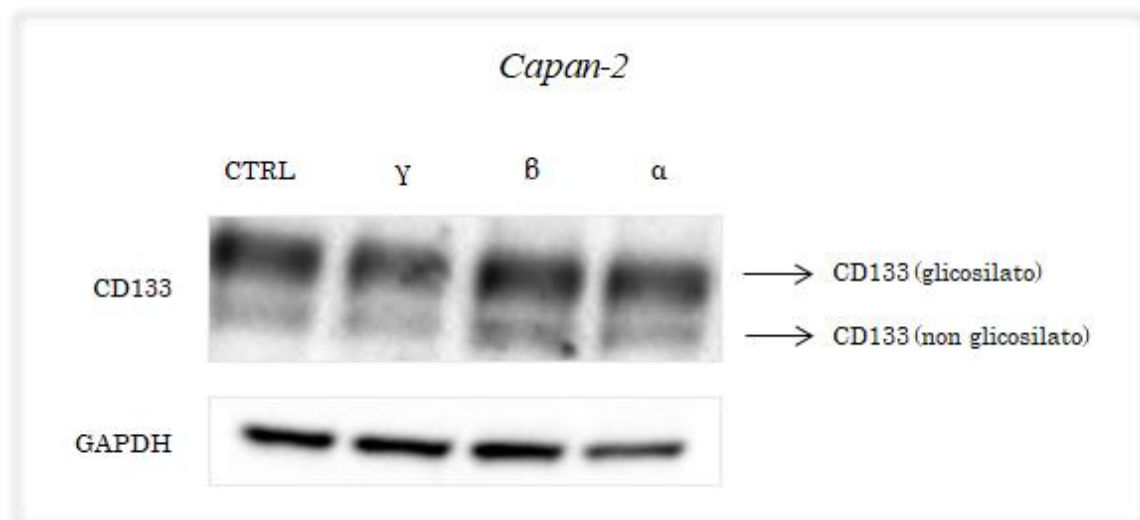
CD44	α	β	Γ
AsPC-1	NR	NR	NR
Capan-2	NR	NR	NR
MiaPaCa-2	1,51	1,92	1,46
Panc-1	1,21	0,86	1,26
hTERT-HPNE	1,53	2,44	1,5

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

Dall'analisi proteica è risultato che nelle cellule hTERT-HPNE e Mia PaCa-2 tutte e tre le isoforme inducono un aumento di espressione di CD44, anche se i campioni trattati con l'isoforma beta mostrano un incremento maggiore; mentre nelle Panc-1 l'espressione di CD44 rimane pressochè invariata. Nelle cellule Aspc-1 e Capan-2 non è stata rilevata l'espressione di CD44 né sui campioni di controllo né sui trattati.

- **CD133** o Promina è una glicoproteina transmembrana, di cui la reale funzione e i cui ligandi sono ancora prevalentemente ignoti. La sua espressione è stata osservata nelle protrusioni della membrana plasmatica, ed è l'antigene di superficie cellulare più frequentemente utilizzato per rilevare e isolare le cellule staminali tumorali (CSC) da vari tumori solidi, tra cui cervello, colon, pancreas, prostata, polmone e fegato. Le cellule staminali tumorali, sono responsabili della comparsa di recidiva, metastasi e sono chemioresistenti; di conseguenza risulta

fondamentale avere dei marker sempre più specifici per poterle identificare. Tuttavia, prove recenti suggeriscono che l'espressione di CD133, non è limitata ai CSC, ma viene espresso anche da cellule tumorali differenziate e in seguito alla differenziazione delle CSC l'epitopo glicosilato AC133 della glicoproteina CD133 viene perso (Kemper K et al. 2010). Di conseguenza, poiché gli anticorpi anti-CD133 tipicamente utilizzati (AC133 e AC141 mAb), riconoscono l'epitopo AC133 è emersa la possibilità che lo stato di glicosilazione di CD133, anziché l'espressione della stessa proteina CD133 possa agire come marcatore indiretto del fenotipo CSC (Bidlemaier et al. 2009).



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina CD133 in cellule Capan-2, sottoposte al trattamento con CXCL12- α,β,γ .

CD133 glicosilato	α	β	γ
AsPC-1	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
Capan-2	0,91	0,91	0,97
MiaPaCa-2	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
Panc-1	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
hTERT-HPNE	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

CD133 non glicosilato	α	β	γ
AsPC-1	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
Capan-2	1,3	1,35	1,1
MiaPaCa-2	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
Panc-1	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
hTERT-HPNE	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>

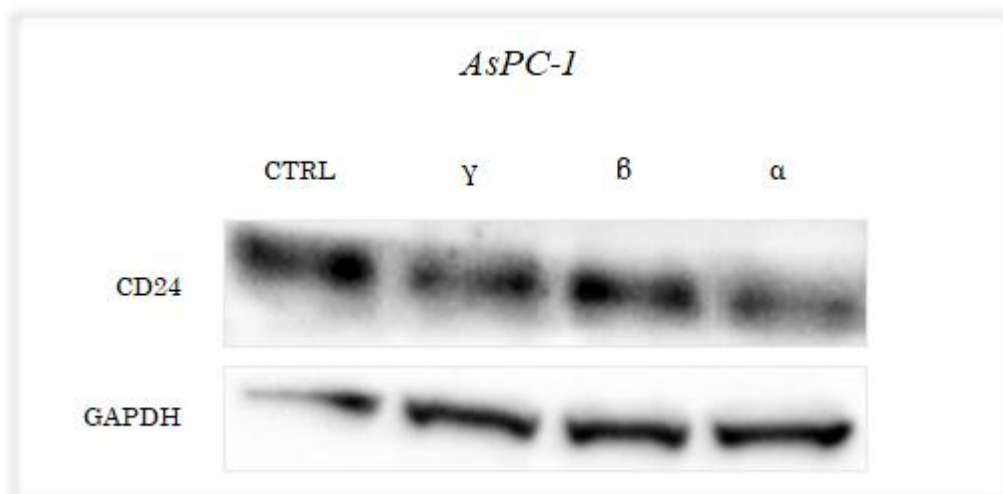
Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

CD133 totale	α	β	γ
AsPC-1	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
Capan-2	1,2	1,05	0,7
MiaPaCa-2	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
Panc-1	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
hTERT-HPNE	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

L'analisi dell'espressione proteica ha evidenziato che i livelli di CD133 glicosilato nelle cellule Capan-2 rimangono invariati in seguito ai trattamenti con CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ mentre la forma non glicosilata di CD133 aumenta nei campioni trattati con l'isoforma alfa e in quelli trattati con beta. L'espressione di CD133 totale diminuisce invece nei campioni trattati con l'isoforma gamma. Nelle restanti linee cellulari non è stata rilevata l'espressione di CD133.

- **CD24** (cluster di differenziazione 24) è una sialoglicoproteina di superficie che è sovraespressa in molti tumori e in alcune cellule staminali tumorali ed è associata allo sviluppo, all'invasione e alla metastasi delle cellule tumorali. Per questi motivi CD24 rappresenta un'importante marker di cellule staminali tumorali.



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina CD24 in cellule AsPC-1, sottoposte al trattamento con CXCL12- α,β,γ .

CD24	α	β	γ
AsPC-1	0,39	0,47	0,28
Panc-1	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
hTERT-HPNE	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

L'espressione di CD24 rilevata solamente nella linea cellulare metastatica Aspc-1 mostra una notevole riduzione in tutti i campioni trattati ma in modo particolare, nel campione trattato con CXCL12- β , l'espressione di CD24 viene ridotta di circa 4 volte rispetto al controllo.

2. PDL-1

PDL-1 (programmed death-ligand 1) è una glicoproteina di superficie cellulare, il cui ruolo è sopprimere la risposta immunitaria durante alcune condizioni come la gravidanza, malattie autoimmuni e stati patologici come ad esempio l'epatite. Diversi studi hanno dimostrato un suo coinvolgimento diretto, nel proteggere le cellule tumorali dalla lisi mediata dai linfociti T attivati. Normalmente le cellule tumorali, vengono attaccate dai linfociti T natural killer del sistema immunitario, che le riconoscono come estranee. Le cellule tumorali, tuttavia, possono sfuggire a questo destino, grazie alla produzione della proteina PDL-1. Questa proteina è in grado di legarsi a un recettore, chiamato PD-1, presente sulla superficie dei linfociti T natural killer,

impedendo l'attivazione e la proliferazione dei linfociti, quindi la distruzione della cellula cancerosa.



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina PDL-1 in cellule Mia PaCa-2 e hTERT-HPNE, sottoposte al trattamento con CXCL12- α, β, γ .

