

Tesi di Laurea: “Fattori implicati nella regolazione epigenetica dell’espressione di Reelin nel colangiocarcinoma: analisi immunohistochimica” (Sintesi)

Autore: G. Mazzotta

Relatore: S. Morini

Correlatore: S. Carotti

Introduzione

Il colangiocarcinoma (CCA) è una delle neoplasie più aggressive con prognosi peggiore a livello mondiale. Attualmente il solo trattamento in grado di fornire un potenziale beneficio è dato dalla chirurgia, sebbene solo una minoranza dei pazienti sia operabile alla diagnosi¹. Data l’assenza di trattamenti efficaci, è necessario comprendere i meccanismi patogenetici della malattia, in modo da individuare nuovi potenziali targets terapeutici, identificabili tra i markers specifici espressi dal tessuto neoplastico.

Reelin è una glicoproteina secreta a livello extracellulare da una varietà di tessuti a livello embrionale e nell’adulto². Nel tessuto nervoso embrionale, è dimostrato essere necessaria per una migrazione cellulare regolata e per il mantenimento del corretto orientamento neuronale³. Topi *Reeler* knock-out per entrambi i recettori di Reelin sviluppano atassia, ipoplasia del cervelletto e disposizione erronea delle cellule nervose⁴; analogamente mutazioni nel gene umano di *Reelin* (*RELN*) sono associate alla lissencefalia autosomica recessiva con ipoplasia cerebellare⁵. Reelin agisce primariamente come segnale di stop nella migrazione delle cellule neuronali⁶: diversi studi riportano un suo ruolo nella modulazione dell’adesione intercellulare mediata da alpha3beta1 integrina⁷ e da N-caderina⁸; recenti evidenze suggeriscono un suo coinvolgimento nella stabilizzazione del citoscheletro nel processo di migrazione neuronale⁹. Nel cervello adulto,

tale proteina rimane attiva, essendo coinvolta nei pathway di segnale che garantiscono la neurotrasmissione, i processi di memorizzazione e la plasticità sinaptica¹⁰. Dati recenti hanno dimostrato che Reelin è espressa anche in tessuti adulti periferici, quali sistema nervoso periferico¹¹, fegato¹², rene, testicolo e ovaio murini¹³, retina, tube di Falloppio, mammella¹⁴, negli odontoblasti¹⁵, nonché a livello delle cellule cromaffini del surrene, delle cellule MSH-secerenti della pars intermedia dell’ipofisi¹⁶ e a livello del pancreas¹⁷. Per analogia con il tessuto nervoso, tale marcatore potrebbe svolgere un ruolo nel mantenimento strutturale degli organi periferici in cui è espresso.

Reelin è stata recentemente studiata in diverse patologie tumorali a livello di diversi organi, quali fegato¹⁸, esofago¹⁹, mammella²⁰, stomaco²¹, colon²² e pancreas¹⁷, nelle quali è soggetta ad una *down-regulation*. Per i tumori dello stomaco e della mammella, la ridotta espressione di *Reelin* è stata associata rispettivamente ad uno stadio più avanzato di malattia e a peggior prognosi. Non vi sono attualmente dati circa la sua espressione nel colangiocarcinoma.

Diversi studi hanno correlato la ridotta espressione di *Reelin* a meccanismi epigenetici legati all’ipermetilazione del suo promotore²⁰⁻²⁴. La regolazione epigenetica consiste in cambiamenti ereditabili nell’espressione genica che si verificano indipendentemente da cambiamenti nella sequenza primaria di DNA; tali modificazioni si verificano a livello del DNA e delle proteine

istoniche, regolando l'accessibilità della cromatina e, conseguentemente, l'espressione genica.

Alterazioni in queste modificazioni sono un *hallmark* del cancro; terapie epigenetiche tentano di normalizzare i pattern di metilazione del DNA e le modificazioni post-traslazionali degli istoni che promuovono o mantengono un fenotipo tumorale²⁵.

