



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze Mediche e
Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto

Sede
Via del Pozzo, 71 - 41124 - Modena, Italia

www.unimore.it
www.smechimal.unimore.it

Versione N.1
Data 23.05.2023

LETTERA DI INTENTI

Comitato Etico Area Vasta Emilia Nord
Segreteria Centrale di Modena

Spett.le
Rappresentante Legale Locale

OGGETTO: SI CHIEDE PARERE AD ESEGUIRE IL SEGUENTE STUDIO PRE-CLINICO: *Studio di Periostina e delle sue varianti nel microambiente tumorale del tumore del pancreas*

Codice Protocollo: N/A

Sponsor/Promotore:

Prof. Massimo Dominici, Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno Infantili e dell'Adulto, Laboratorio di Terapie Cellulari.

Mail: **massimo.dominici@unimore.it**

Tel: **059-4222858/2239**

Responsabile della Sperimentazione Locale:

Dott. Andrea Spallanzani, Azienda Ospedaliero Universitaria di Modena – Policlinico di Modena, Struttura Complessa di Oncologia.

Mail: **spallanzani.andrea@aou.mo.it**

Tel: **059-4223310**

Breve descrizione del disegno dello Studio e obiettivo principale:

Introduzione:

Secondo i dati più recenti l'adenocarcinoma duttale pancreatico (ADP) si conferma tra le neoplasie più letali ed aggressive essendo caratterizzato da una esigua percentuale di sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi, pari solo all'20% dei pazienti, e dalla scarsità di opzioni terapeutiche (1). Negli ultimi dieci anni i progressi negli approcci diagnostici, nelle tecniche di radioterapia e nelle terapie per il trattamento della malattia avanzata hanno permesso un seppur modesto miglioramento nella prognosi dei pazienti (1). Uno dei principali fattori che rende questa neoplasia così difficile da trattare è la presenza di un microambiente tumorale molto complesso e caratterizzato da una densa matrice extracellulare (ECM) ricca in componente proteica e fibrosa, che rende difficile la distribuzione dei farmaci nella massa tumorale e favorisce la formazione di zone ipossiche e ipo-vascolarizzate. Recentemente, proprio nell'ambito dello studio del microambiente dell'ADP, è emerso il ruolo cruciale svolto dalla proteina matricellulare nota con il nome di PERIOSTINA (POSTN). L'aberrante espressione di POSTN sembra infatti essere implicata in vari processi tumorali, tra cui la progressione tumorale, la metastatizzazione e la farmacoresistenza (2).

POSTN è una proteina che appartiene ad una classe di proteine non strutturali che vengono secrete nell'ambiente extracellulare, mediando svariate funzioni. Essa è codificata dal gene presente sul braccio lungo del cromosoma 13 e strutturalmente è formata da: un dominio N-terminale di 22 amminoacidi, che corrisponde al dominio di secrezione della proteina, seguito da un dominio di 75 amminoacidi ricco di cisteine, conosciuto come EMI domain che partecipa all'interazione proteina-proteina; di seguito troviamo 4 domini FAS1 (fasciclin like, infatti appartiene alla famiglia delle fascicline) conservati e ripetuti in tandem che interagiscono con le integrine ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha6\beta4$); e infine un dominio C-terminale idrofilico che lega altre proteine della ECM come il collagene, fibronectina o eparina (3). Nel dominio C-terminale si formano le varianti di splicing e gli ultimi studi hanno dimostrato una stretta correlazione tra le singole varianti di POSTN e diverse patologie tra cui diversi tipi di tumore, ischemia cerebrale, asma, IPF e ischemia retinica (4, 5). L'espressione del gene della POSTN è regolata da moltissimi fattori di trascrizione, da fattori di crescita, citochine e le varianti di questa proteina hanno alto potenziale di secrezione per cui possono legarsi a specifici recettori delle integrine, attivando pathway di sopravvivenza cellulare come quelle di AKT e la PI3K, promuovendo migrazione cellulare e la proliferazione (2,3,5,6). Un'aberrante espressione di questa proteina e delle sue isoforme è stata osservata in alcuni tumori solidi ed è stato dimostrato che l'aumentata espressione di POSTN e delle sue varianti può influenzare la dimensione il numero di lesioni metastatiche, suggerendo per POSTN un ruolo fondamentale nella formazione e nel rimodellamento del microambiente del tessuto tumorale (5,6). Oltre a stimolare in modo diretto la proliferazione delle cellule tumorali e a svolgere un effetto anti-apoptotico, POSTN è implicata nel contesto di numerosi

altri processi neoplastici, quali fenomeni di angiogenesi, migrazione, endotelial to mesenchymal transition (EMT) e resistenza a farmaci, che sono fondamentali per la progressione della neoplasia (7,8,9). Per alcuni tumori è stata riportata una chiara correlazione tra elevati livelli di espressione di POSTN e delle sue varianti con la progressione della malattia stessa (6). Fino ad oggi sono state identificate 11 diverse isoforme di splicing differenzialmente espresse in diversi istotipi tumorali (4, 5, 6). Nel carcinoma a cellule squamose della testa e del collo è stata riportata una over-espressione dell'isoforma 5 (variante di splicing che manca dell'esone 17) e questo la rende un possibile marker tumorale ed un possibile target per una terapia futura (10). L'isoforma 1 è prevalentemente espressa nell'osteosarcoma, mentre l'isoforma 3 nel carcinoma ovarico (6). Anche nel carcinoma a cellule renali è stata osservata una stretta correlazione tra l'isoforma 8 della POSTN e il tessuto tumorale in cui è espressa (11).