PDL-1	α	β	γ
AsPC-1	NR	NR	NR
Capan-2	NR	NR	NR
MiaPaCa-2	2,38	1,98	1,58
Panc-1	NR	NR	NR
hTERT-HPNE	5,9	5,8	4,4

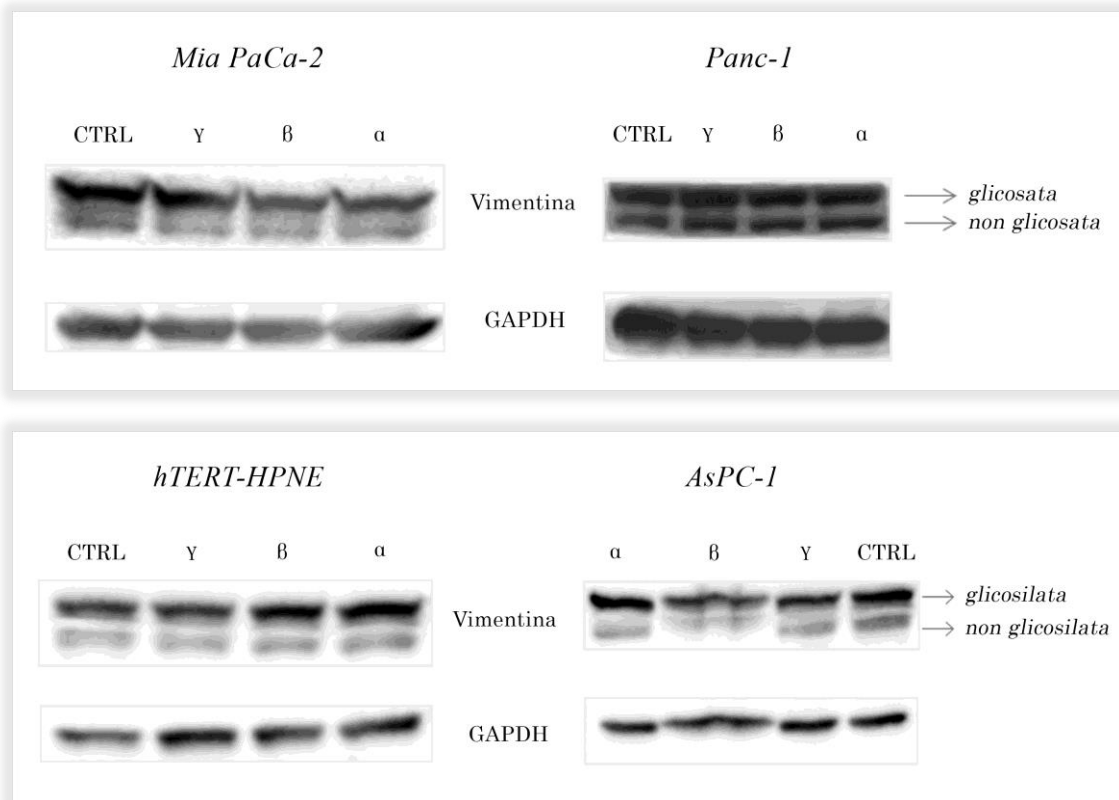
Dati ottenuti dall'analisi densitometrica eseguita mediante il software imageJ.

L'espressione di PDL-1 rilevata nelle cellule tumorali pancreatiche Mia Paca2 e nelle cellule pretumorali hTERT-HPNE mostra un elevato incremento nei trattati rispetto al controllo; in particolare l'incremento maggiore, sia nella MIA PaCa-2 che nelle hTERT-HPNE, si ha nei campioni trattati con

CXCL12- α . Questi risultati fanno quindi presupporre un possibile coinvolgimento di CXCL12 nel promuovere l'immunosoppressione in PDAC.

3. Vimentina, E-caderina, N-caderina

- **La Vimentina** è una proteina del citoscheletro appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi espressa nelle cellule mesenchimali. Questa proteina risulta inoltre sovraespressa in vari tumori epiteliali e tale espressione è correlata ad una maggiore aggressività del cancro. Oltre ad avere una funzione strutturale, la Vimentina è in grado di interagire con un gran numero di proteine partecipando così a numerose funzioni cellulari. Studi recenti, hanno rilevato la possibilità di utilizzare la Vimentina, come marcatore mesenchimale di EMT, in quanto è stato osservato che le cellule epiteliali che normalmente esprimono filamenti intermedi di cheratina quando, vanno incontro alla transizione epitelio mesenchimale iniziano ad esprimere filamenti intermedi di Vimentina (Arun Satelli e Shulin Li, 2011).



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina Vimentina in cellule Mia PaCa-2, hTERT-HPNE, Panc-1 e AsPC-1 sottoposte al trattamento con CXCL12- α , β , γ .

Vimentina non glicosilata	α	β	γ
AsPC-1	0,72	0,51	0,86
Capan-2	NR	NR	NR
MiaPaCa-2	1,2	1	0,71
Panc-1	1,1	1,02	0,97
hTERT-HPNE	0,94	1	0,97

Vimentina glicosilata	α	β	γ
AsPC-1	1,25	1,4	1,12
Capan-2	NR	NR	NR
MiaPaCa-2	0,91	1	1,13
Panc-1	0,93	0,98	1,01
hTERT-HPNE	1,03	1	1

Vimentina totale	α	β	γ
AsPC-1	0,92	0,62	0,75
Capan-2	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
MiaPaCa-2	0,54	0,58	0,77
Panc-1	1,21	1,21	1,21
hTERT-HPNE	1,05	1,07	0,72

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

I risultati ottenuti mostrano che i livelli di Vimentina non glicosilata nelle linee cellulari Panc-1 e hTERT-HPNE rimangono invariati in seguito ai trattamenti. Nella MIA PaCa-2 l'espressione della forma non glicosilata viene ridotta dall'isoforma gamma mentre nelle AsPC-1 le isoforme alfa e beta riducono l'espressione della Vimentina non glicosilata, ma aumentano quella della forma glicosilata. Tarbet et al. hanno dimostrato che i siti di glicosilazione della Vimentina S34, S39 e in particolare S49 sono necessari per le normali interazioni omotipiche Vimentina-Vimentina, per l'assemblaggio dei IF maturi e per la migrazione cellulare. I livelli di espressione della Vimentina totale vengono ridotti dalle isoforme beta e gamma in AsPC-1 e Capan-1, mentre nelle hTERT-HPNE solo CXCL12- β induce un calo di espressione. CXCL12- α varia l'espressione della Vimentina solamente nelle cellule MIA PaCa-2. Nelle Capan-1 l'espressione della Vimentina non è stata rilevata.

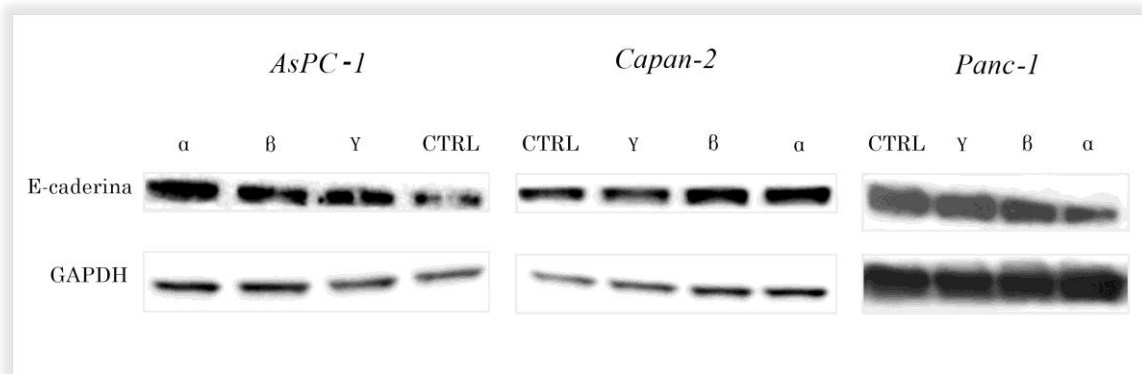
➤ **Caderine: E-caderina e N-caderina**

Le caderine sono molecole (una glicoproteina integrale) che mediano l'adesione cellulare in presenza di Ca^{2+} . Queste glicoproteine sono composte da un dominio extracellulare responsabile delle interazioni cellula-cellula, un dominio idrofobico transmembrana, e un dominio citoplasmatico che prende rapporto con il citoscheletro attraverso l'interazione con un complesso proteico costituito da β -catenina, α -catenina e la catenina p120. L'adesione promossa dalle caderine è un'adesione omotipica o omofila, ovvero fra cellule uguali. Le caderine maggiormente caratterizzate sono la caderina epiteliale (E-caderina) e la caderina neuronale (N-caderina):

La **E-caderina** è una glicoproteina transmembrana che oltre a mediare l'adesione intercellulare tra le cellule epiteliali, agisce come regolatore negativo della cascata di segnale di Wnt, in particolare del suo mediatore centrale, la β -catenina. Viceversa la perdita dell'espressione della caderina E provoca il rilascio di β -catenina nel citoplasma. Le molecole di beta-catenina liberate possono migrare nel nucleo e innescare l'espressione di fattori di trascrizione che inducono EMT. Per questo motivo la E-caderina è uno dei marcatori epiteliale chiave dell'EMT (Chin-Yap Loh et al, 2019)

La **N-caderina** è ampiamente espressa nel sistema nervoso dove media l'adesione intercellulare delle cellule neuronali, ma è tipicamente assente o

espressa bassi livelli nelle normali cellule epiteliali. Tuttavia, negli ultimi anni, i ricercatori hanno osservato che la N-caderina viene espressa in modo aberrante in varie neoplasie epiteliali e tale espressione favorisce la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali attraverso l'induzione di EMT. Di conseguenza a differenza della E-caderina la N-caderina rappresenta un marcatore mesenchimale di EMT.



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina E-caderina in cellule Mia PaCa-2, Panc-1 e AsPC-1 sottoposte al trattamento con CXCL12- α , β , γ .

