



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea:
Scienze Biologiche

Fattori coinvolti nella regolazione della progressione del cancro al Colon-retto

Factor involved in the regulation of colorectal cancer progression

Tesi di Laurea di:

Zega Ilaria

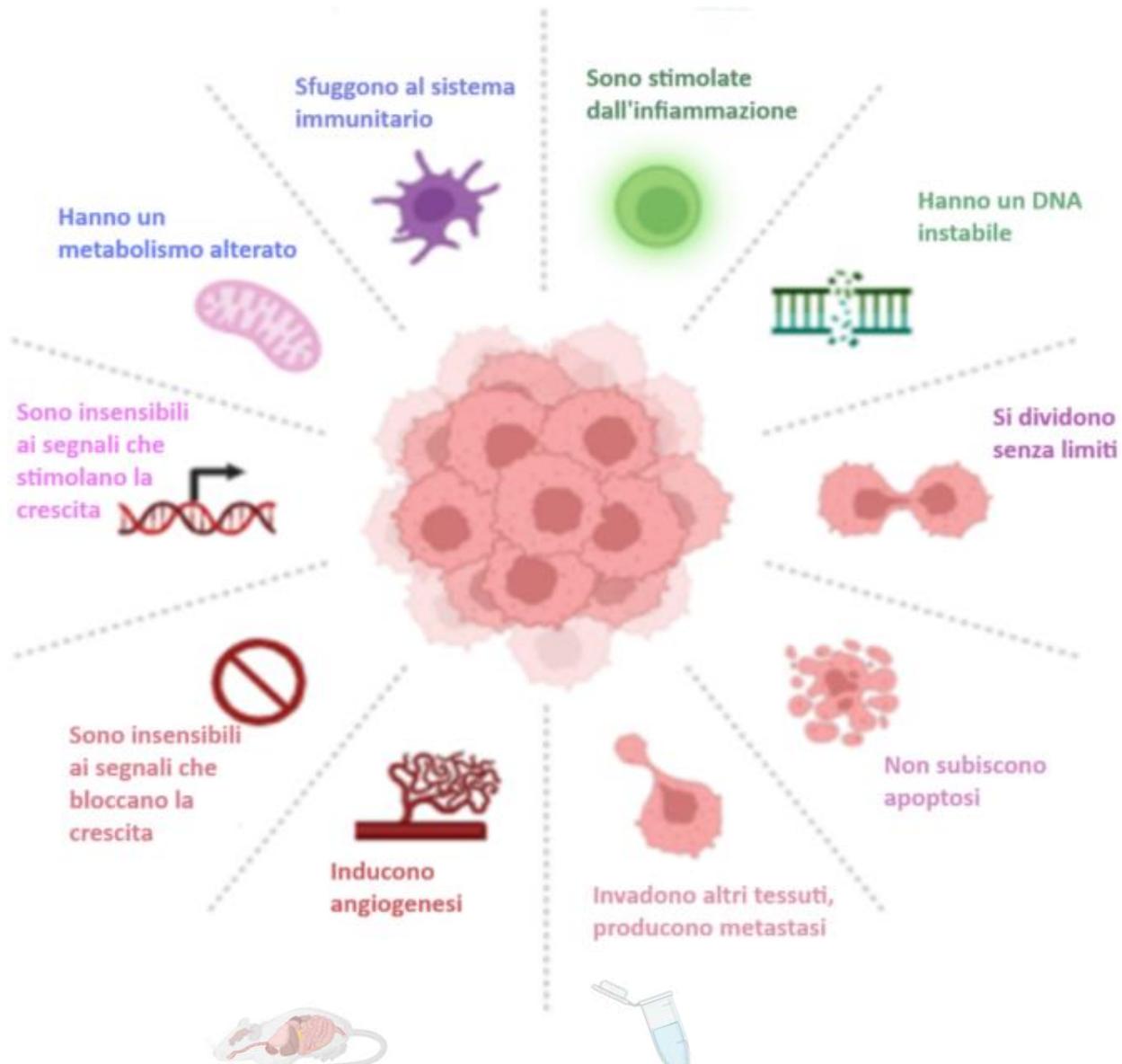
Docente Referente:

Oliana Carnevali

Sessione di laurea Estiva

Anno accademico 2023/2024

Che cos'è il cancro?



Cancro colon-rettale

Il cancro colon-rettale, è una forma di cancro che inizia nel colon (intestino crasso) o nel retto.