Il fattore epigenetico che è stato maggiormente correlato con la regolazione di *Reelin* è DNMT1²⁶, il quale, interagendo con UHRF1 e EHMT2(G9a), media il mantenimento dei marcatori di silenziamento trascrizionale dopo la replicazione del DNA. La replicazione del DNA porta a due filamenti di DNA figli emimetilati. UHRF1 riconosce il DNA emimetilato e recluta DNMT1 per ristabilire il pattern di metilazione sul DNA di nuova sintesi²⁷. L'interazione di DNMT1 con EHMT2 ristabilisce le modificazioni post-traslazionali degli istoni nuovamente depositati.

Obiettivi

Si tratta di uno studio preliminare il cui scopo è quello di indagare, tramite immunohistochimica (IHC), l'espressione di *Reelin* nel colangiocarcinoma intra- ed extraepatico rispetto al tessuto sano e di analizzare l'espressione di marcatori epigenetici implicati nel mantenimento della metilazione del DNA e degli istoni durante la replicazione, quali DNMT1, EHMT2 e UHRF1, nel tessuto tumorale e nel tessuto sano. Infine ci si è proposti di valutare la presenza di una eventuale correlazione tra i marcatori epigenetici analizzati e *Reelin*.

Materiali e metodi

Abbiamo effettuato un'indagine immunohistochimica su 31 campioni di CCA, di cui 9 intraepatici e 22 extraepatici.

Sono stati impiegati i seguenti anticorpi: mouse monoclonal anti-*Reelin* antibody (MAB5366, Merck Millipore Darmstadt, Germany); rabbit monoclonal anti-DNMT1 antibody (ab188453, Abcam Cambridge, MA); rabbit monoclonal anti-EHMT2/G9a antibody (ab185050, Abcam Cambridge, MA); rabbit monoclonal anti-UHRF1 antibody (ab194236, Abcam Cambridge, MA).

L'immunoreattività è stata valutata mediante analisi semi-quantitativa da due operatori in maniera indipendente. Sono state valutate l'intensità di espressione di ciascun marcatore e la percentuale di cellule che mostrano immunoreattività, attribuendo uno Score da 0 a 3 per entrambi i parametri. Tali dati sono stati utilizzati per elaborare un IHC Score, dato dal prodotto tra il punteggio attribuito all'intensità del segnale e quello assegnato sulla base della percentuale di cellule positive.

L'analisi è stata effettuata in 3 campi di regioni corrispondenti ad ingrandimento a 10X per ciascun marcatore. Uno Score complessivo per ogni singolo campione è stato anche derivato come media dei valori.

Risultati

Abbiamo osservato una riduzione dell'espressione immunohistochimica di *Reelin* nel tumore rispetto al tessuto non tumorale ($p < 0,01$). L'analisi dei marcatori epigenetici implicati nel mantenimento della metilazione del DNA ed istoni ha mostrato che l'espressione di DNMT1, EHMT2 e UHRF1 risulta significativamente aumentata nel tumore rispetto al tessuto sano ($p < 0,01$) (Fig. 1).

L'IHC Score di *Reelin* risulta inversamente correlato con l'IHC Score di DNMT1 ($R = -0,301$; $p < 0,01$) e quello di UHRF1 ($R = -0,31$; $p = 0,041$). Al contrario non si individua una correlazione staticamente significativa tra *Reelin* e EHMT2 (Tab. 1).