Capan-2	α	β	γ
Aspc-1	1,57	1,36	1,58
Capan-2	0,71	0,72	0,67
MiaPaCa-2	NR	NR	NR
Panc-1	0,49	0,97	1,18
hTERT-HPNE	NR	NR	NR

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

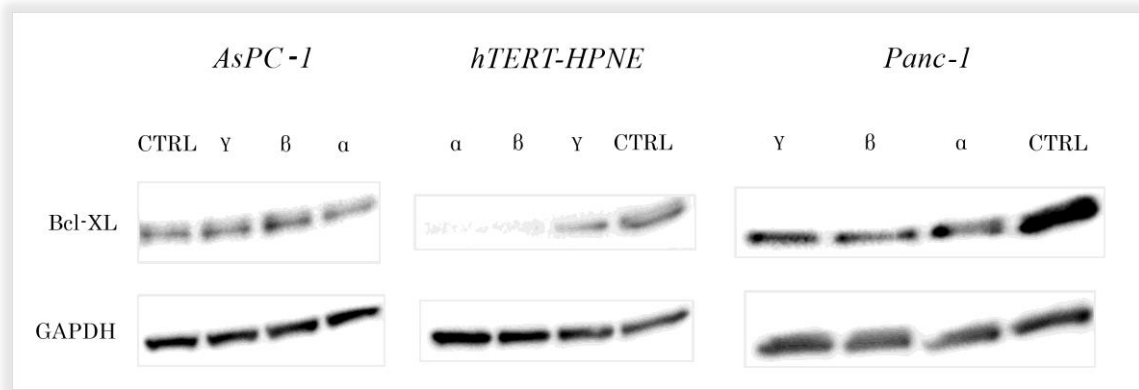
Dai risultati ottenuti si può notare che le isoforme alfa beta e gamma nelle cellule Capan-2 riducono l'espressione della E-caderina, mentre nelle cellule AsPC-1 l'aumentano.

Infine nelle cellule Panc-1 l'espressione della E-caderina è dimezzata rispetto al controllo nel campione trattato con l'isoforma alfa.

In nessuna delle cinque linee cellulari è stata rilevata l'espressione della N-caderina.

4. Bcl-Xl

Bcl-XL è una molecola transmembrana presente nei mitocondri facente parte della famiglia di proteine Bcl-2. Bcl-xl agisce come una proteina anti-apoptotica impedendo il rilascio di contenuti mitocondriali come il citocromo c, che porta all'attivazione della caspasi e, in definitiva, alla morte cellulare programmata. Le cellule tumorali spesso evitano l'apoptosi attraverso un cambiamento nell'espressione dei geni che controllano l'apoptosi, incluso Bcl-xl. In particolare si è osservato che la sovraespressione di Bcl-xl rilevata in molti tipo di cancro, riduce la sensibilità delle cellule tumorali agli agenti chemioterapici (Stevens Megan et al. 2019).



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina Bel-XL in cellule hTERT-HPNE, Panc-1 e AsPC-1 sottoposte al trattamento con CXCL12- α , β , γ .

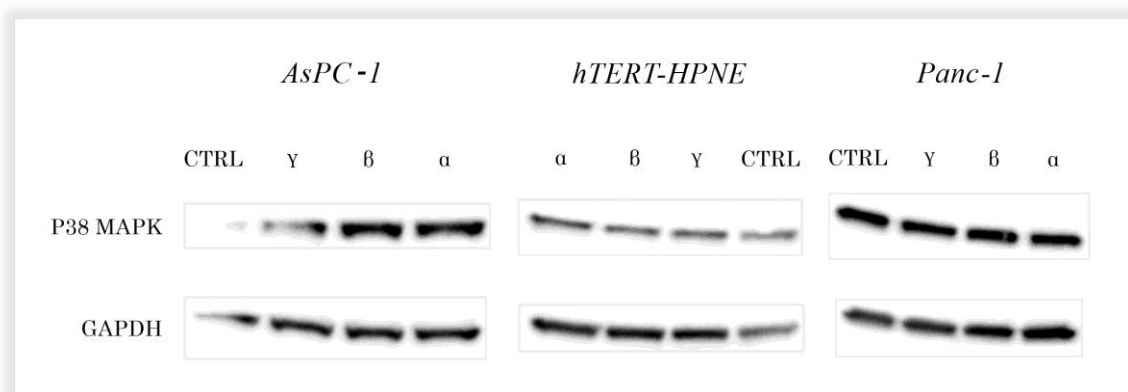
Bcl-XL	α	β	γ
AsPC-1	0,72	1,45	1,14
Panc-1	0,59	0,59	0,59
hTERT-HPNE	0	0	0,38

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

I risultati ottenuti mostrano che nelle cellule Panc-1 e hTERT-HPNE tutte e tre le isoforme di CXCL12 riducono l'espressione della proteina antiapoptotica e in particolare nelle cellule hTERT-HPNE trattate con l'isoforma alfa e in quelle trattate con l'isoforma beta l'espressione viene completamente inibita. L'unico incremento si verifica nelle cellule AsPC-1 trattate con l'isoforma beta mentre nelle cellule AsPC-1 trattate con l'isoforma gamma non si rilevano alterazioni di espressione di Bcl-xl.

5. p38 MAPK/ Pp38 MAPK

Le protein chinasi p38 attivate dal mitogeno (MAPK) mediano un'ampia varietà di comportamenti cellulari in risposta a stimoli extracellulari tra cui stress ossidativo, irradiazione UV, citochine e fattori di crescita. La famiglia MAPK p38 è composta da 4 isoforme: p38-MAPK α , p38-MAPK β , p38-MAPK γ e p38-MAPK δ . L'isoforma p38 α è la più caratterizzata ed è espressa nella maggior parte dei tipi cellulari. Un'attività anormale (superiore o inferiore a quella fisiologica) della P38 è stata implicata in eventi patologici; in particolare l'attivazione costitutiva della proteina K-Ras che si riscontra nel 90% dei tumori pancreatici determina un aumento dell'attività di p38 che si traduce in un'attività deregolata del fattore di trascrizione NF-kB il quale può a sua volta attivare geni che causano la sopravvivenza delle cellule tumorali e che ne facilitano la metastasi ad altri tessuti.



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina P38 MAPK in cellule hTERT-HPNE, Panc-1 e AsPC-1 sottoposte al trattamento con CXCL12- α, β, γ .

P38 MAPK	α	β	γ	Ctrl
AsPC-1	1,08	1,15	0,58	0
Panc-1	0,71	0,84	0,87	1
hTERT-HPNE	0,95	0,74	0,84	1

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

L'analisi dell'espressione proteica relativa a p38MAPK mostra che i trattamenti con le tre differenti isoforme di CXCL12 inducono nelle cellule AsPC-1 l'espressione di p38 MAPK, in quanto, nel campione non trattato, non è stata rilevata la presenza di questa proteina. Nelle cellule Panc-1 e hTERT-HPNE invece, non si osservano particolari variazioni di espressione nei campioni trattati rispetto al controllo, ad eccezione del campione trattato con l'isoforma alfa nelle Panc-1 e di quello trattato con l'isoforma beta in hTERT-HPNE. In questi campioni infatti l'espressione di p38 MAPK viene ridotta in seguito ai trattamenti con CXCL12- α e CXCL12- β .

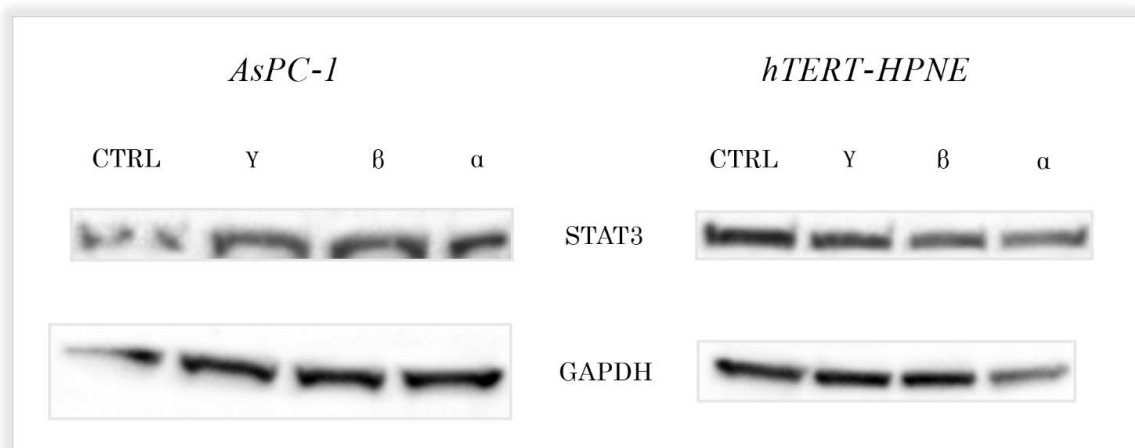
La forma attiva della proteina p38 MAPK (Pp38 MAPK) non è stata rilevata in nessuna delle tre linee cellulari.

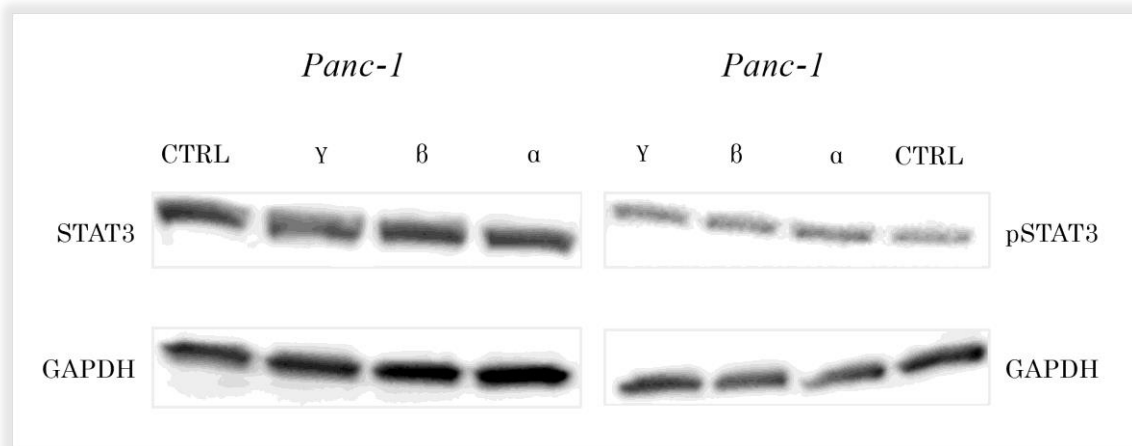
6. STAT3/ pSTAT3, NFkB/pNFkB

- **STAT3/pSTAT3**: Il fattore di trascrizione STAT3 appartiene alla famiglia STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), fondamentale nel mediare il segnale e le funzioni di citochine,

interferoni e fattori di crescita. STAT3 è considerato un oncogene, essendo costitutivamente attivato in molti tumori primari, il cui ruolo è quello di promuovere la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, ridurre le risposte immunitarie antitumorali, promuovere l'angiogenesi tumorale, l'invasione e la formazione di metastasi; induce inoltre la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e sembra avere un ruolo nell'alterare la matrice extracellulare attraverso l'espressione di metalloproteasi della matrice (MMP).