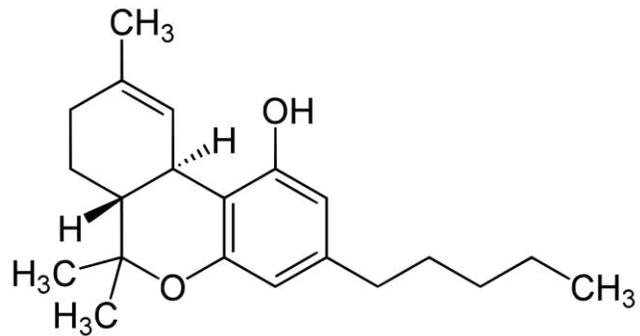
Diversi fattori possono aumentare il rischio di svilupparlo:

- **Età**
- **Storia Familiare**
- **Malattie Infiammatorie Intestinali**
- **Dieta**
- **Stile di Vita**
- **Genetica**

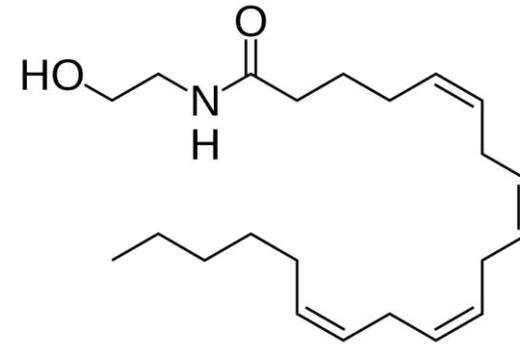
Scopo della ricerca

Identificare i fattori coinvolti nella regolazione dell'insorgenza del cancro al colon retto: **focus su $\Delta 9$ -Tetraidrocannabinolo ($\Delta 9$ -THC) e Anandamide (AEA)**

$\Delta 9$ -THC



AEA



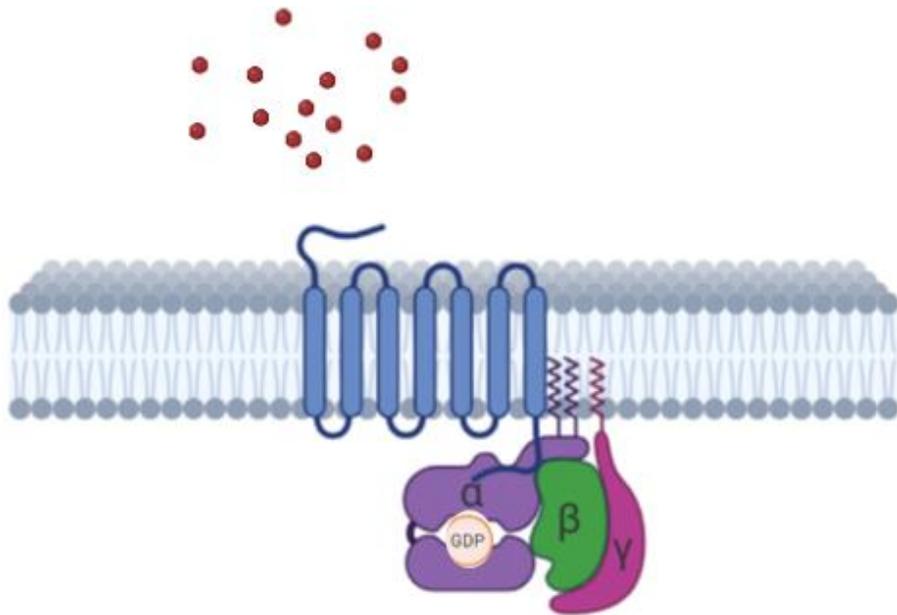
THC, promuove il volume tumorale e la formazione delle metastasi, Anandamide sembra ridurre l'angiogenesi e l'invasione tumorale.

Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC)

