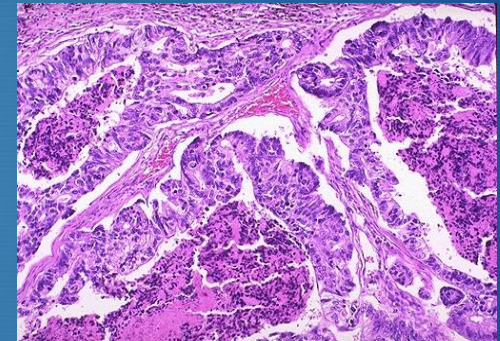
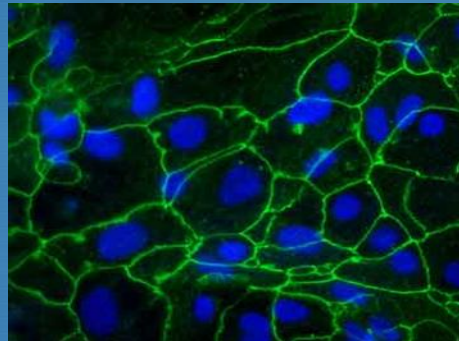


Il ruolo della μ -protocaderina nel cancro colo-rettale (CRC)



Cesare Lancellotti
Rodrigue Tepongnouck II

II CRC

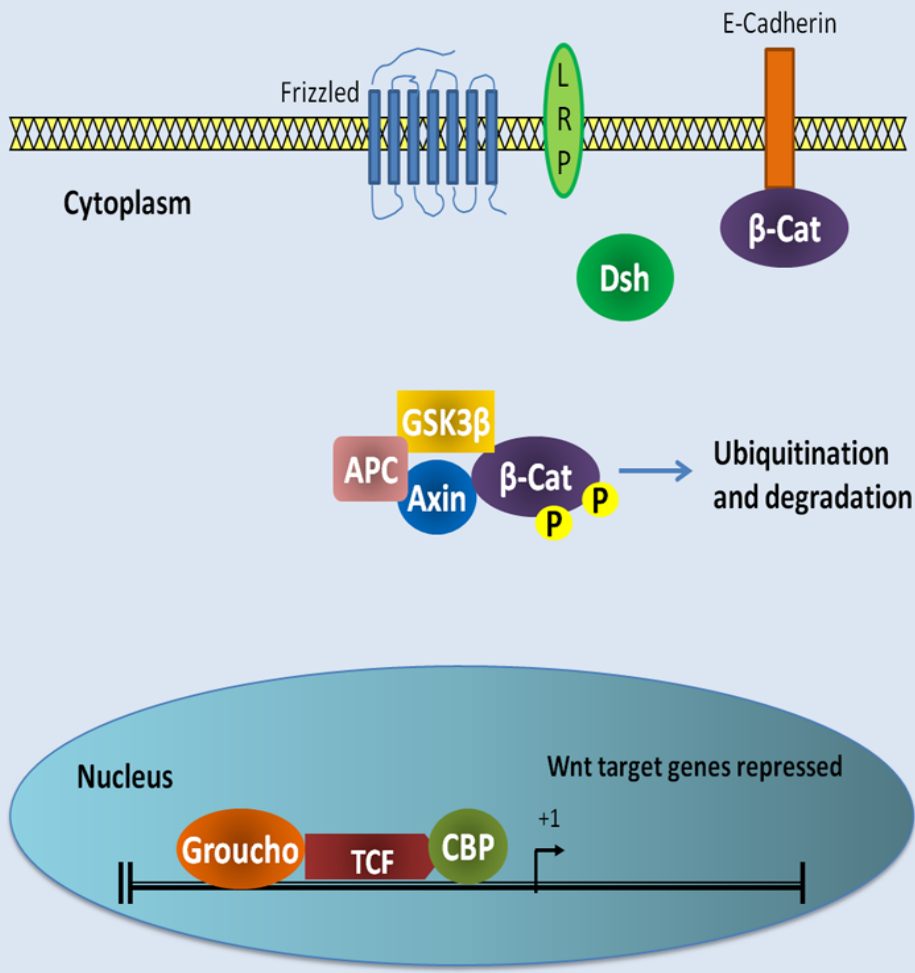
- Il cancro del colon retto costituisce il terzo tumore più frequente in ambo i sessi
- Il processo di cancerogenesi consta di più tappe, che prevedono da una parte la perdita di differenziazione delle cellule, dall'altra l'incontrollata crescita
- A livello biomolecolare la progressione tumorale è il risultato dell'attivazione di proto-oncogeni come la β -catenina, proteina favorente la proliferazione

Il processo biomolecolare

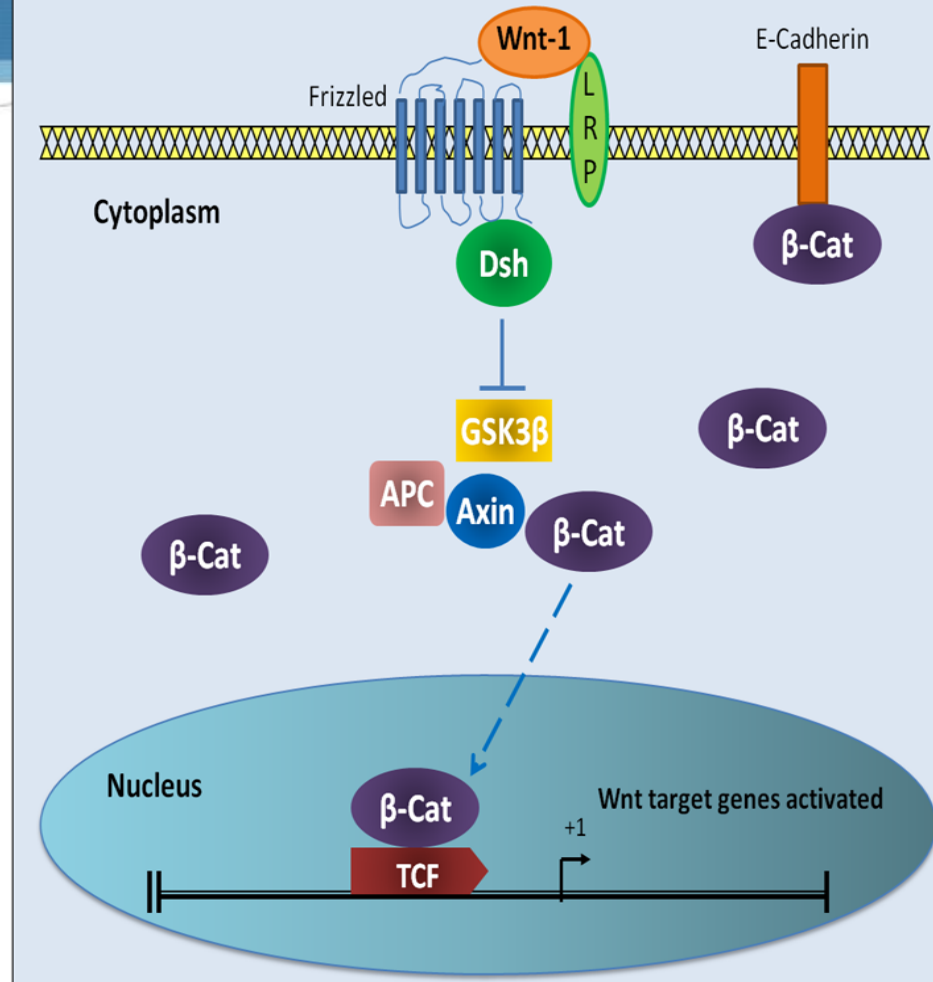
- La via della β -catenina può subire alterazioni secondo la via mediata da WNT, o in modo indipendente da WNT, tramite un'alterazione delle caderine
- Le caderine sono glicoproteine determinanti sia l'adesione cellulare con le caderine limitrofe sia la sub-localizzazione della β -catenina sulla membrana citoplasmatica
- Se attivata da uno stimolo mitotico la β -catenina si dissocia dalle caderine e trasloca nel nucleo dando via alla proliferazione cellulare