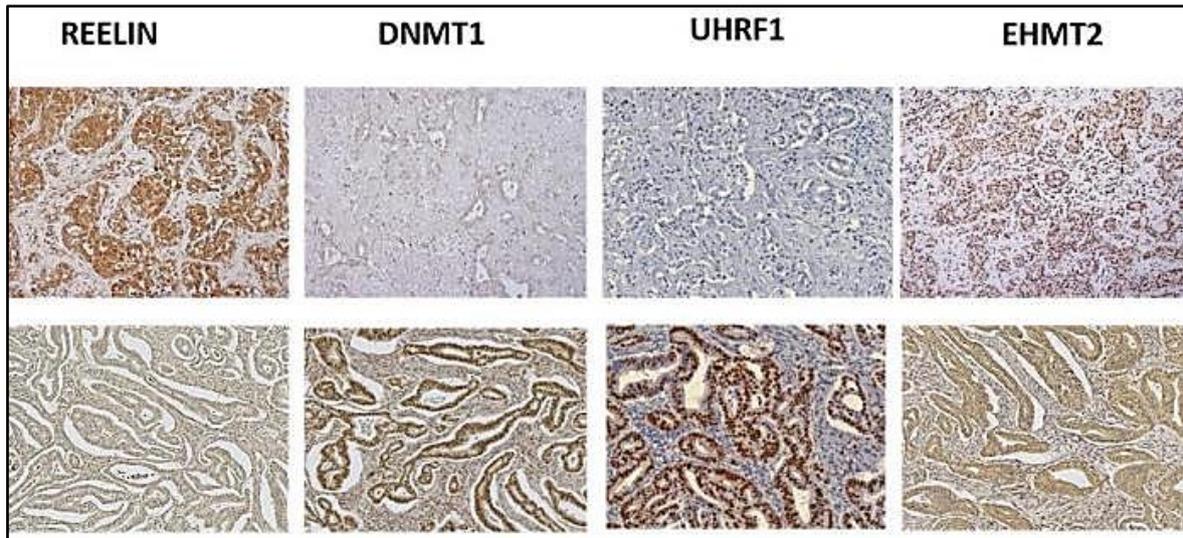


Fig. 1: Immunoistochimica per Reelin (prima colonna da sinistra), DNMT1 (seconda colonna), UHRF1 (terza colonna) e EHMT2 (quarta colonna): analisi per campi corrispondenti. Nelle immagini disposte nella riga inferiore si nota come, analizzando campi corrispondenti, l'immunoreattività citoplasmatica di Reelin risulti lieve o assente, mentre la positività nucleare di DNMT1, UHRF1 e EHMT2 sia intensa; nella riga superiore, viceversa, l'intensa positività citoplasmatica di Reelin correla inversamente con la positività lieve o nulla di DNMT1, UHRF1 e EHMT2.

	Mediana IHC score nel tumore	Mediana IHC score nel tessuto sano.
Reelin	5 (5)	7,5 (3)
DNMT1	1,5 (1,5)	0 (0)
UHRF1	6 (1,25)	0 (2,25)
EHMT2	7,5 (5)	1,5 (1,75)

Tab. 1: Sono indicati i valori di mediana tra gli IHC score dei marcatori analizzati. Tra parentesi sono riportati i rispettivi range interquartili 25-75%.

Nella valutazione campo per campo, l'IHC Score di Reelin risulta inversamente correlato con l'IHC Score di DNMT1 (Test di Spearman, $R=-0,301$; $p<0,01$) e quello di

UHRF1 (Test di Spearman, $R=-0,31$; $p=0,041$). Al contrario non si individua una correlazione staticamente significativa tra Reelin e EHMT2 (Test di Spearman, $R=-0,088$; $p=0,49$) (Fig. 2).