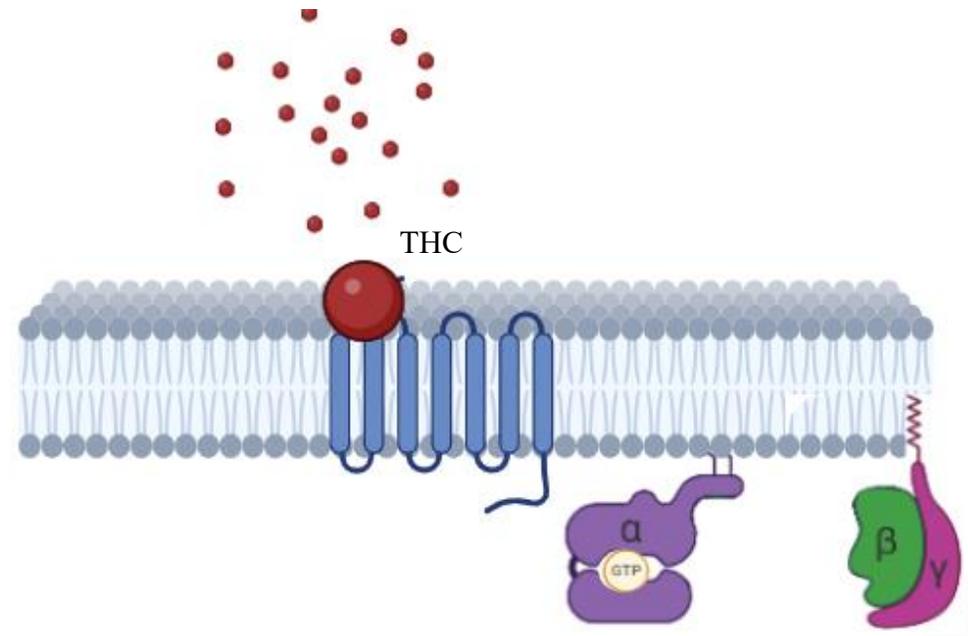
- È responsabile dell'attività psicotropa riscontrata durante l'assunzione di cannabis.
- Agisce legandosi ai recettori cannabinoidi CB1 e CB2, i quali appartengono alla famiglia dei GPCR.