La via della β -catenina

Absence of ligand



Presence of ligand

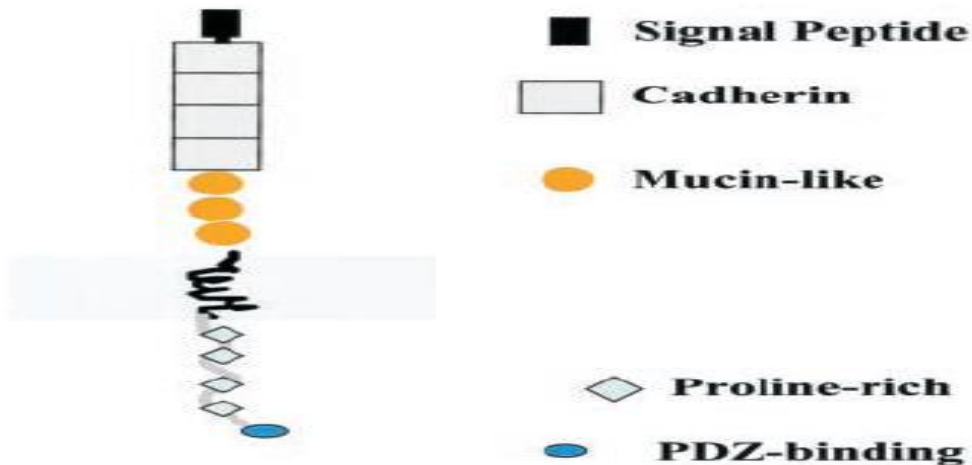


Le caderine

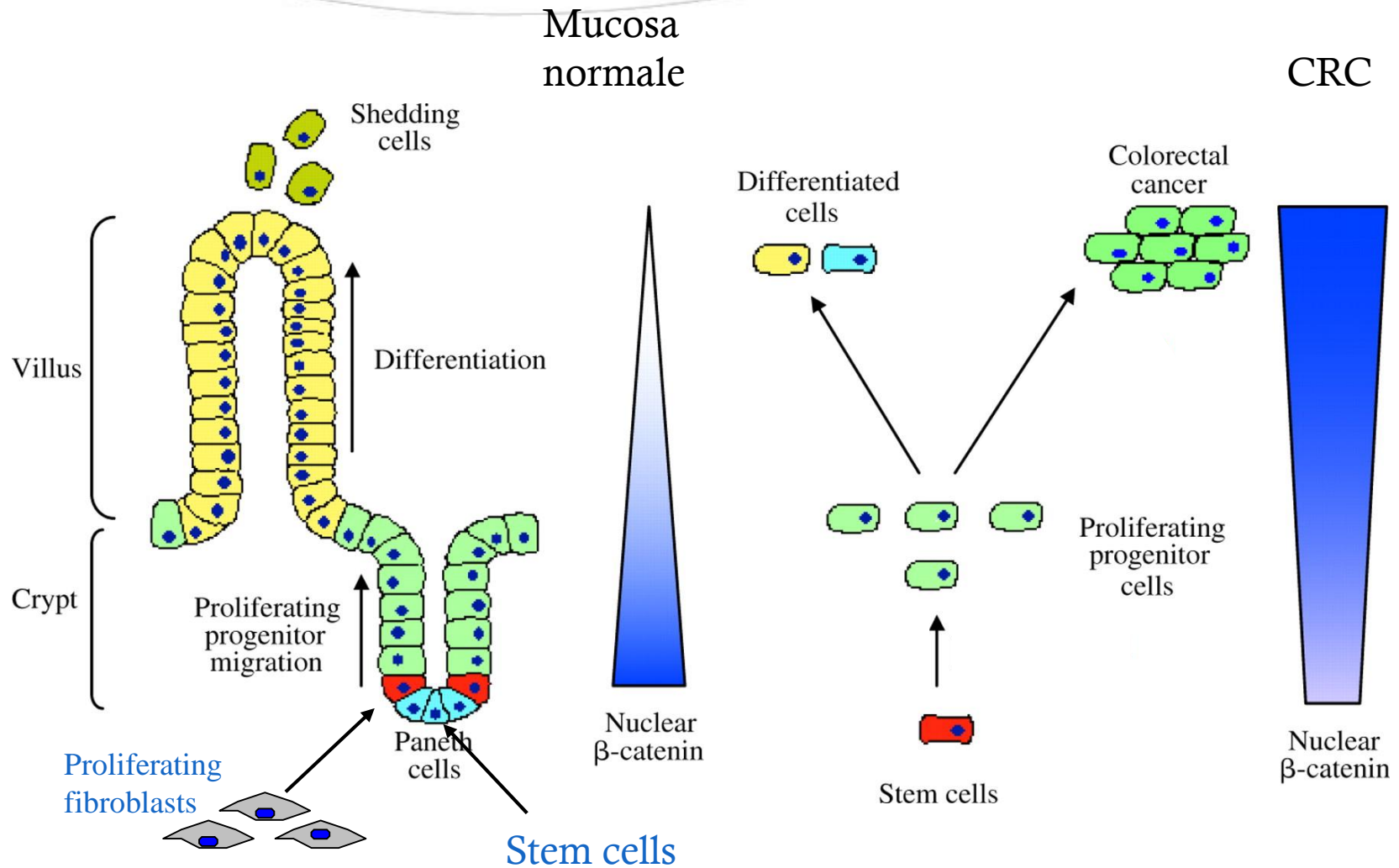
- Le caderine sono una famiglia di circa 100 membri, e la E-caderina è comunemente considerata l'elemento più importante
- Tra le caderine anche la μ -protocaderina potrebbe giocare un ruolo altrettanto importante nel processo di cancerogenesi
- Trattamenti chemio-preventivi con 5-ASA (mesalazina) hanno determinato un'aumentata espressione della μ -protocaderina, avvalorandone la natura onco-soppressiva

μ -protocaderina: struttura

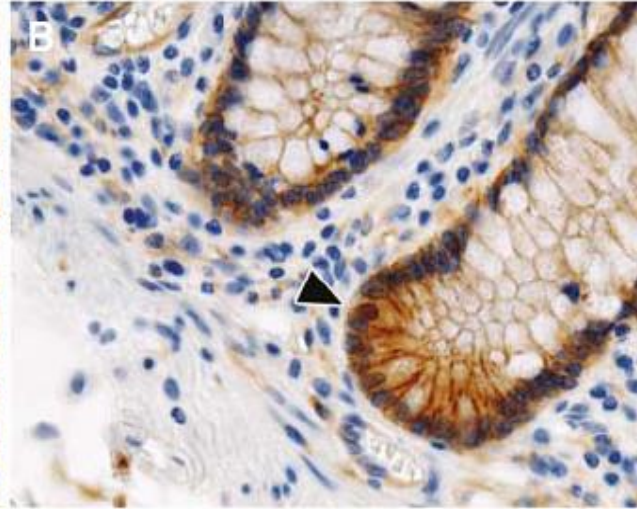
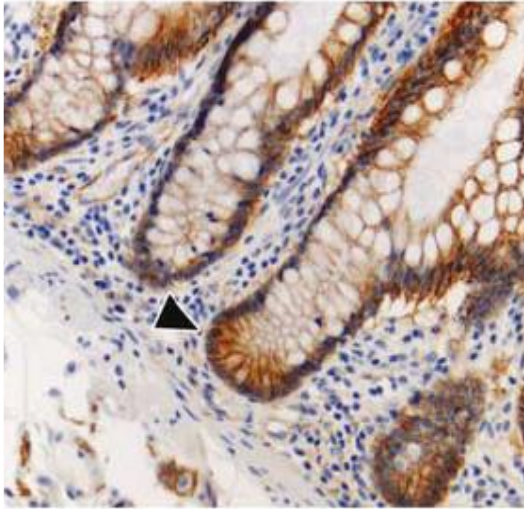
- La μ -protocaderina è una proteina trans-membrana espressa in più organi, e coinvolta nell'adesione cellulare nei tessuti epiteliali
- Con il suo dominio intra-citoplasmatico lega la β -catenina, mentre con quello extracellulare lega le caderine limitrofe mediante il legame elettrostatico favorito dagli ioni Calcio