Nel tumore al pancreas è stato osservato che la produzione di POSTN è principalmente a carico delle cellule stellate (PSC) che creano un microambiente tumorale ricco in collagene e fibronectina capace di favorire la diffusione delle cellule tumorali e la progressione del tumore stesso (12,13). Più recentemente l'over-espressione di POSTN nell'ADP è anche stata messa in relazione a meccanismi di farmacoresistenza al trattamento con Gemcitabina, farmaco di prima linea nel trattamento del ADP (14). Queste evidenze rendono POSTN e le sue varianti di splicing un potenziale target molecolare per futuri approcci terapeutici per il trattamento dell'ADP. Per questo motivo questo progetto si propone di esaminare la presenza di POSTN e delle sue diverse varianti di splicing nel microambiente del tumore del pancreas di pazienti affetti da questa neoplasia. Inoltre, l'inclusione nello studio di campioni provenienti sia da pazienti che non avevano ricevuto alcun trattamento chemioterapico prima dell'intervento chirurgico, sia di pazienti che avevano ricevuto un trattamento neoadiuvante, consentirà di verificare l'eventuale impatto trattamento chemioterapico sull'espressione di POSTN, delle sue varianti e delle molecole associate alla sua via di segnalazione, consentendo di correlare i risultati ottenuti con le caratteristiche cliniche dei pazienti.

Obiettivi dello studio:

Il presente progetto si propone quindi due obiettivi (OB):

OB1) Studiare dal punto di vista istologico l'espressione dell'antigene POSTN e delle molecole associate alla sua via di segnalazione nel microambiente tumorale di campioni di ADP

OB2) Valutare dal punto di vista molecolare l'espressione delle varianti di splicing di POSTN in campioni di ADP

Materiali e Metodi

Valutazione istologica dell'espressione della proteina POSTN e delle molecole ad essa associate nel microambiente tumorale di ADP.

L'analisi sarà condotta su 80 preparati istologici di ADP già archiviati e disponibili presso l'Archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica del Policlinico di Modena e riconducibili ad altrettanti pazienti deceduti. In questo caso l'utilizzo del materiale biologico e dei dati personali a scopo di ricerca sarà possibile anche senza regolare dichiarazione di consenso. Di questi 80 campioni 50 saranno scelti all'interno di una coorte di pazienti che non ha ricevuto alcun trattamento chemioterapico prima dell'intervento, 30 saranno selezionati invece in una coorte di pazienti che ha ricevuto trattamento neoadiuvante prima dell'intervento. I preparati istologici selezionati verranno analizzati in collaborazione con la Struttura Complessa di Anatomia Patologica del Policlinico di Modena per l'espressione dei seguenti antigeni: POSTN, integrine $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 6\beta 4$), molecole pro ed anti-apoptotiche associate alla pathway di POSTN (Akt/PI3K, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, c-FLIP, Bcl-2) nei preparati istologici. Al fine di localizzare la produzione della

Studio molecolare delle varianti del gene POSTN nei pazienti affetti da ADP.

L'analisi sarà condotta su 80 preparati istologici di ADP già archiviati e disponibili presso l'Archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica del Policlinico di Modena e riconducibili ad altrettanti pazienti deceduti. In questo caso l'utilizzo del materiale biologico e dei dati personali a scopo di ricerca sarà possibile anche senza regolare dichiarazione di consenso. Di questi 80 campioni 50 saranno scelti all'interno di una coorte di pazienti che non ha ricevuto alcun trattamento chemioterapico prima dell'intervento, 30 saranno selezionati invece in una coorte di pazienti che ha ricevuto trattamento neoadiuvante prima dell'intervento. L'RNA verrà estratto dai campioni in FFPE usando il kit Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (PROMEGA) e l'estrattore automatizzato Maxwell (PROMEGA), retrotrascritto usando il RevertAid™ First-Strand Complementary DNA (cDNA) Synthesis Kit (Thermo Scientific) e Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'analisi quantitativa delle differenti varianti di splicing di POSTN sarà eseguita mediante RT-PCR usando StepOne Real Time-PCR System (Thermo Fisher Scientific) ed una libreria di primer selezionata in base alla letteratura (15).

Risultati attesi:

Nel presente progetto ci proponiamo di raggiungere i seguenti risultati (R):

R1) approfondire le conoscenze sull'espressione della proteina POSTN e delle sue varianti nel microambiente tumorale di pazienti affetti da ADP, correlando i risultati ottenuti con le caratteristiche cliniche dei pazienti;

R2) attraverso l'analisi istologica e lo studio delle molecole associate alla via di trasduzione di POSTN approfondire il ruolo biologico di questa molecola nel microambiente tumorale;



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze Mediche e
Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto

R3) analizzare l'impatto della chemioterapia sulla espressione di POSTN e delle sue varianti trovando correlazioni con le risposte al trattamento riscontrate nei pazienti.

Disegno dello studio:

Durata dello studio: 36 MESI

Termine presunto dello studio: luglio 2026

Si allega nell'ordine la documentazione sotto elencata:

- ✓ Protocollo in esteso dello studio. Versione N1. 28.04.2023;
- ✓ Sinossi dello studio. Versione N1. 28.04.2023;
- ✓ Scheda raccolta dati. Versione N1. 28.04.2023;
- ✓ Elenco dei centri partecipanti allo studio. Versione N1.28.04.2023;
- ✓ Curriculum vitae sintetico dello sperimentatore N1. 28.04.2023;
- ✓ Lettera di copertura economica. Versione N1. 28.04.2023;
- ✓ Modello dichiarazione conflitto di interessi dello sperimentatore. Versione N1. 28.04.2023

Data la natura pre-clinica dello studio non verrà stipulato alcun tipo di assicurazione.

Data

Firma del Promotore