GPCR

Forma inattiva



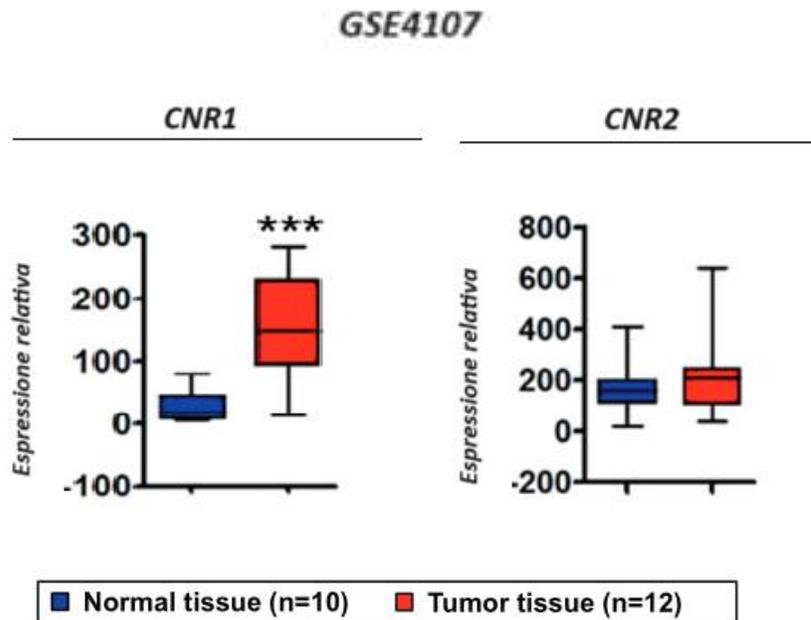
Forma attiva



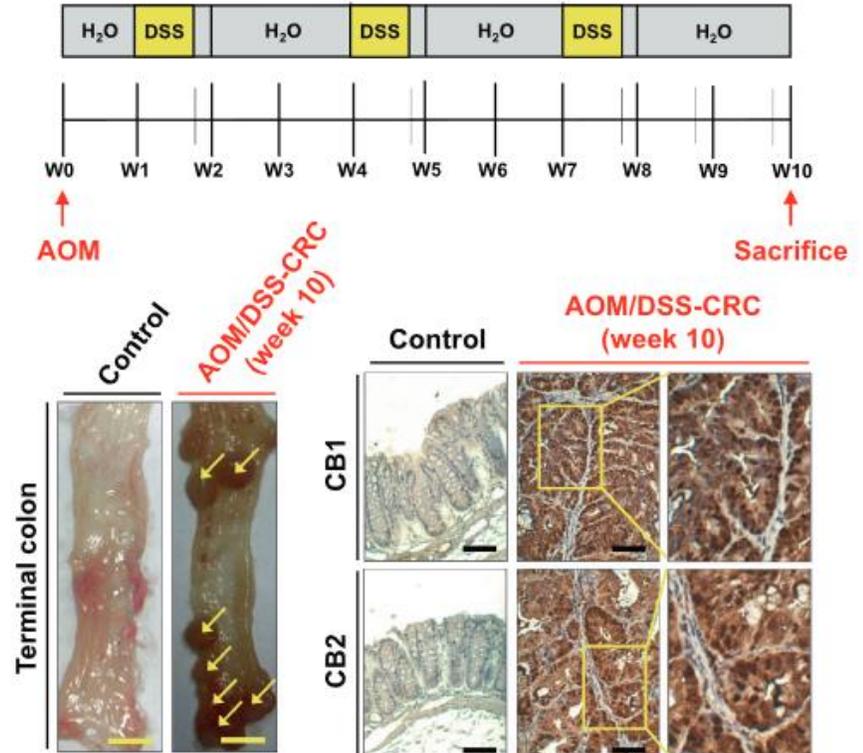
Risultati

Espressione di CB1 e CB2 nell'immagine indicati come CNR1 e CNR2 in tessuti umani sani e tessuti di pazienti affetti da CRC.

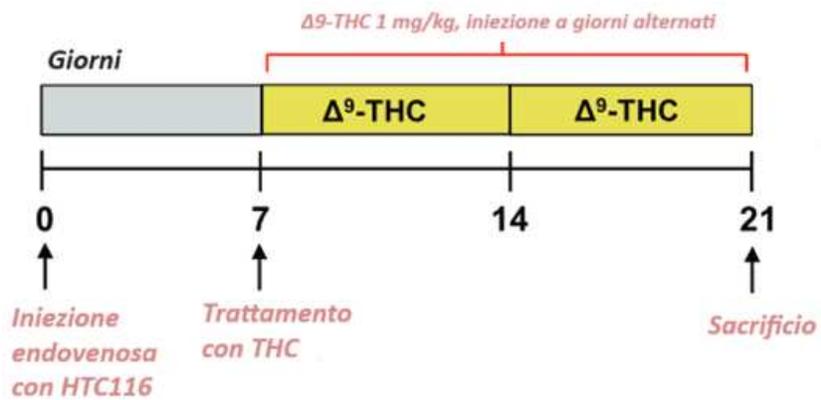
I risultati mostrano come i livelli dei recettori aumentano in condizioni tumorigeniche.



Analisi immunohistochimica di CB1 e CB2 in modelli murini con CRC indotto da AOM/ DSS.



L'espressione di CB1 e CB2 nel CRC metastatico, è stata valutata su linee cellulari umane di CRC (HCT116). E' stato valutato il ruolo del Δ^9 -THC sul tumore al colon-retto e sull'insorgenza delle metastasi.