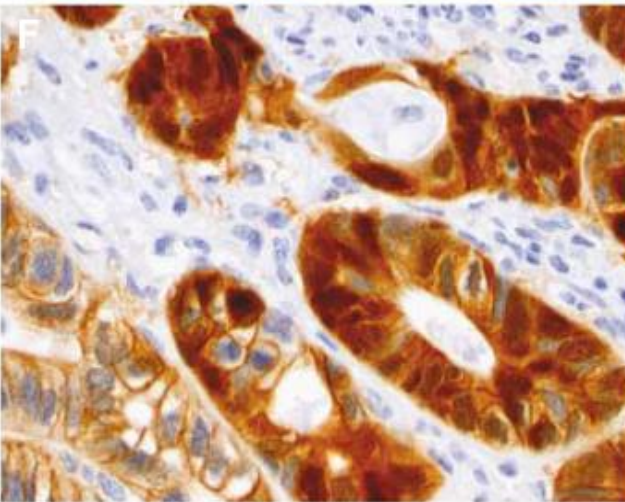
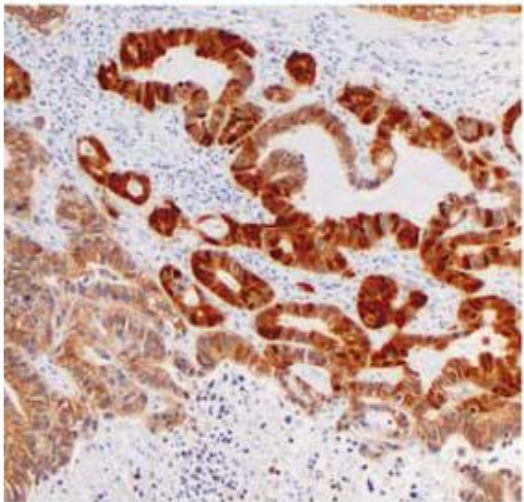
Attività della β -catenina: normalità / cancro



Localizzazione della β -catenina



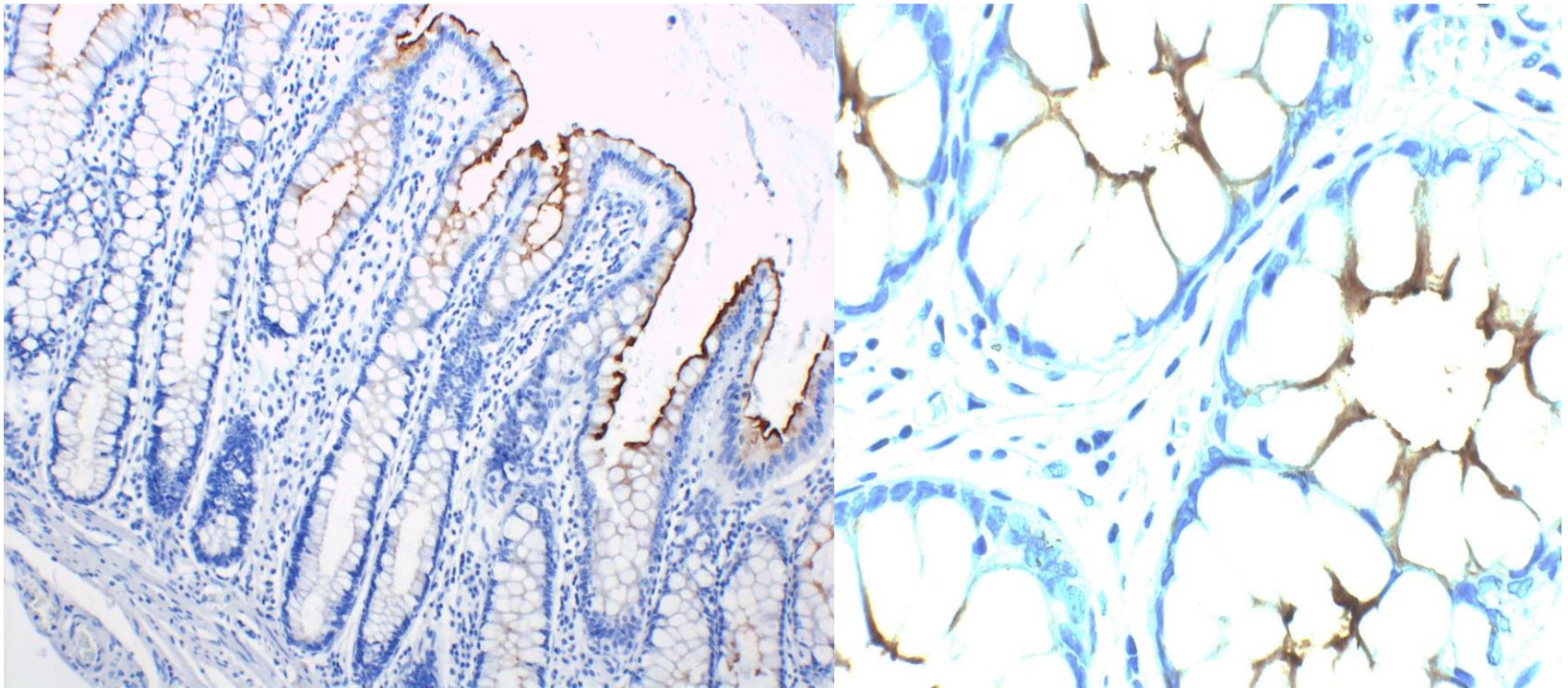
**Mucosa
colo-rettale
normale**



**Cancro
colo-
rettale**

μ -protocaderina nella mucosa normale

μ -protocaderina: mucosa normale



Materiali e metodi

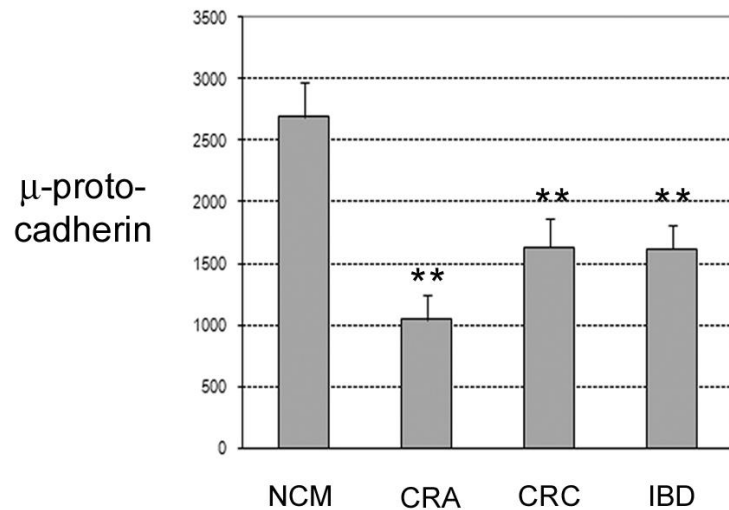
- In questo studio sono stati analizzati 28 carcinomi colo-rettali di cui 20 localizzati al colon distale, 4 al colon prossimale, 4 al retto, sui quali si è eseguita l'analisi immunohistochimica per l'evidenziazione della μ -protocaderina, β -catenina, E-caderina e per valutare la proliferazione cellulare tramite l'espressione di Ki-67
- Sono state anche studiate 4 linee cellulari di cancro colo-rettale: Caco2, HT29, LoVo e HCT116 e alcune biopsie di mucosa normale colica per analizzare, mediante RT-PCR quantitativa, l'espressione degli mRNA dei geni codificanti per μ -protocaderina ed E-caderina