La forma attiva della proteina STAT3 (pSTAT3) è stata rilevata solo nella linea cellulare Panc-1.





Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina STAT3 e pSTAT3 in cellule hTERT-HPNE, Panc-1 e AsPC-1 sottoposte al trattamento con CXCL12- α , β , γ .

STAT3	α	β	γ
AsPC-1	0,85	1,33	1,09
Panc-1	0,73	0,83	0,83
hTERT-HPNE	1,29	0,94	0,74

pSTAT3	α	β	γ
AsPC-1	NR	NR	NR
Panc-1	1,8	1,52	1,52
hTERT-HPNE	NR	NR	NR

STAT3 totale	α	β	γ
AsPC-1	0,85	1,33	1,09
Panc-1	1,05	1,02	1,01
hTERT-HPNE	1,29	0,94	0,74

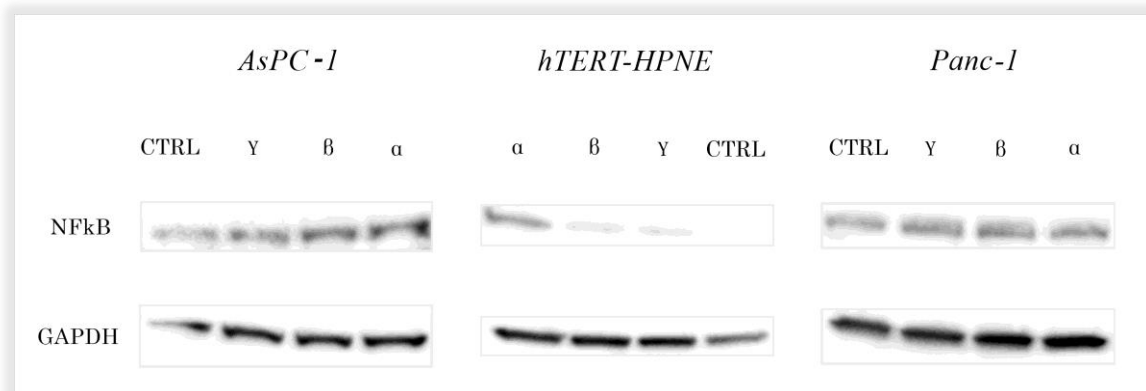
Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

Dall'analisi dell'espressione proteica si osserva che:

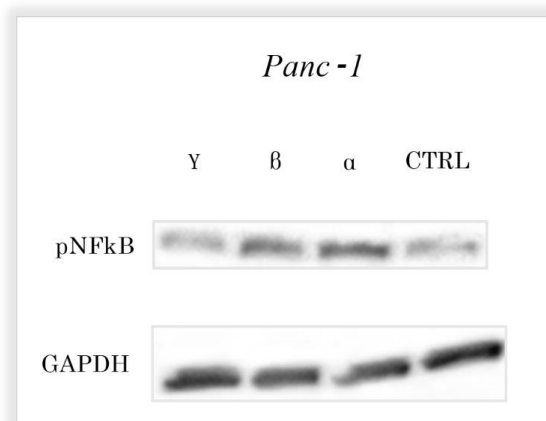
- 1) nella linea cellulare Panc-1 tutte e tre le isoforme determinano un incremento importante di pSTAT3 mentre, il livello di espressione di STAT3 e pSTAT3, rimane pressoché invariato in seguito ai trattamenti. Solo nel campione trattato con l'isoforma alfa infatti, si ha una riduzione dell'espressione di STAT3;
- 2) nella linea cellulare AsPC-1 si ha un incremento di espressione della proteina STAT3 solo nel campione trattato con l'isoforma beta;
- 3) nella linea cellulare hTERT-HPNE si ha una riduzione di espressione nel campione trattato con l'isoforma gamma, mentre un lieve incremento di espressione di STAT3 lo si riscontra nel campione trattato con CXCL12- α .

➤ **NF κ B/pNF κ B:** L'NF- κ B ("nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells") è un complesso proteico funzionante come fattore di trascrizione. NF- κ B si può trovare in tutti i tipi di cellule ed è coinvolto in tutte le reazioni delle cellule agli stimoli, quali stress, citochine, radicali liberi, irradiazione con ultravioletti e attacco proveniente dagli antigeni dei batteri o virus. NF- κ B gioca un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria alle infezioni e sue disfunzioni sono state collegate al cancro, ai processi infiammatori, alle patologie autoimmuni, agli shock settici, alle infezioni virali e alle

malattie del sistema immunitario. L'NFκB è un eterodimero costituito dalle proteine Rel e p50. Quando è in uno stato inattivato, l'NF-κB si trova nel citosol, legato ad una proteina inibitoria IκB. Attraverso l'intermediazione dei recettori integrali della membrana, una varietà di segnali extracellulari possono attivare l'enzima IκB kinase (IKK). L'IKK a sua volta fosforila la proteina IκBα portando alla sua ubiquitinazione e degradazione nel proteasoma. In questo modo NF-κB viene reso disponibile. L'NF-κB attivato è in seguito traslocato nel nucleo dove si lega a specifiche sequenze del DNA (denominate response elements, RE) regolando così la trascrizione di numerosi geni.



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina NFκB e pNFκB in cellule hTERT-HPNE, Panc-1 e AsPC-1 sottoposte al trattamento con CXCL12-α,β,γ.



NFkB	α	β	γ	Ctrl
AsPC-1	2,52	1,41	1,13	1
Panc-1	0,58	0,76	1	1
hTERT-HPNE	<i>espresso</i>	0	0	0

pNFkB	α	β	γ
AsPC-1	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>
Panc-1	2,52	1,9	0,95
hTERT-HPNE	<i>NR</i>	<i>NR</i>	<i>NR</i>

NFkB totale	α	β	γ
AsPC-1	2,52	1,41	1,13
Panc-1	1,5	1,6	1,2
hTERT-HPNE	<i>espresso</i>	0	0

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

Dall'analisi dell'espressione proteica si osserva che:

1) Nelle cellule Panc-1 le isoforme alpha e beta aumentano i livelli di pNFkB e di NFkB totale mentre riducono la forma non fosforilata di NFkB.

L'isoforma gamma non induce invece nessuna variazione;

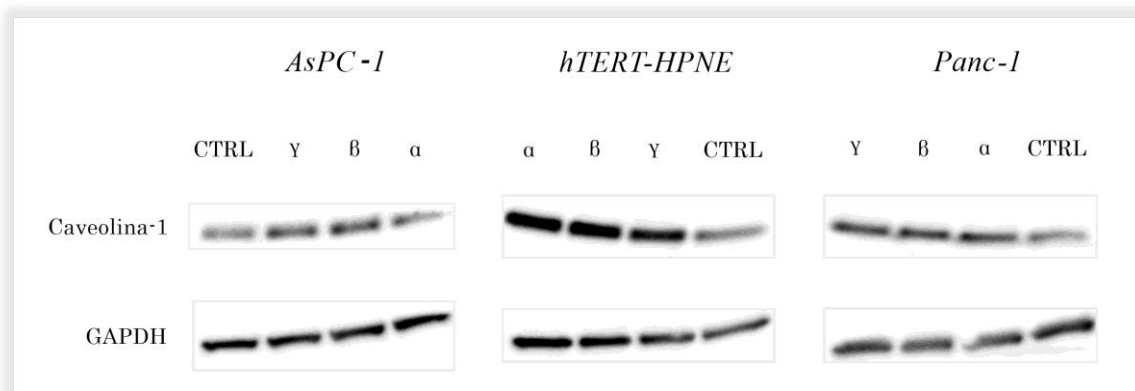
2) nelle cellule AsPC-1 CXCL12- α e CXCL12- β incrementano i livelli di espressione di NFkB;

3) nelle cellule hTERT-HPNE l'isoforma alpha induce l'espressione di NFkB.

7. Caveolina-1

Le caveoline sono proteine di membrana principali costituenti delle caveole, invaginazioni delle membrane plasmatiche presenti in alcune zone delle

membrane biologiche a doppio strato fosfolipidico. Le caveole sono coinvolte nell'endocitosi indipendente da recettori e, a differenza della clatrina, non destinano il materiale alla digestione lisosomiale, ma lo trasportano ad apparati cellulari (Es: Golgi) che lo modificano. La caveolina 1, una delle tre caveoline conosciute (CAV1, 2 e 3), è ubiquitariamente espressa in tutti i tipi di cellule e risulta coinvolta nel traffico lipidico, e nella trasduzione del segnale. È stato scoperto che la CAV1 è sovraespressa in molti tipi di tumori, e può agire come promotore o soppressore tumorale a seconda del tipo e dello stadio del tumore. In particolare nel carcinoma del pancreas, Cav-1 è sovraregolata ed è stata correlata a prognosi sfavorevole ed a una maggiore aggressività del tumore. Chatterjee M. et al Hanno infatti dimostrato che la caveolina 1 è essenziale per la crescita, l'invasione e la proliferazione delle cellule PC sia in vitro che in vivo, ed è in grado di indurre resistenza a radiazioni e chemioterapici quali gemcitabina e fluorouracile (5-FU) (Chatterjee M. et al. 2015).