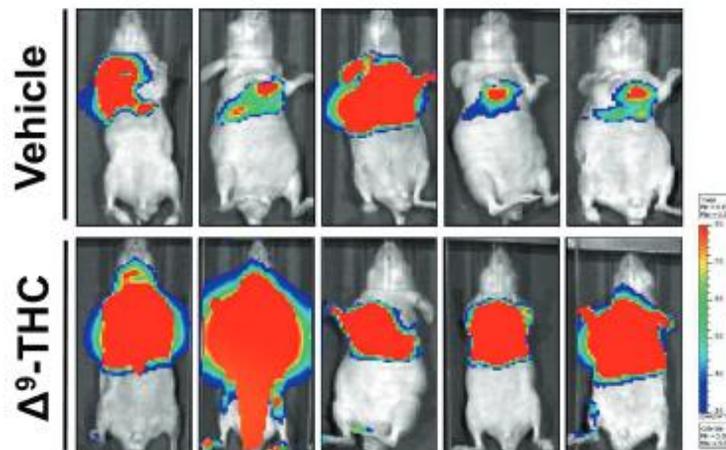


Analisi IVIS

Riscontrato il fattore VEGF sovraespresso, \rightarrow angiogenesi

Metastasi ai polmoni

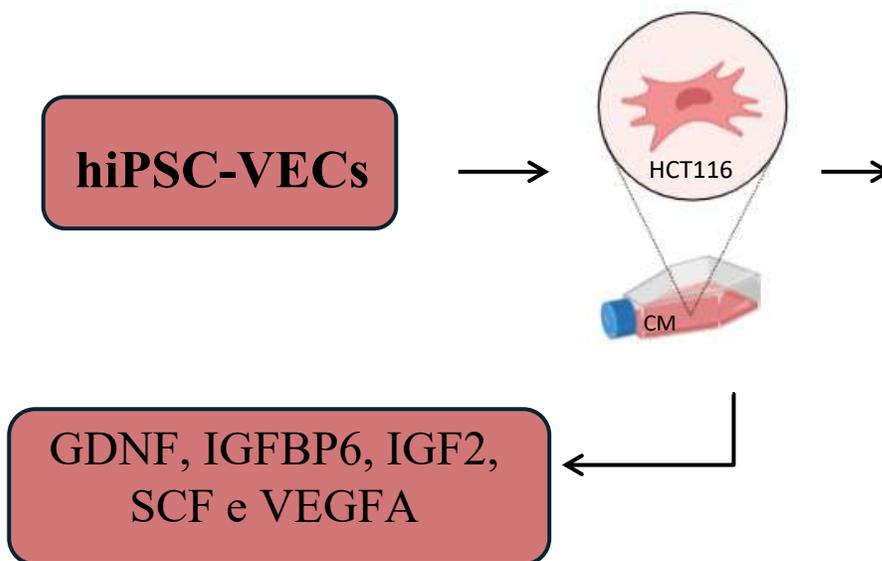
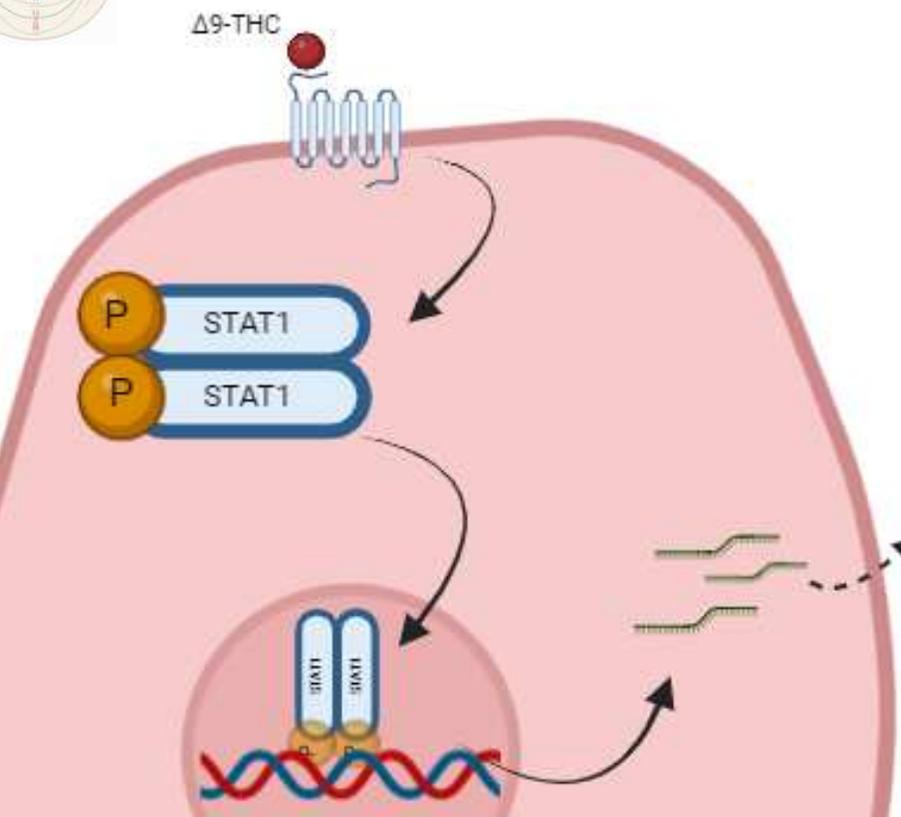
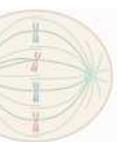
#1 #2 #3 #4 #5



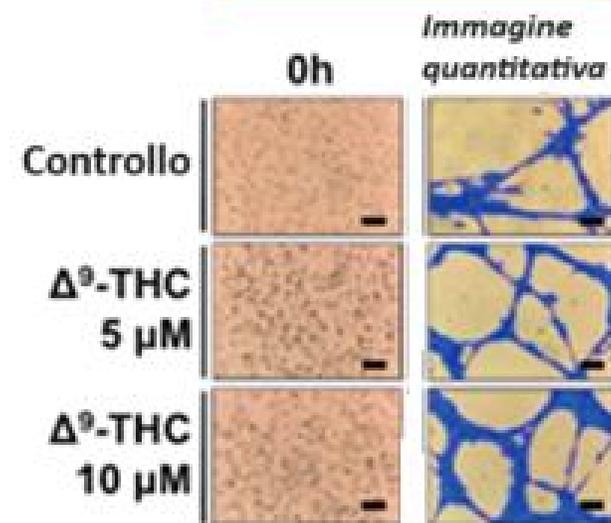
Modello xenotrapiantato con CRC (giorno 21)