Microarray

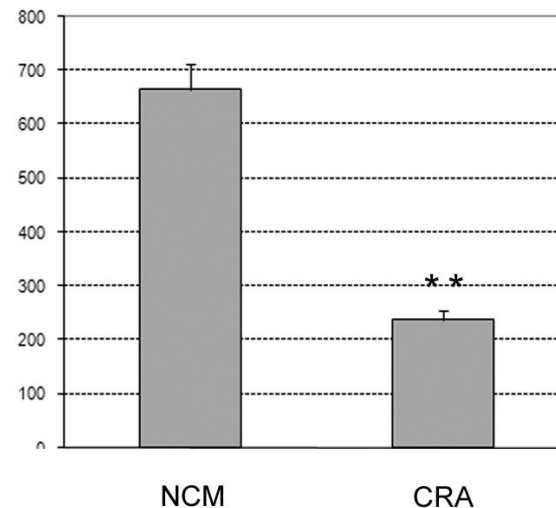
- Per verificare i dati ottenuti è stata svolta un'analisi di espressione di μ -protocaderina e della E-caderina a partire da profili di espressione genica ottenuti mediante DNA microarray provenienti da due database pubblici del GEO, gene expression omnibus
- Nel primo erano contenuti 8 campioni di mucosa normale (NCM), 15 di adenoma (CRA), 15 carcinomi colo-rettali (CRC) e 15 campioni di mucosa con patologia infiammatoria cronica (IBD)
- Nel secondo 32 campioni di mucosa normale e da 32 adenomi

ANALISI di MICROARRAY

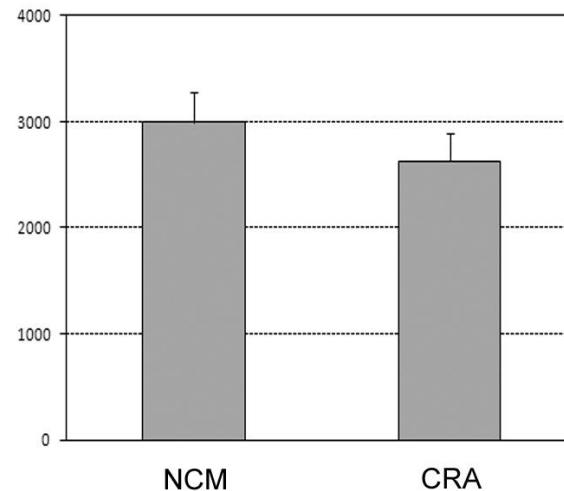
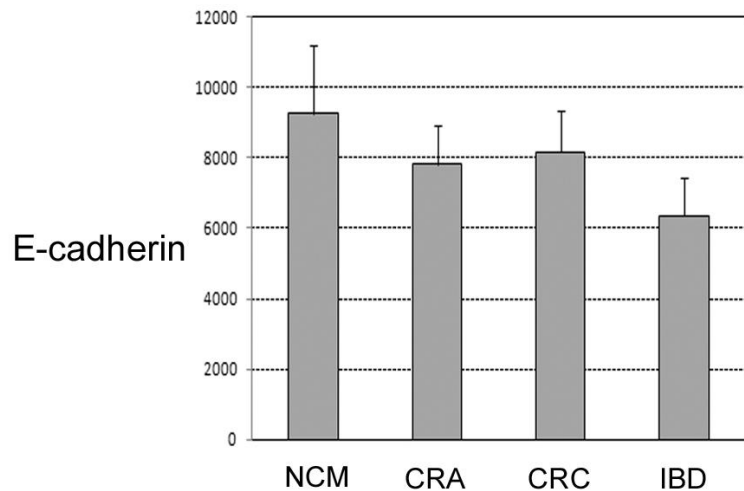
**Galamb et al.,
2007 Data Set**



**Sabates-Bellver et al.,
2007 Data Set**



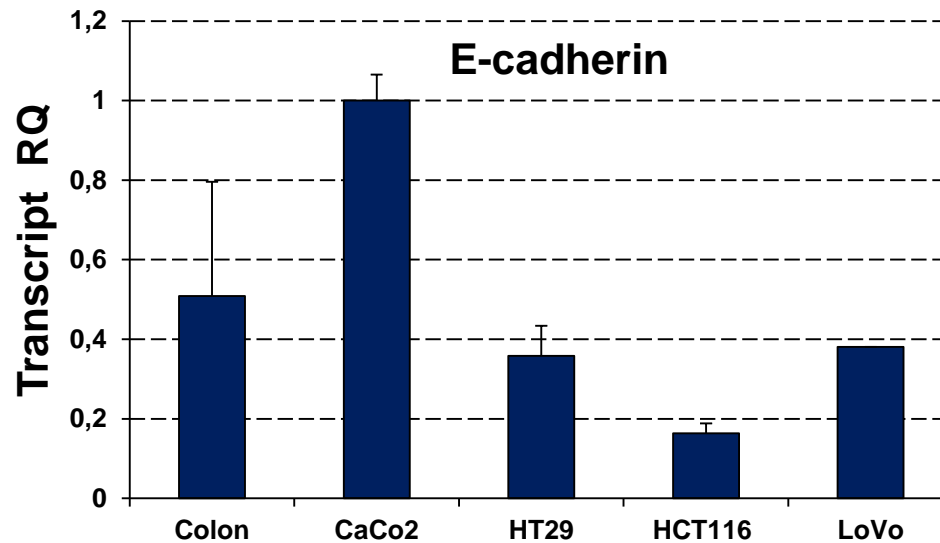
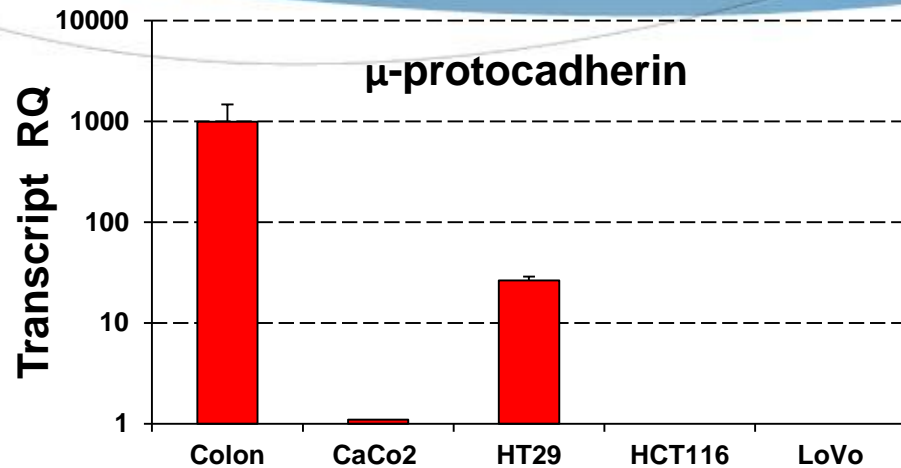
L'analisi con microarray ha mostrato una diminuzione dell'espressione dell'mRNA della μ -protocaderina di 2.5-3.5 volte rispetto alla mucosa normale mentre nessuna variazione significativa per E-caderina



QRT-PCR

- Nelle linee cellulari CaCo2 e HT29 si è rilevata una diminuzione dell'espressione della μ -protocaderina rispettivamente di 989 e 38 volte rispetto alla mucosa normale
- Nelle linee cellulari HCT116 e LoVo invece l'espressione del gene era completamente persa
- Non sono stati rilevate invece significative variazioni della E-caderina