Valutazione, mediante Western Blot del livello di espressione della proteina Caveolina-1 in cellule hTERT-HPNE, Panc-1 e AsPC-1 sottoposte al trattamento con CXCL12- α, β, γ .

Caveolina-1	α	β	Γ
AsPC-1	0,82	1,55	1,48
Panc-1	2,34	2,36	2,12
hTERT-HPNE	1,4	1,58	1,57

Dati ottenuti dall' analisi densiometrica eseguita mediante il software imageJ.

Dai risultati ottenuti si osserva che ad eccezione delle cellule AsPC-1 trattate con CXCL12- α , tutte le isoforme in tutte e tre le linee cellulari determinano un incremento di espressione della Caveolina-1 rispetto ai non trattati.

4.2 Real-Time PCR

Mediante Real-Time PCR si è andati a valutare se i trattamenti con CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ nelle cellule HTERT-HPNE modificano il livello di trascrizione dei geni codificanti per le seguenti proteine: HSP70, HSP90, e VEGFA.

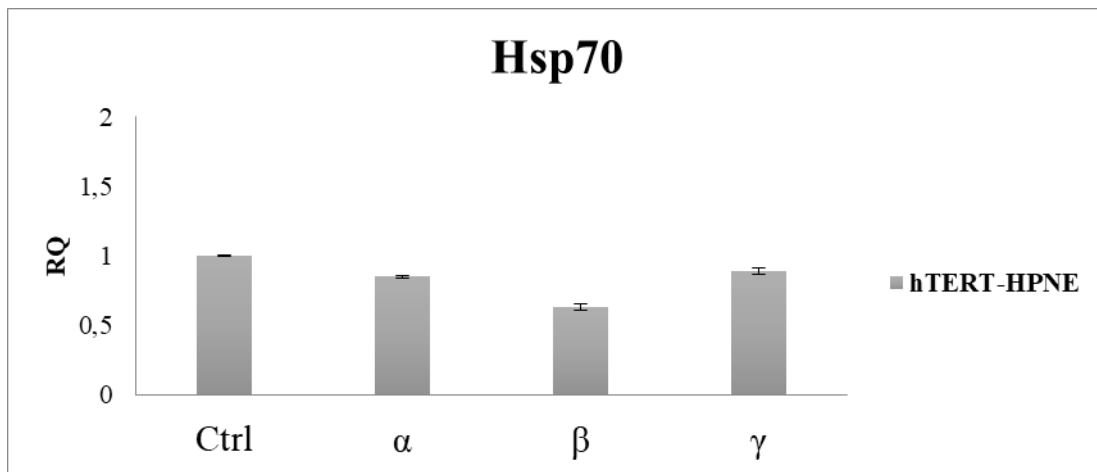
1. Hsp: Hsp70/Hsp90

Oggi è noto che il folding corretto di una proteina, oltre che dalla sua composizione amminoacidica, è determinato dall'aiuto di altre proteine, note come: chaperoni molecolari o proteine da stress o ancora Heat Shock Proteins (HSP). In particolare tra le funzioni fisiologiche esercitate da queste proteine, ci sono: il movimento di proteine all'interno dei compartimenti cellulari; il folding (ripiegamento) di proteine citosoliche, del reticolo endoplasmico, e mitocondriali; il contributo alla degradazione di proteine instabili; la preservazione dalla formazione di complessi e aggregati proteici; e l'azione di re-folding delle proteine parzialmente denaturate o non correttamente ripiegate. Le heat shock proteins sono divise in due grandi gruppi: quelle ad alto peso molecolare (ATP-dipendenti) e basso peso molecolare (ATP-indipendenti) quest'ultime a loro volta sono divise in tre ulteriori famiglie: Hsp70 (Hsp70, Hsc70, Grp78,...), Hsp90 (Hsp90 α , Hsp90 β) e Hsp60. Alcune di queste sono espresse costitutivamente, mentre altre vengono trascritte solo

in condizioni di stress e si collocano all'interno di diversi compartimenti cellulari come citosol, reticolo endoplasmico, mitocondrio. Studi recenti hanno dimostrato che in molti tumori si ha una sovraespressione di Hsp70, Hsp90 e Hsf1 (fattore di trascrizione delle HSP) rispetto alle corrispondenti cellule normali. È stato quindi ipotizzato che le cellule tumorali necessitano di elevati livelli di questi chaperoni per proteggersi dallo stress associato all'aneuploidia, alle proteine mutanti accumulate e dallo stress proteotossico associato a una proliferazione rapida. Di conseguenza visto che le Hsp70 e le Hsp90 sono essenziali per la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali, ma non per le cellule normali rappresentano ad oggi degli importanti bersagli terapeutici. L'elaborazione dei dati ottenuti dalla Real-Time PCR mostra una riduzione della quantità del trascritto Hsp70 e Hsp90 nei campioni trattati con CXCL12- β mentre non si osserva nessuna variazione nei campioni trattati con CXCL12- α e CXCL12- γ .

hTERT-HPNE									
	GAPDH	Mean Ct	Hsp70	Mean Ct	dCT	ddCT	RQ	Mean RQ	SD RQ
Ctrl	17,20	17,19	22,04	22,04	4,85	0,00	1,00	1,00	0,00
Ctrl	17,17		22,04		4,85	0,00	1,00		
Alpha	16,83	16,83	21,90	21,92	5,08	0,22	0,86	0,85	0,01
Alpha	16,82		21,93		5,10	0,25	0,84		
Beta	16,15	16,19	21,66	21,69	5,47	0,62	0,65	0,63	0,02
Beta	16,22		21,73		5,54	0,69	0,62		
Gamma	16,93	16,93	21,92	21,95	4,99	0,14	0,91	0,89	0,03
Gamma	16,93		21,98		5,05	0,19	0,87		

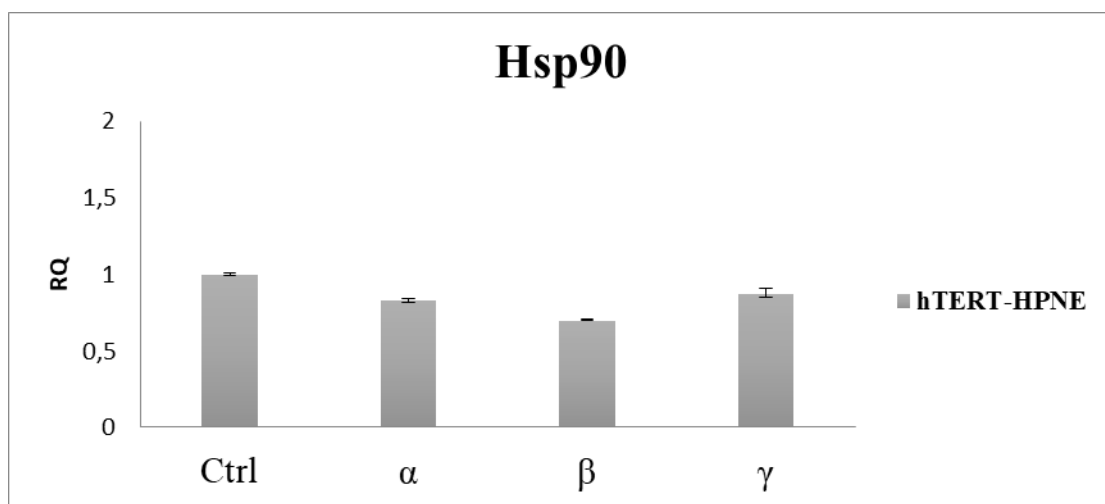
Quantificazione relativa del trascritto Hsp70 con il metodo del $\Delta\Delta CT$.



Rappresentazione grafica relativa ai dati ottenuti mediante Real-Time PCR.

hTERT-HPNE									
	GAPDH	Mean Ct	Hsp90	Mean Ct	dCT	ddCT	RQ	Mean RQ	SD RQ
Ctrl	17,20	17,19	18,98	18,99	1,79	-0,01	1,01	1,00	0,01
Ctrl	17,17		19,00		1,82	0,01	0,99		
Alpha	16,83	16,83	18,92	18,91	2,09	0,28	0,82	0,83	0,01
Alpha	16,82		18,90		2,07	0,26	0,83		
Beta	16,15	16,19	18,51	18,51	2,33	0,52	0,70	0,70	0,00
Beta	16,22		18,50		2,32	0,51	0,70		
Gamma	16,93	16,93	18,90	18,93	1,96	0,16	0,90	0,87	0,03
Gamma	16,93		18,96		2,03	0,23	0,85		

Quantificazione relativa del trascritto Hsp90 con il metodo del $\Delta\Delta CT$.



Rappresentazione grafica relativa ai dati ottenuti mediante Real-Time PCR.

2. VEGF-A

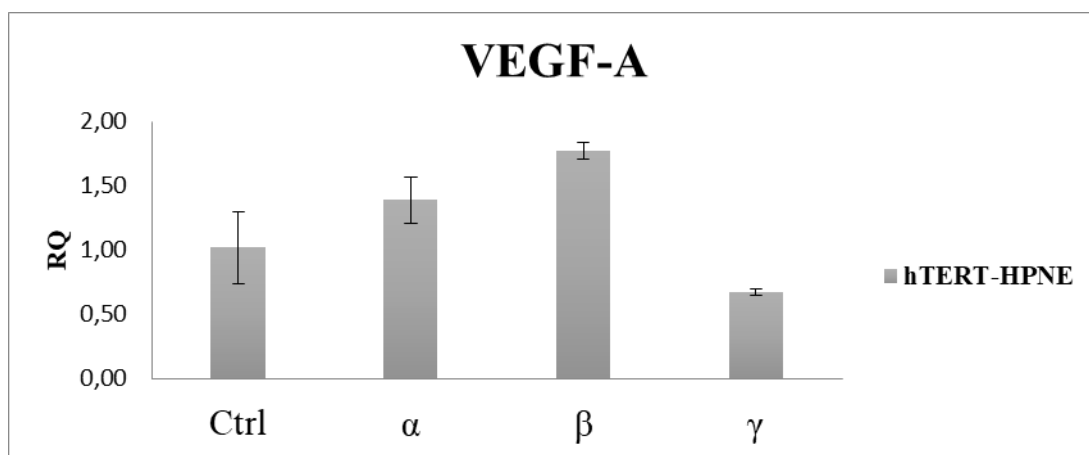
Il fattore di crescita endoteliale vascolare A (VEGF-A) è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene VEGFA. Questo fattore di crescita induce la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali vascolari ed è essenziale per l'angiogenesi sia fisiologica che patologica. Questo gene è

sovraregolato in molti tumori e la sua espressione è correlata con lo stadio e la progressione del tumore.