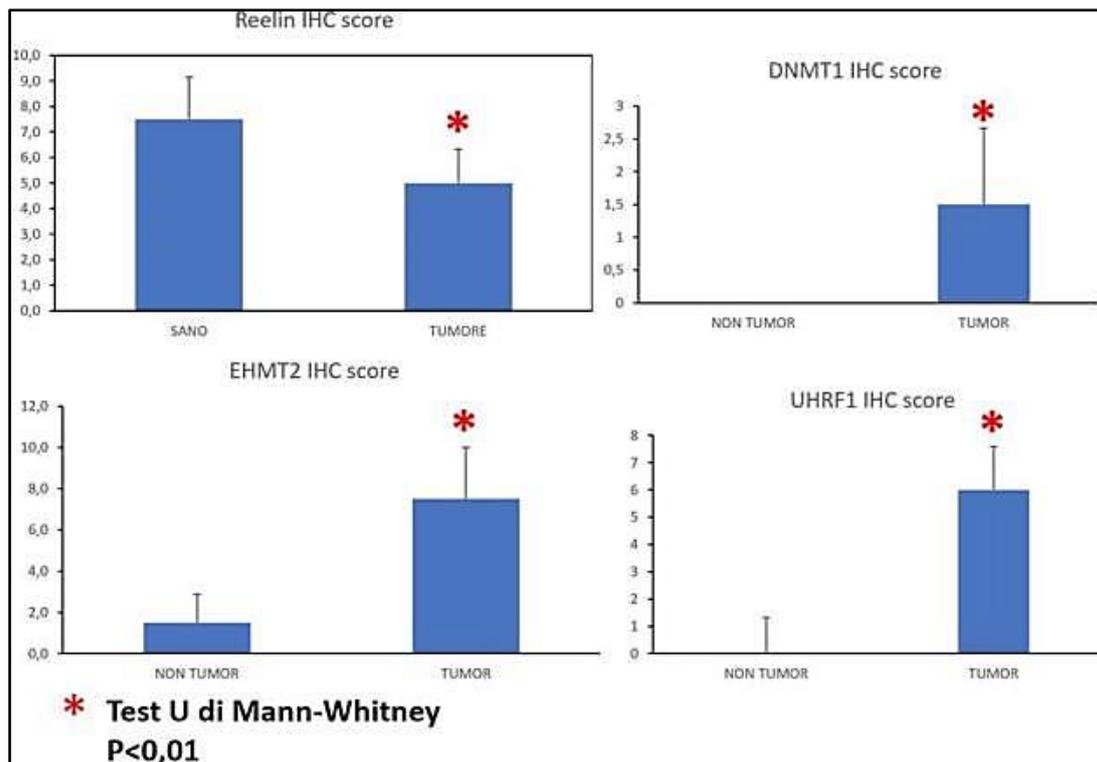


Fig. 2: Confronto (test U di Mann-Whitney) dell'espressione di Reelin, DMT1, EHMT2 e UHRF1 nel tessuto sano e nel colangiocarcinoma.

Discussione

Nel tessuto nervoso l'espressione di Reelin è dimostrato essere necessaria per il normale posizionamento dei neuroni; per analogia tale marcatore potrebbe svolgere una funzione analoga nei tessuti nei quali è stato riportato essere espresso.

Nella patologia tumorale, in cui si assiste a una disregolazione dei normali meccanismi di omeostasi cellulare e tissutale, la diminuzione dell'espressione di *Reelin* potrebbe essere associata ad un'alterazione dei meccanismi di proliferazione e migrazione, associati allo sviluppo neoplastico.

Sebbene siano necessari ulteriori studi che confermino tali dati, la ridotta espressione di Reelin osservata nel colangiocarcinoma rispetto al tessuto sano fa supporre un possibile coinvolgimento della proteina nei meccanismi tumorali del colangiocarcinoma.

L'osservazione di una correlazione inversa tra l'IHC Score di Reelin e l'IHC Score di DNMT1-UHRF1 suggerisce che il gene *RELN* possa essere regolato mediante variazioni del grado di metilazione del DNA, processo al quale DNMT1 e UHRF1 prendono attivamente parte. La possibile regolazione epigenetica del gene *RELN* potrebbe, se confermata, aprire nuovi scenari sul piano terapeutico, tenendo conto del carattere potenzialmente reversibile delle modificazioni epigenetiche e della disponibilità già attualmente di molecole in grado di inibire DNMT1 (Azacitabina, Decitabina)²⁷, UHRF1²⁸ o il complesso DNMT1-EHMT2 (CM-272)^{29, 30}.

BIBLIOGRAFIA

1. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 5: 261-80.