ANALISI di RT-PCR QUANTITATIVA



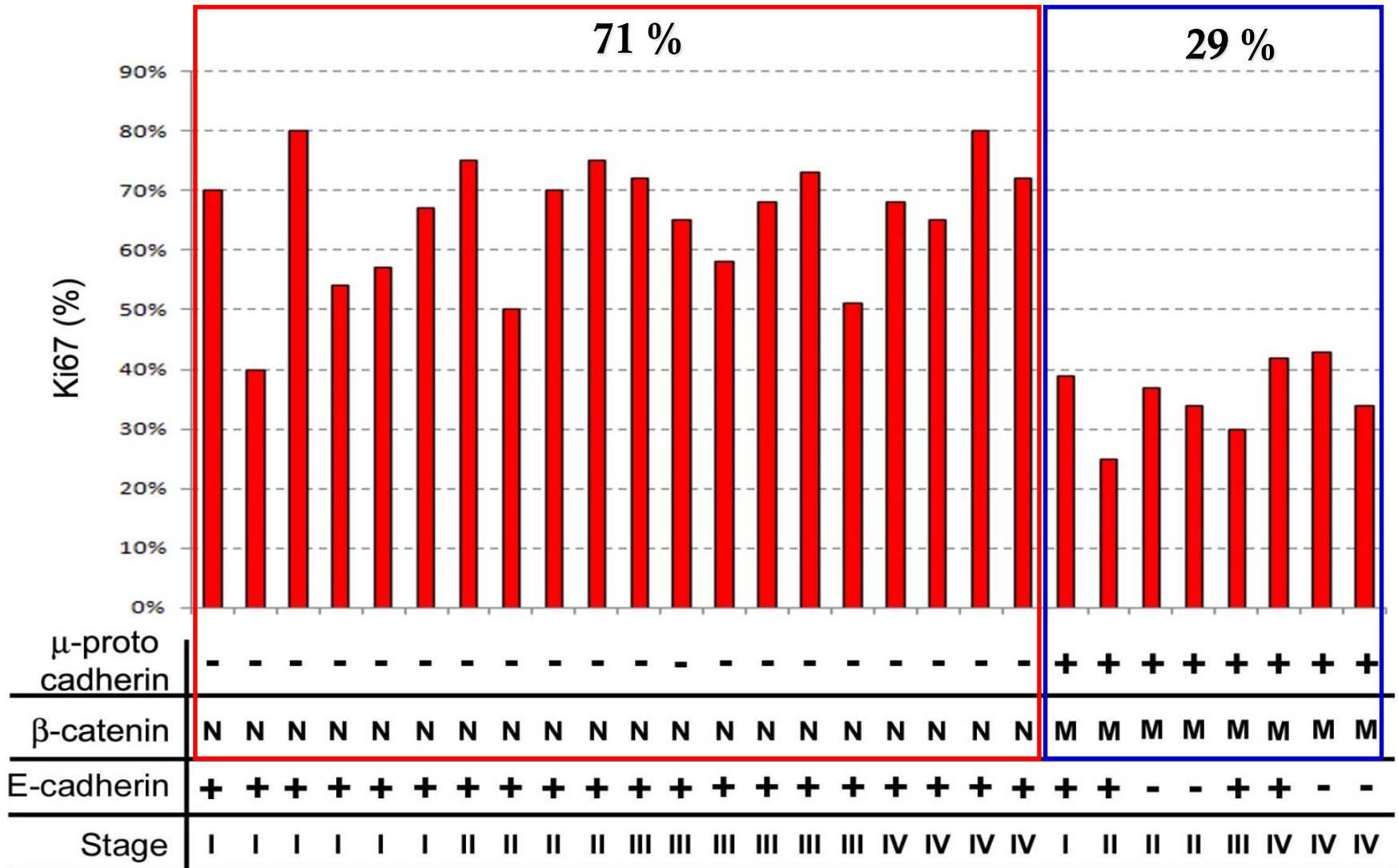
Immunohistochimica

- L'espressione della μ -protocaderina è stata valutata in base alla quantità di cellule neoplastiche positive: 0, assente; 1+, meno del 30%; 2+ dal 30 al 75%; 3+, più del 75% di cellule neoplastiche positive
- La soglia di valutazione della β -catenina (positivo vs negativo) è stata fissata al 10% di positività nucleare
- Un'alterazione dell'espressione della E-caderina è stata attribuita quando fosse espressa in meno del 10% delle cellule
- L'attività proliferativa è stata valutata come percentuale di cellule positive al Ki-67

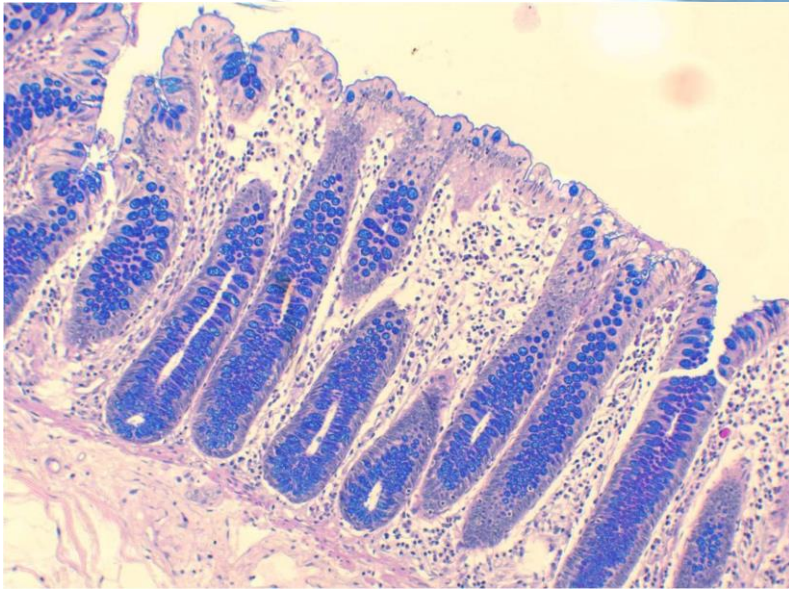
ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA (Cancro colo-rettale: 28 casi)