La reazione di amplificazione ha evidenziato un incremento della quantità del trascritto nei campioni trattati con CXCL12- α e CXCL12- β , mentre si osserva un calo dell'espressione del gene nel campione trattato con CXCL12- γ .

hTERT-HPNE									
	GAPDH	Mean Ct	VEGF-A	Mean Ct	dCT	ddCT	RQ	Mean RQ	SD RQ
Ctrl	14,63	14,60	19,55	19,83	4,96	-0,28	1,22	1,02	0,28
Ctrl	14,56		20,11		5,52	0,28	0,82		
Alpha	15,14	15,25	19,89	20,02	4,64	-0,60	1,51	1,39	0,18
Alpha	15,35		20,15		4,90	-0,34	1,26		
Beta	15,94	15,90	20,27	20,31	4,37	-0,86	1,82	1,77	0,07
Beta	15,86		20,35		4,45	-0,78	1,72		
Gamma	14,98	14,92	20,76	20,73	5,84	0,60	0,66	0,67	0,02
Gamma	14,86		20,70		5,78	0,54	0,69		

Quantificazione relativa del trascritto VEGF-A con il metodo del $\Delta\Delta CT$.



Rappresentazione grafica relativa ai dati ottenuti mediante Real-Time PCR.

4.3 Wound Healing Assay

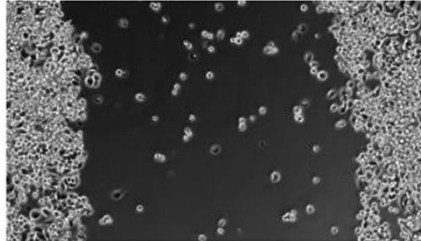
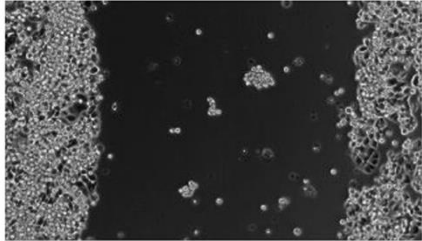
Il saggio di migrazione cellulare (Wound healing assay) è stato eseguito per valutare se la capacità di migrazione delle cellule AsPc-1, hTERT-HPNE e Panc-1, viene modificata in seguito a trattamenti con CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ . La chiusura del solco, è stata monitorata per due giorni attraverso la cattura delle immagini al microscopio ottico subito dopo aver eseguito il taglio (T_0) e ad intervalli di tempo regolari di ogni 6 ore.

I risultati hanno dimostrato che l'effetto dei trattamenti dipende dalla linea cellulare e dal tipo di isoforma impiegata nel saggio. Nella linea cellulare hTERT-HPNE le tre isoforme sembrerebbero compromettere in maniera significativa la capacità di migrazione delle cellule a seguito del danno indotto: in particolare CXCL12- α riduce di quasi il 70% rispetto al controllo la chiusura del danno. Nella linea cellulare Panc-1 l'isoforma alpha, al contrario di quanto osservato nella linea hTERT-HPNE, stimola la capacità di migrazione delle cellule che risulta essere raddoppiata rispetto al controllo. Opposto l'effetto esercitato dalle isoforme beta e gamma sulle cellule Panc-1 che, a seguito del trattamento, vedono ridotta della metà la loro capacità di ricomporre il danno indotto. Nella linea cellulare ASPC, il trattamento con le tre isoforme di CXCL12 aumenta la capacità di migrazione cellulare di circa il 50% rispetto al controllo. Le foto a seguire mostrano la chiusura del taglio a distanza di 6 ore (T_1) dall'inizio del saggio (T_0). La percentuale di chiusura del solco è stata calcolata mediante il software imageJ.

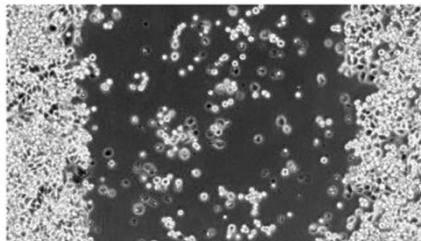
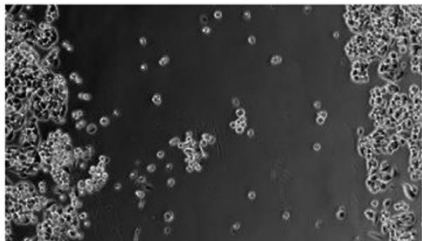
T₀

T₁

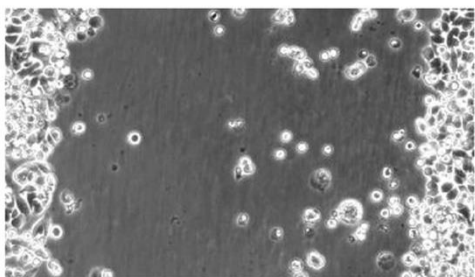
AsPc-1 Ctrl



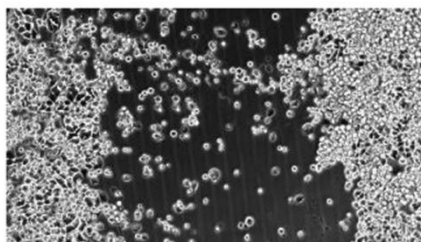
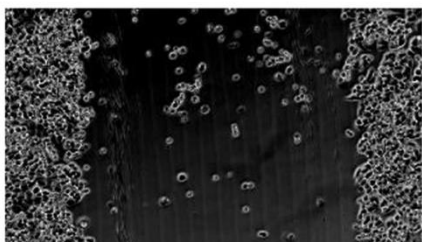
AsPc-1 α



AsPc-1 β



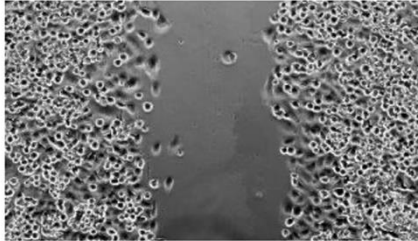
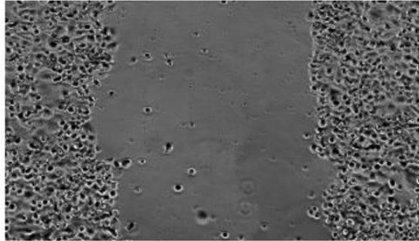
AsPc-1 γ



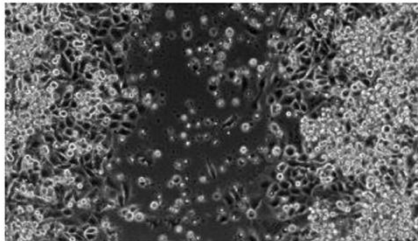
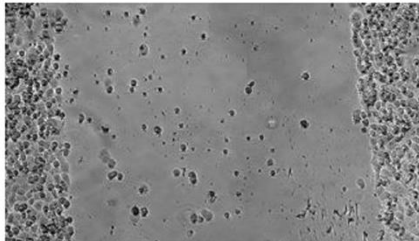
T₀

T₁

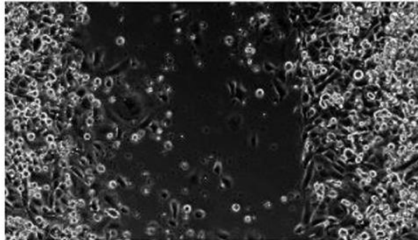
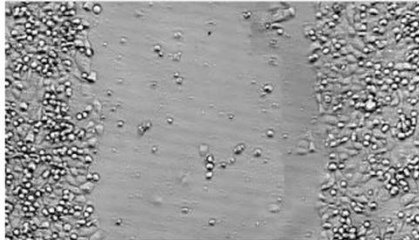
Panc-1 Ctrl



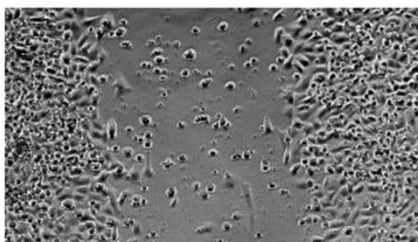
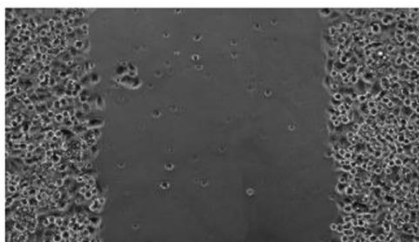
Panc-1 α



Panc-1 β



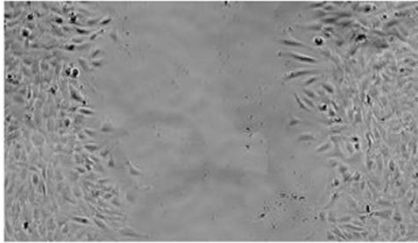
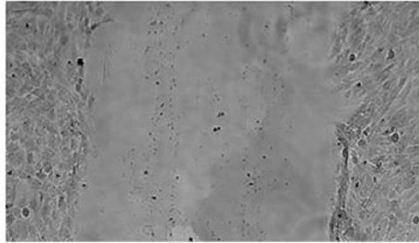
Panc-1 γ



