

Abstract

Il cancro al pancreas (CP) è uno dei tumori più aggressivi al mondo ed è correlato a prognosi sfavorevole e mortalità elevata soprattutto a causa della diagnosi tardiva, tuttavia anche se diagnosticato precocemente. I pazienti con CP resecabili hanno un esito sfavorevole a causa di diversi fattori come la chemioresistenza dovuta sia alle cellule tumorali che al microambiente tumorale (TME). Recenti studi si sono concentrati sul TME che svolge un ruolo critico nella progressione del CP, evidenziando una forte correlazione tra il microambiente e lo sviluppo di metastasi. Inoltre diversi fattori extracellulari sono coinvolti nel suo sviluppo e metastasi. Nel CP, la proteina Annessina A1 (ANXA1) appare sovraespressa e può essere identificata come fattore oncogenico, anche come componente delle vescicole extracellulari tumorali (EV). In effetti, queste microvescicole sono note per sostenere il TME. I nostri dati pubblicati hanno evidenziato che le attività autocrine/paracrine di ANXA1 extracellulare dipendono anche dalla sua presenza negli EV. L'obiettivo del primo e del secondo anno del mio progetto di dottorato è stato quello di studiare l'effetto paracrino di ANXA1 sui componenti cellulari del TME, principalmente cellule stromali come i fibroblasti e cellule endoteliali per dimostrare come il complesso ANXA1-EVs può stimolare la progressione tumorale. Gli EV isolati da cellule MIA PaCa-2 *Wild Type* (WT) e *ANXA1-Knock-Out* (KO), queste ultime ottenute grazie al sistema di editing del genoma CRISPR/Cas9, sono stati purificati dal mezzo condizionato cellulare mediante centrifugazione differenziale e poi somministrati su cellule stromali.

Inoltre l'ANXA1, come fattore oncogenico, deve essere inibita, principalmente bloccando la sua forma extracellulare, e questo può considerarsi come nuovo modello di terapia adiuvante del cancro. L'eparina solfato (HS) è un glicosaminoglicano della matrice extracellulare noto per legare fattori di crescita e citochine, generando una sorta di riserva nell'ambiente extracellulare. Una di queste molecole è rappresentata da ANXA1 e studi precedenti hanno dimostrato che ANXA1 si lega in particolare ai glicani solfati, principalmente HS ed eparina. A tal proposito, il secondo obiettivo annuale è stato quello di studiare l'interazione tra HS e ANXA1 e come questo glicosaminoglicano potrebbe influenzare l'azione oncogenica di ANXA1. Così, sarebbe possibile confermare la rilevanza di ANXA1 nella progressione del CP come attore del cross-talk tra le cellule tumorali e il microambiente.

Al fine di ampliare le conoscenze sul ruolo di ANXA1 sullo stroma del CP, l'obiettivo del mio terzo anno è stato quello di dimostrare che il complesso ANXA1/EV modula la polarizzazione dei macrofagi contribuendo ulteriormente alla progressione del cancro. Gli EV WT e ANXA1 KO sono stati somministrati ai macrofagi, ottenuti da monociti THP-1, e si è visto che ANXA1 è cruciale per l'acquisizione di un fenotipo M2 pro-tumorale. I macrofagi M2, a loro volta, sono in grado di attivare le cellule endoteliali e i fibroblasti per indurre rispettivamente l'angiogenesi e la degradazione della matrice. Una volta mostrato *in vitro* il ruolo di ANXA1 nell'intensificazione del cross-talk delle cellule CP-stroma, abbiamo anche riscontrato una presenza significativamente aumentata dei macrofagi M2 nelle sezioni tissutali di tumore e metastasi epatiche

precedentemente ottenute da xenotrapianti ortotopici di cellule MIA PaCa-2 WT e ANXA1 KO in topo. Infine durante il terzo anno del Dottorato, ho avuto l'opportunità di lavorare presso "Institut national de la santé et de la recherche médicale" (INSERM), Marsiglia (FR), dove ho approfondito il ruolo di ANXA1 nel TME utilizzando modelli 3D tumorali, sia in monocultura che in co-cultura con fibroblasti associati al cancro (CAF) e monociti.

Presi insieme, i nostri dati suggeriscono in modo interessante l'importanza di ANXA1 come potenziale marcatore diagnostico/prognostico e/o terapeutico del CP. In questo modo, sarebbe possibile confermare la rilevanza di ANXA1 nella progressione del CP, come attore nel cross-talk tra le cellule tumorali e il microambiente.