CRC μ -protocaderina negativi

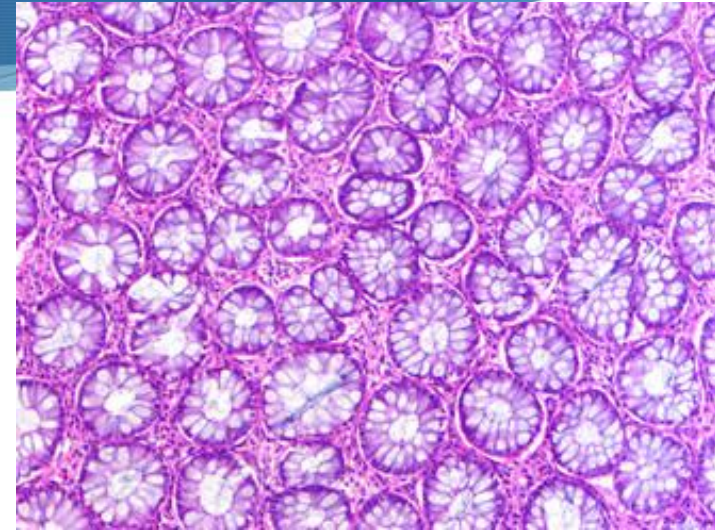
CRC μ -protocaderina positivi



Istologia di colon normale



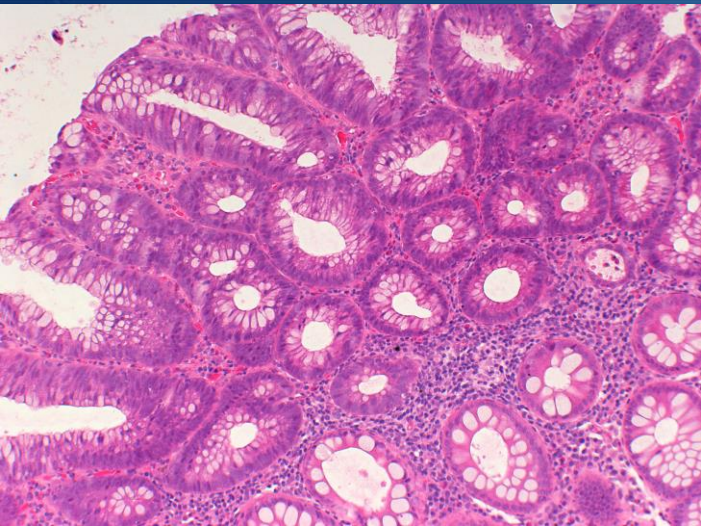
Sezioni longitudinali



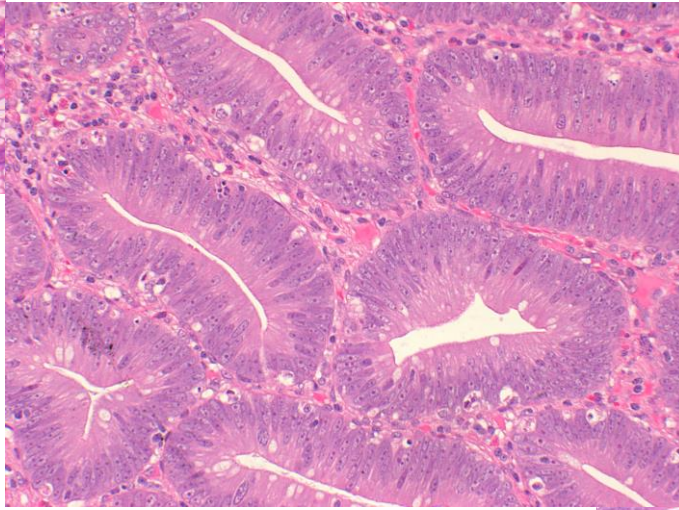
Sezione trasversale



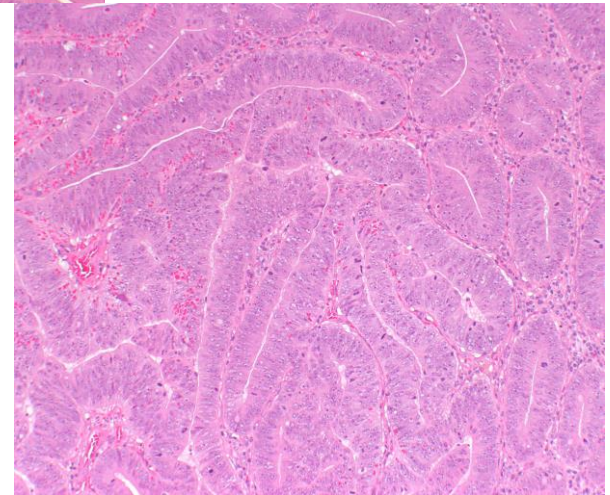
Adenoma



Displasia lieve

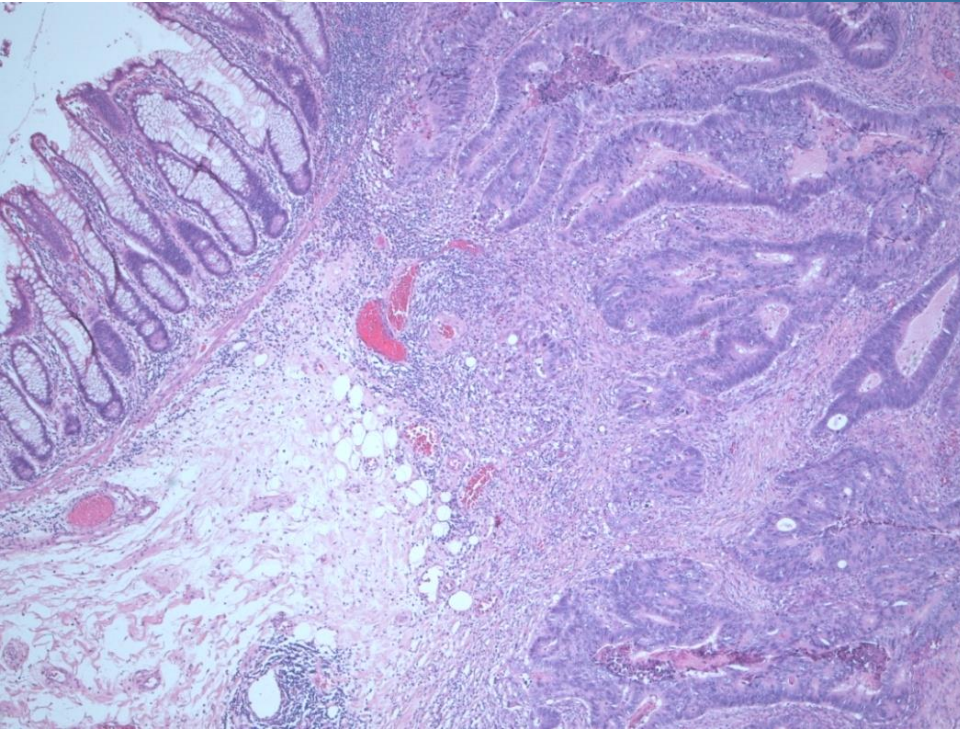


Displasia moderata

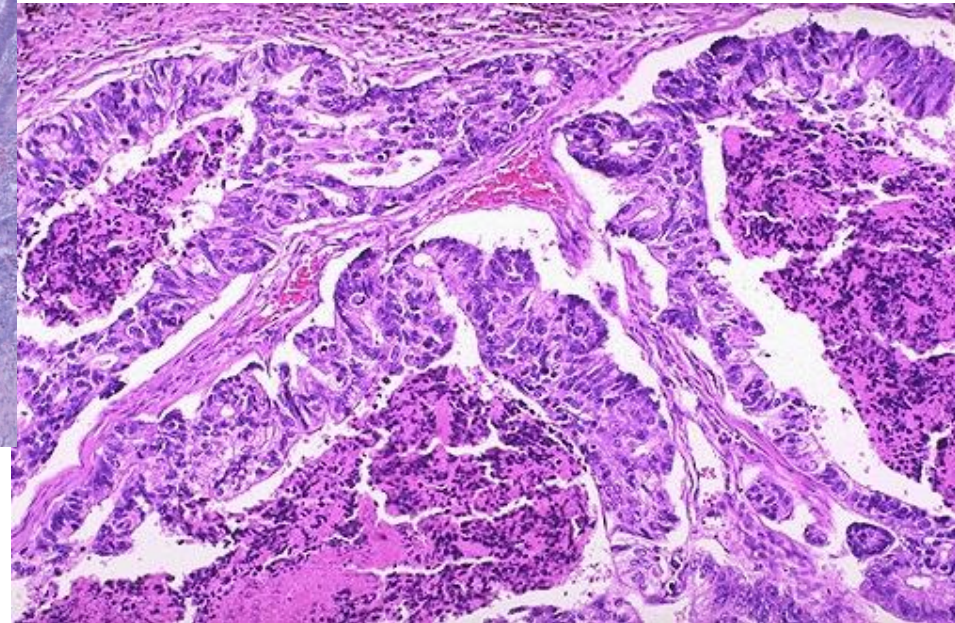


Displasia grave

CRC

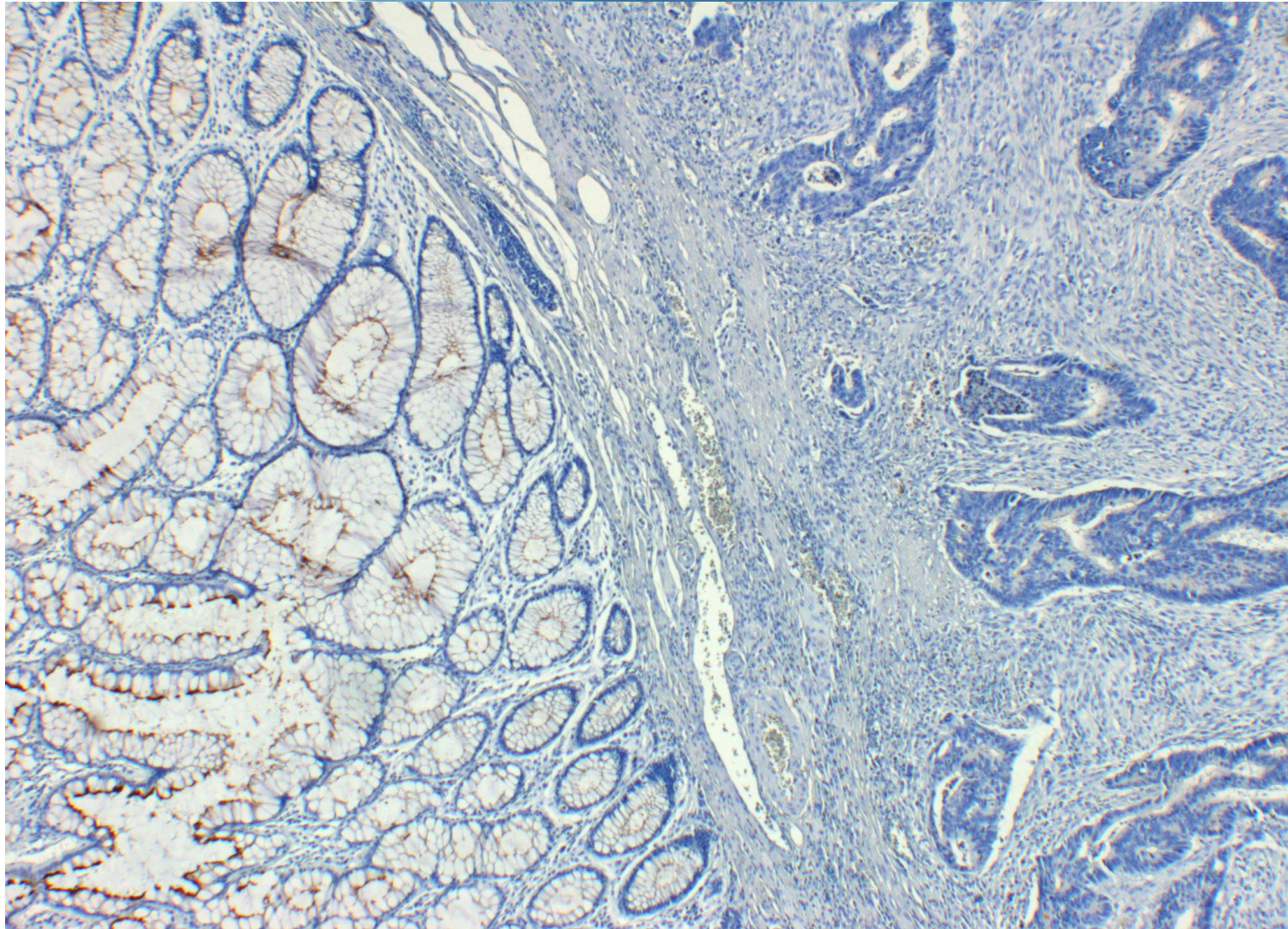


Adenocarcinoma



ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA

Confronto tra mucosa normale e CRC μ -protocaderina -



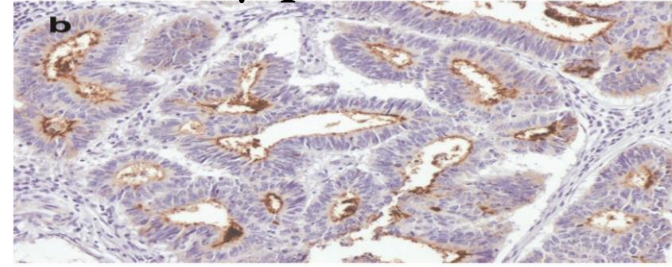
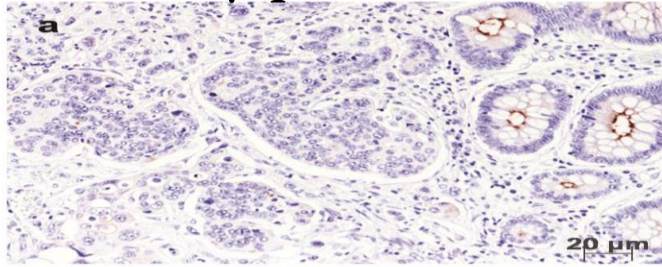
Mucosa normale

Cancro colo-rettale

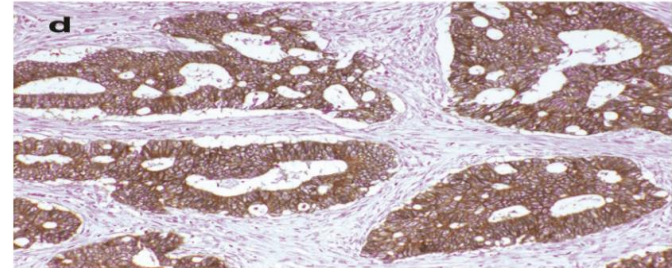
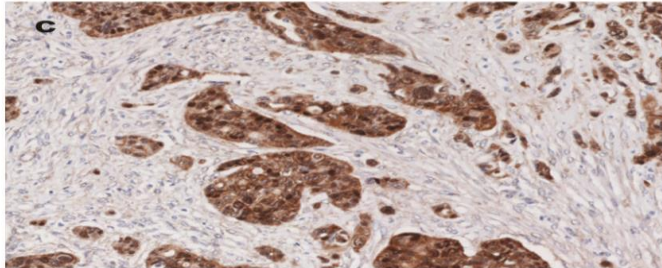
CRC μ -protocaderina -

CRC μ -protocaderina +

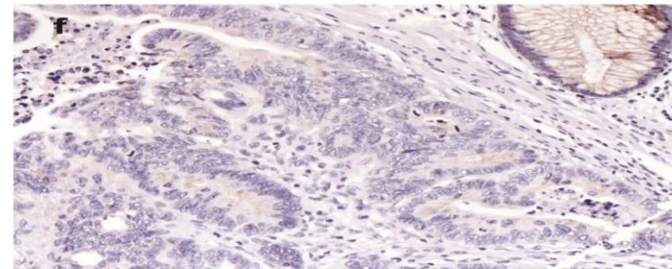
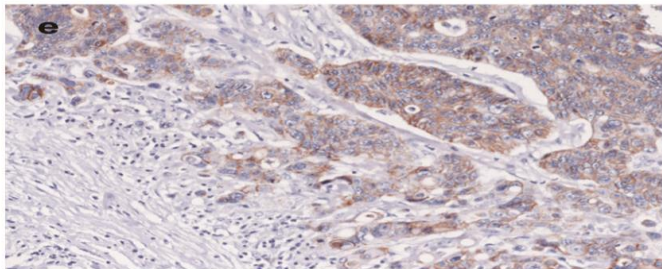
**μ -proto
cadherin**



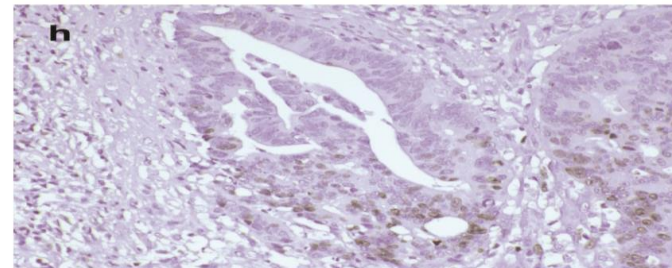
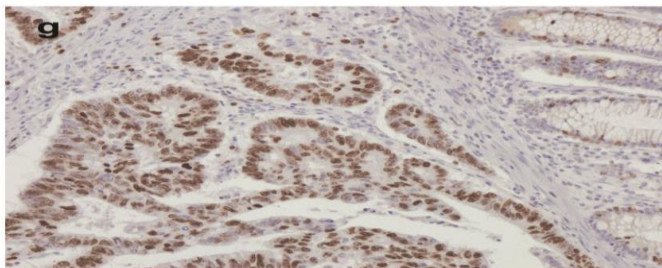
β -catenin