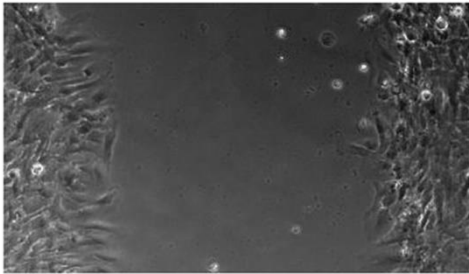
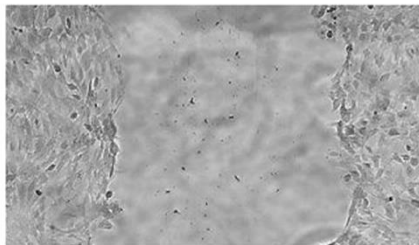
T₀

T₁

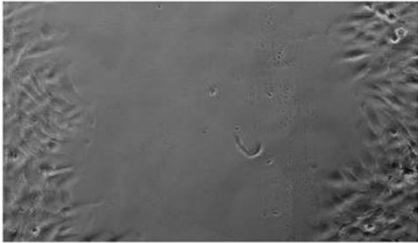
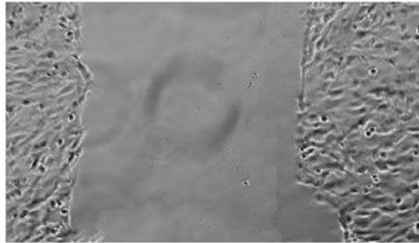
hTERT-HPNE Ctrl



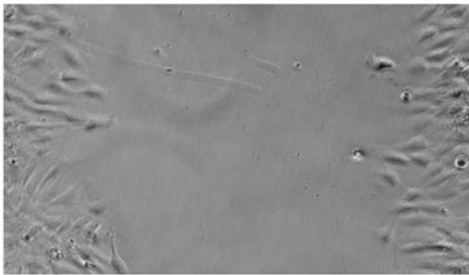
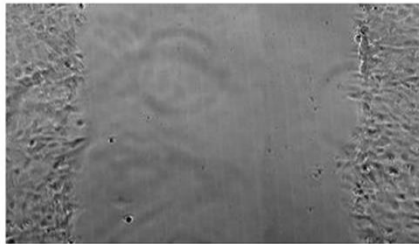
hTERT-HPNE α

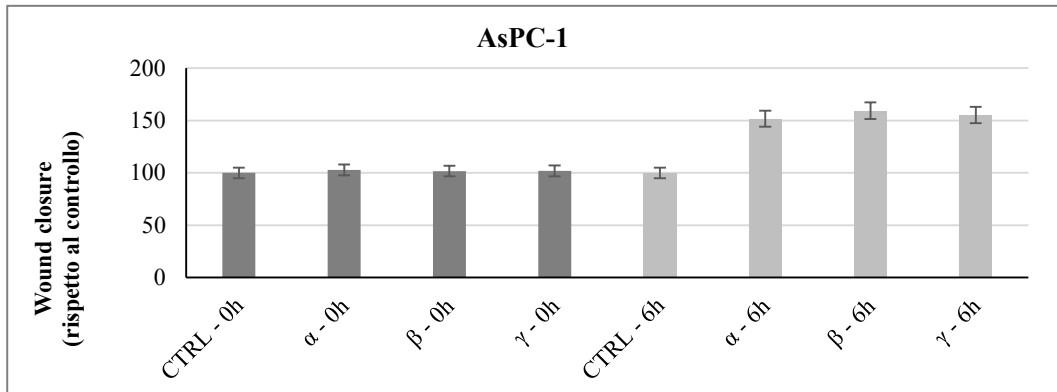


hTERT-HPNE β

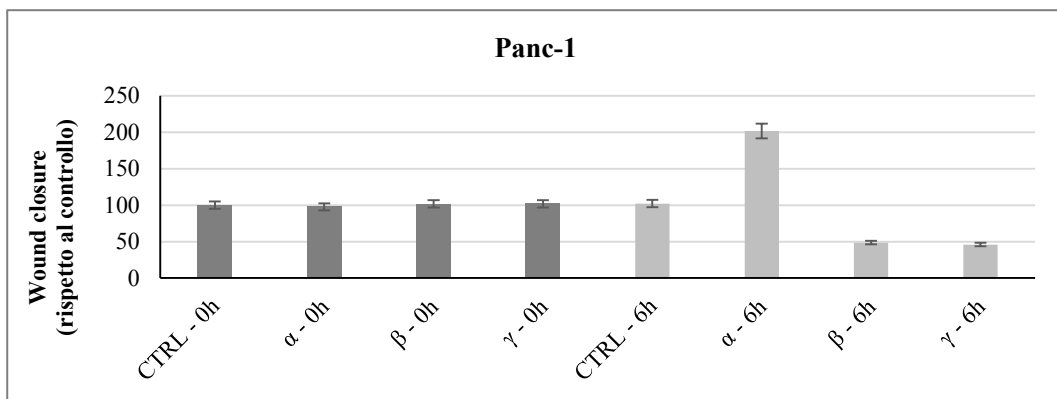


hTERT-HPNE γ

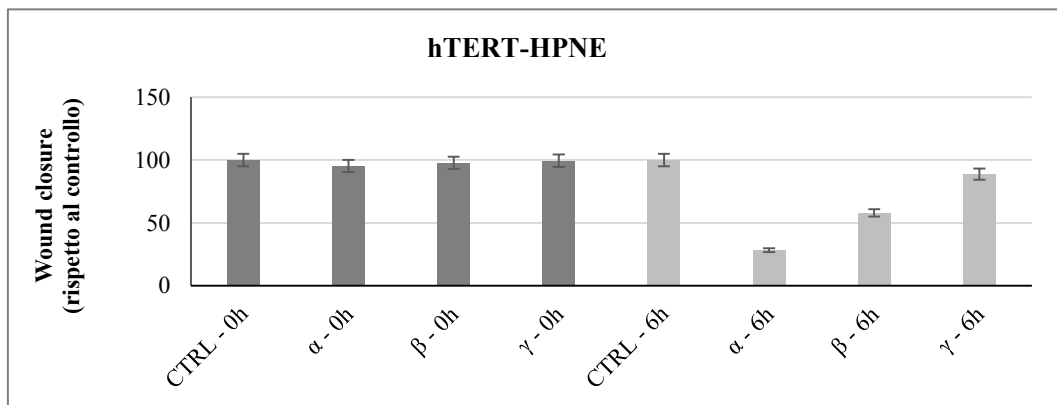




Rappresentazione grafica della % di chiusura del solco delle cellule AsPC-1 trattate con CXCL12- α , β e γ e delle cellule AsPC-1 non trattate a 6h dall'inizio del saggio.



Rappresentazione grafica della % di chiusura del solco delle cellule Panc-1 trattate con CXCL12- α , β e γ e delle cellule Panc-1 non trattate a 6h dall'inizio del saggio.



Rappresentazione grafica della % di chiusura del solco delle cellule hTERT-HPNE trattate con CXCL12- α , β e γ e delle cellule hTERT-HPNE non trattate a 6h dall'inizio del saggio.

5. DISCUSSIONE

L'adenocarcinoma pancreatico duttale è caratterizzato da un microambiente altamente desmoplastico ed eterogeneo, in quanto la popolazione cellulare che lo caratterizza è alquanto variegata. La comunicazione tra le varie tipologie cellulari che costituiscono il microambiente tumorale è essenziale nel promuovere la progressione del PDAC e si realizza attraverso il rilascio di molteplici componenti quali: fattori di crescita, citochine e chemochine. In particolare, negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse nei confronti della chemochina CXCL12, in quanto si ritiene che sia una componente chiave della comunicazione nel microambiente tumorale. Nonostante siano stati condotti numerosi studi, ad oggi non è chiaro se CXCL12 abbia un ruolo pro o anti tumorale in PDAC. Le ipotesi contrastanti sulla funzione di questa chemochina, sarebbero in parte giustificate dalla presenza di sette differenti isoforme (α , β , γ , δ , θ , ε e iso-7) le quali potrebbero esercitare azioni differenti nel microambiente tumorale. L'obiettivo di questo studio è quindi quello di caratterizzare dal punto di vista funzionale tutte e sette le isoforme di CXCL12 cercando di comprendere il ruolo specifico di ciascuna variante nel PDAC.

In questo lavoro è stato valutato il ruolo di CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ in quattro differenti linee di adenocarcinoma pancreatico duttale:

Panc-1, AsPC-1, MIA PaCa-2, Capan-2 e nella linea cellulare pre-tumorale hTERT-HPNE.

Dall'analisi dell'espressione proteica eseguita mediante Western Blot si osserva che:

1) Nelle cellule AsPC-1 e MIA PaCa-2 le tre isoforme di CXCL12 sembrano contrastare la transizione epitelio mesenchimale (EMT), in quanto nelle AsPC-1 determinano un incremento di espressione della E-caderina, tipico marker epiteliale e una riduzione dell'espressione della Vimentina, tipico marker mesenchimale; così come, nelle MIA PaCa-2, CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ riducono l'espressione della Vimentina.

Un effetto opposto lo si osserva, invece, nelle cellule Capan-2 e nelle cellule Panc-1; mentre le isoforme beta e gamma non variano in modo significativo l'espressione del marker epiteliale E-caderina, l'isoforma alpha ne riduce l'espressione della metà.