2. Weeber EJ, Beffert U, Jones C, et al. *Reelin* and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002; 277: 39944-52.
3. Frotscher M, Zhao S, Wang S, Chai X. Reelin Signaling Inactivates Cofilin to Stabilize the Cytoskeleton of Migrating Cortical Neurons. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 148.
4. Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 1997; 389: 733-7.
5. Hong TS, Wo JY, Yeap BY, et al. Multi-Institutional Phase II Study of High-Dose Hypofractionated Proton Beam Therapy in Patients With Localized, Unresectable Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol* 2016; 34: 460-8.
6. Castellano E, Molina-Arcas M, Krygowska AA, et al. RAS signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. *Nat Commun* 2016; 7: 11245.
7. Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, et al. Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 2000;27: 33-44.
8. Matsunaga Y, Mariko N, Murakawa H, et al. Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. *Proc Nat Acad Sci* 2017; 114: 2048-53.
9. Frotscher M, Zhao S, Wang S, Chai X. Reelin Signaling Inactivates Cofilin to Stabilize the Cytoskeleton of Migrating Cortical Neurons. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 148.
10. Weeber EJ, Beffert U, Jones C, et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002; 277(42): 39944-52.
11. Panteri R, Mey J, Zhelyaznik N, et al. Reelin is transiently expressed in the peripheral nerve during development and is upregulated following nerve crush. *Mol Cell Neurosci* 2006; 32: 133-42.
12. Carotti S, Perrone G, Amato M, et al. Reelin expression in human liver of patients with chronic hepatitis C infection. *Eur J Histochem* 2017; 61: 2745.
13. Ikeda Y, Terashima T. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn* 1997; 210: 157-72.
14. Mikulska-Ruminska K, Strzelecki J, Nowak W. Dynamics, nanomechanics and signal transduction in reelin repeats. *Sci Rep* 2019; 9: 18974.
15. Maurin JC, Couble ML, Didier-Bazes M, Brisson C, Magloire H, Bleicher F. Expression and localization of reelin in human odontoblasts. *Matrix Biol* 2004; 23: 277-85.
16. Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, et al. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1281-6.
17. Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H, Goggins M. Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology* 2006; 130: 548-65.
18. Luo Y, Huang K, Zheng J, Zhang J, Zhang L. TGF- β 1 promotes cell migration in hepatocellular carcinoma by suppressing reelin expression. *Gene* 2019; 688: 19-25.
19. Yuan Y, Chen H, Ma G, Cao X, Liu Z. Reelin is involved in transforming growth factor- β 1-induced cell migration in esophageal carcinoma cells. *PLoS One* 2012; 7: e31802.
20. Stein T, Cosimo E, Yu X, et al. Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *Am J Pathol* 2010; 177: 2323-33.
21. Dohi O, Takada H, Wakabayashi N. Epigenetic silencing of RELN in gastric cancer. *Int J Oncol* 2010; 36: 85-92.
22. Serrano-Morales JM, Vázquez-Carretero MD, Peral MJ, Ilundáin AA, García-Miranda P. Reelin-Dab1 signaling system in human colorectal cancer. *Mol Carcinog* 2017; 56: 712-21.
23. Tremolizzo L, Carboni G, Ruzicka WB, et al. An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 17095-100.
24. Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, et al. Hypermethylation of the Reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 134B: 60-6.

25. Bates SE. Epigenetic Therapies for Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383: 650-63.
26. Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, et al. DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 348-53.
27. Liu X, Gao Q, Li P, et al. UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nat Commun* 2013; 4: 1563.
28. Li J, Hao D, Wang L. Epigenetic targeting drugs potentiate chemotherapeutic effects in solid tumor therapy. *Sci Rep* 2017; 7: 4035.
29. Xue B, Zhao J, Feng P, Xing J, Wu H, Li Y. Epigenetic mechanism and target therapy of UHRF1 protein complex in malignancies. *Onco Targets Ther* 2019; 12: 549-59.
30. Bárcena-Varela M, Caruso S, Llerena S, et al. Dual Targeting of Histone Methyltransferase G9a and DNA-Methyltransferase 1 for the Treatment of Experimental Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2019; 69: 587-603.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 25 luglio 2019

Dott. Giorgio Mazzotta, Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Sergio Morini, Ordinario Anatomia Umana, Dip. Anatomia Microscopica e Ultrastrutturale, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Simone Carotti, Dip. Anatomia Microscopica e Ultrastrutturale, Università Campus Bio-Medico di Roma

Per la corrispondenza:
giorgiomazzotta94@gmail.com