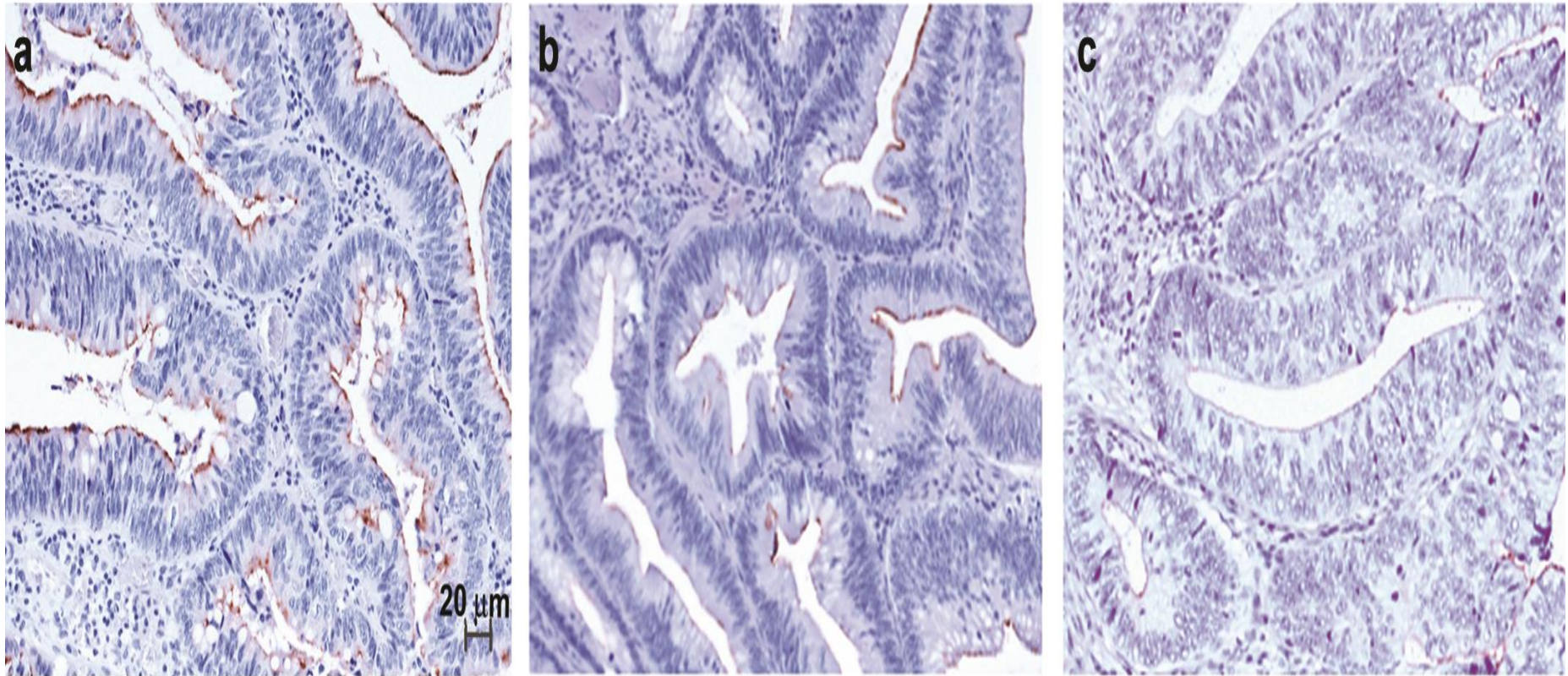
E-cadherin



Ki-67



ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA



μ -protocaderina: adenoma con displasia lieve, moderata, severa

Saggio di co-localizzazione

- I dati dell'analisi immunohistochemica sono stati confermati dall'indagine di co-localizzazione che ha rivelato la correlazione tra l'espressione della μ -protocaderina e l'espressione della β -catenina a livello di membrana nella mucosa normale e nei CRC μ -protocaderina positivi
- Sono stati applicati fluorocromi per la μ -protocaderina (rosso) e la β -catenina (verde)
- L'indagine congiunta di queste colorazioni (merge) ne ha dimostrato la co-localizzazione
- La traslocazione nucleare di β -catenina viene osservata solo nei casi di CRC μ -protocaderina negativi

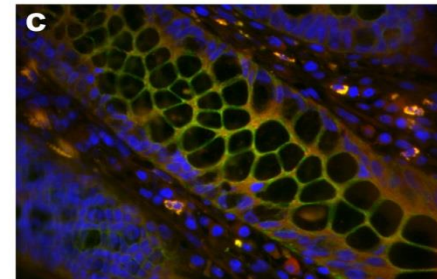
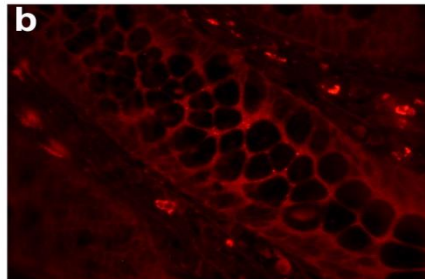
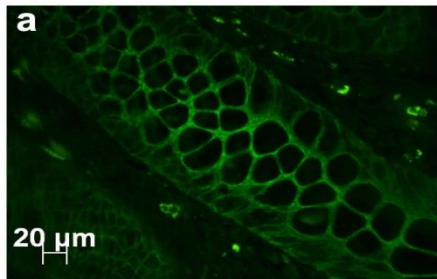
μ -protocadherina / β -cateninina

β -catenin

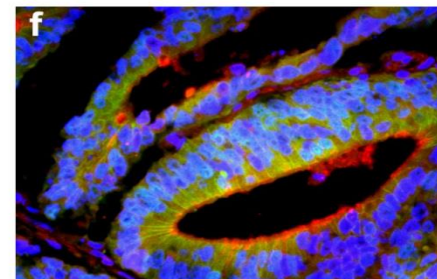
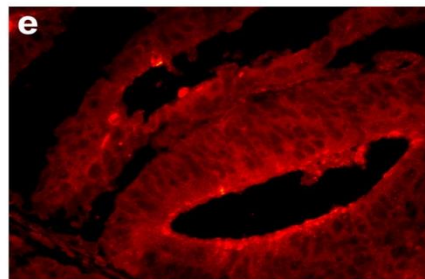
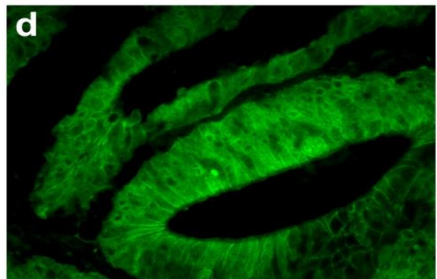
μ -proto-cadherin

Merge

Normal
colon
mucosa

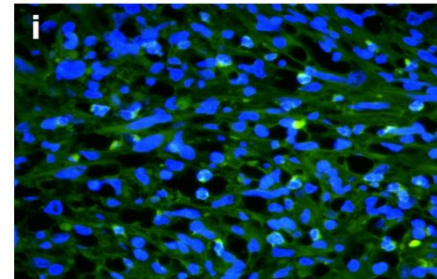
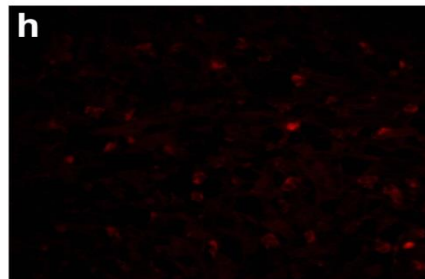
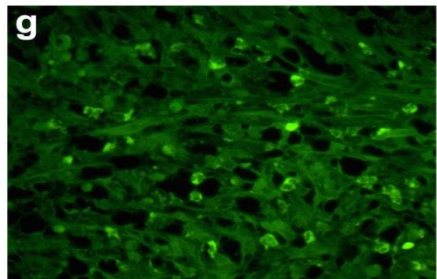


CRC
 μ -proto-
cadherin +



~30 %

CRC
 μ -proto-
cadherin -



~70 %

Conclusioni

- La down-regolazione della μ -protocaderina svolge un ruolo chiave nel processo di cancerogenesi colo-rettale
- La sua importanza è dimostrata dalla relazione tra la localizzazione nucleare della β -catenina e la perdita di espressione della μ -protocaderina
- La terapia con 5 ASA potrebbe costituire, favorendo l'up-regolazione della μ -protocaderina, un importante elemento nella chemio-prevenzione del CRC
- La μ -protocaderina di conseguenza si rivelerebbe un buon marcatore di risposta al trattamento



Ringraziamo per la collaborazione la Professoressa Losi Lorena,

Grazie per l'attenzione