2) Le isoforme CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ incrementano in modo significativo l'espressione di CD44 nelle cellule MIA PaCa-2, Panc-1 e hTERT-HPNE, mentre nelle cellule AsPC-1 riducono l'espressione di CD24. CD44 e CD24 che sono i marcatori delle cellule staminali tumorali. Di conseguenza si può dedurre che CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ

aumentano il potere aggressivo nelle linee cellulari Panc-1, MIA PaCa-2 e hTERT-HPNE, mentre lo riducono nelle AsPC-1.

3) CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ promuovono l'immuno-evasione delle cellule MIA PaCa-2 e hTERT-HPNE, inducendo una iper-espressione di PD-L1, mentre questo effetto non è stato riscontrato nelle cellule AsPC-1, Panc-1 e Capan-2.

4) Tutte e tre le isoforme aumentano in modo significativo l'espressione della Caveolina-1, la quale a volte diminuisce ma a volte aumenta l'aggressività tumorale, probabilmente a seconda del tipo e dello stadio del tumore.

5) CXCL12- α , CXCL12- β e in maniera minore CXCL12- γ aumentano l'espressione dei fattori di trascrizione NF- κ B nelle cellule Panc-1 e AsPC-1 e di pSTAT3 nelle Panc-1. Questi fattori promuovono la sopravvivenza, la proliferazione e l'invasione cellulare aumentando, quindi, il potere aggressivo delle cellule.

6) Nelle Panc-1, in contrasto con l'aumento di pSTAT3, le isoforme CXCL12- α , CXCL12- β e CXCL12- γ riducono l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-xl.

Dai dati di Real-Time PCR ottenuti sulle cellule hTERT-HPNE si nota che:

1) CXCL12- β riduce i livelli di mRNA codificanti per le proteine Hsp70 e Hsp90, proteine essenziali per la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali ma non per le cellule normali.

2) CXCL12- α e CXCL12- β incrementano l'espressione di VEGFA mentre CXCL12- γ la riduce, per cui le isoforme alpha e beta, a differenza della forma gamma, favoriscono il processo di angiogenesi.

Infine, dal saggio del Wound Healing eseguito sulle cellule AsPC-1, Panc-1 e hTERT-HPNE è emerso che l'effetto dei trattamenti dipende dalla linea cellulare e dal tipo di isoforma impiegata nel saggio in quanto:

1) Tutte e tre le isoforme aumentano la capacità di migrazione delle cellule AsPC-1.

2) CXCL12- α aumenta la capacità di migrazione delle cellule Panc-1 mentre le isoforme beta e gamma la riducono della metà.

3) Nella linea cellulare hTERT le tre isoforme sembrerebbero compromettere in maniera significativa la capacità di migrazione.

In conclusione, il nostro studio, seppur preliminare, suggerisce un chiaro coinvolgimento delle isoforme alpha, beta e gamma di CXCL12 nella modulazione fenotipica dei modelli cellulari scelti modificandone sia la capacità di migrazione che il loro profilo di espressione.

6. BIBLOGRAFIA

Polireddy K, Chen Q. Cancer of the Pancreas: Molecular Pathways and Current Advancement in Treatment. *J Cancer*. 2016 Jul 7;7(11):1497-514.

Bittoni A , Andrikou K , Lanese A , Santoni M , Pellei C , Faloppi L , Del Prete M , Giampieri R , Cascinu S. Trattamento del carcinoma del pancreas. Attualità e prospettive. *Recenti Prog Med* 2015; 106: 208-216.

Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. 2019;10(1):10–27.

Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC, Der CJ. KRAS. Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(2):91–100.

Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, and DePinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 2006 May 15;20(10):1218-49.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33.

Sun Q, Zhang B, Hu Q, Qin Y, Xu W, Liu W, Yu X, Xu J. The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics*. 2018 Oct 6;8(18):5072-5087.

Wu YS, Chung I, Wong WF, Masamune A, Sim MS, Looi CY. Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2017 Feb; vol.1861,296-306.

Bulle A, Dekervel J, van der Merwe S, Van Cutsem E, Verslype C, van Pelt J. Relevance of the stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma and its challenges for translational research. *J Cancer Treatment Diagn.* (2017); 2(1): 1-15.

Zhang A, Qian Y, Ye Z, Chen H, Xie H, Zhou L, Shen Y, Zheng S. Cancer-associated fibroblasts promote M2 polarization of macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Med.* 2017 Feb;6(2):463-470.

Ireland L, Santos A, Ahmed MS, Rainer C, Nielsen SR, Quaranta V, Weyer-Czernilofsky U, Engle DD, Perez-Mancera PA, Coupland SE, Taktak A, Bogenrieder T, Tuveson DA, Campbell F, Schmid MC, Mielgo A. Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors. *Cancer Res.* 2016 Dec 1;76(23):6851-6863.

Long KB, Tooker G, Tooker E, Luque SL, Lee JW, Pan X, Beatty GL. IL6 Receptor Blockade Enhances Chemotherapy Efficacy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2017 Sep;16(9):1898-1908.

Righetti A, Giulietti M, Šabanović B, Occhipinti G, Principato G, Piva F. CXCL12 and Its Isoforms: Different Roles in Pancreatic Cancer? *J Oncol.* 2019 Jun 2;2019:9681698.

Mirosław Janowski. Functional diversity of SDF-1 splicing variants, *Cell Adhesion & Migration*, 2009 Jul 3:3, 243-249.

Janssens R, Struyf S, Proost P. Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2018 Dec; vol.44, 51-86.

Wu Y, Yoder A. Chemokine Coreceptor Signaling in HIV-1 Infection and Pathogenesis. *PLoS Pathog*, 2009 Dec; 5(12): e1000520.

Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Jun 1;16(11):2927-31.

Tulotta C, Snaar-Jagalska BE. CXCR4 signalling, metastasis and immunotherapy: zebrafish xenograft model as translational tool for anti-cancer discovery. *J Cancer Metastasis Treat* 2019;5:74.

Demir IE, Kujundzic K, Pfitzinger PL, Saricaoglu ÖC, Teller S, Kehl T, Reyes CM, Ertl LS, Miao Z, Schall TJ, Tieftrunk E, Haller B, Diakopoulos KN, Kurkowski MU, Lesina M, Krüger A, Algül H, Friess H, Ceyhan GO. Early pancreatic cancer lesions suppress pain through CXCL12-mediated chemoattraction of Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jan 3;114(1):E85-E94.

Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, et al. Activated Schwann cells in pancreatic cancer are linked to analgesia via suppression of spinal astroglia and microglia. *Gut* 2016;65:1001-1014.

Peng-fei W, Zi-peng L, Bao-bao C, Lei T, Chen Z, Kui-rong J, Yi M. Role of CXCL12/CXCR4 signaling axis in pancreatic cancer. *Chin Med J* 2013 Sep;126 (17): 3371-3374.

Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Sep;68(18):3033-46.

Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, Chong PP, Looi CY. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*. 2019 Sep 20;8(10):1118.

Chatterjee, M., Ben-Josef, E., Thomas, D. et al. Caveolin-1 is Associated with Tumor Progression and Confers a Multi-Modality Resistance Phenotype in Pancreatic Cancer. *Sci Rep* 5, 10867 (2015).

Megan S, Sebastian O. Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing. *Frontiers in Genetics*, 2019 Sep; vol 10,804.

Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, Zeilstra J, Pals ST, Mehmet M, Stassi G and Medema JP. The AC133 Epitope, but not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation. *Cancer Res* January 15 2010 (70) (2) 719-729.

Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*. 2008 Sep;86(9):1025-32.

Tarbet HJ, Dolat L, Smith TJ, Condon BM, O'Brien ET 3rd, Valdivia RH, Boyce M. Site-specific glycosylation regulates the form and function of the intermediate filament cytoskeleton. *Elife*. 2018 Mar 7;7:e31807.

Polettea M, Mestdagtb M, Bindelsb S, Nawrocki-Rabya B, Hunzikerc W, Foidartb JM, Birembaut P, Gilles C. β -Catenin and ZO-1: Shuttle Molecules Involved in Tumor Invasion-Associated Epithelial-Mesenchymal Transition Processes. *Cells Tissues Organs* 2007, vol. 185, 61-65.

Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 2008 Mar; Vol 1778, 660-669.

7. RINGRAZIAMENTI

Inutile dire che tutto questo lavoro non è solo frutto della mia fatica e del mio sudore. Senza il sostegno e l'aiuto di tante persone non sarebbe stato così completo. Per tanto vorrei innanzitutto ringraziare i miei genitori per avermi sostenuto, incoraggiato e avermi fatto sentire fiera di loro. Grazie Mamma per i mille sacrifici, spero che un giorno non troppo lontano riuscirò a dirti che né valsa la pena!. Ringrazio il mio fidanzato che è sempre stato il mio punto di riferimento e la mia forza. Grazie perché qualsiasi cosa mi succedeva durante la giornata, sapevo che ti avrei trovato lì, sempre pronto ad ascoltarmi rassicurarmi e proteggermi. Grazie per essere il compagno che sei, non avrei potuto desiderare persona migliore al mio fianco.

Ci tenevo inoltre a ringraziare il Dott. Francesco Piva per avermi dato la possibilità di lavorare a questo bellissimo progetto e tutto il team del laboratorio di Biologia Applicata. In particolare vorrei ringraziare la dottoressa Monia Cecati. Grazie non solo per avermi trasmesso le tue conoscenze e avermi fatto capire cosa vuol dire lavorare con passione e determinazione, ma anche perché con la tua semplicità e allegria, sei riuscita a rendere l'ambiente di lavoro solare e sereno.

Infine non posso non ringraziare l'amica di sempre Cristina ,quello che c'è tra me e lei è la conferma che l'amicizia, quella vera, esiste. Grazie per aver contribuito ad essere la persona che sono ora.