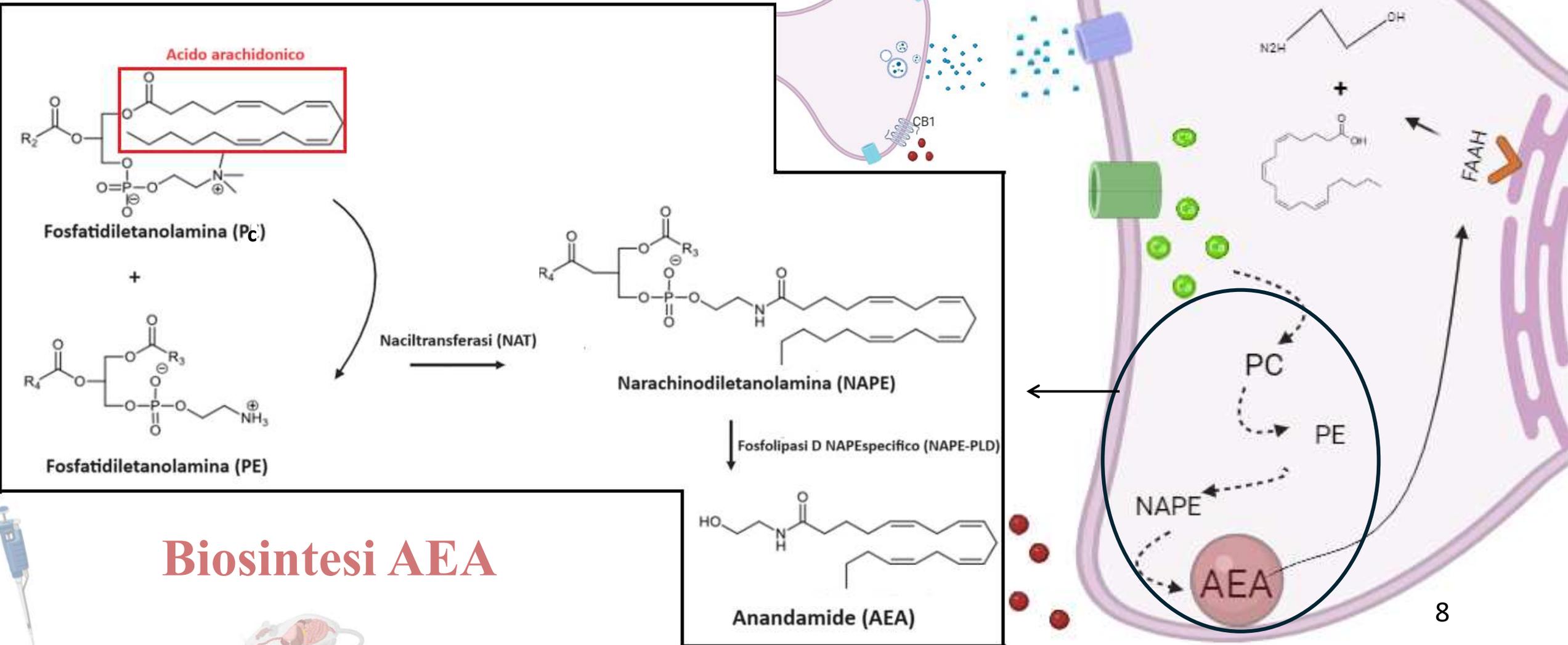
Valutazione degli effetti del Δ^9 -THC sulle hiPSC-VECs analizzando il mezzo di condizionamento (CM). Nel CM sono stati riscontrati **5 fattori di crescita** sovraregolati delle cellule HCT116. L'identificazione dei siti di legame dei fattori di trascrizione (TFBS) dei cinque fattori di crescita ha mostrato come il Δ^9 -THC non influenzasse i livelli di mRNA di 11 fattori di trascrizione ma inducesse **la traslocazione di STAT1** dal citoplasma al nucleo nelle cellule HCT116.



Formazione dei tubi

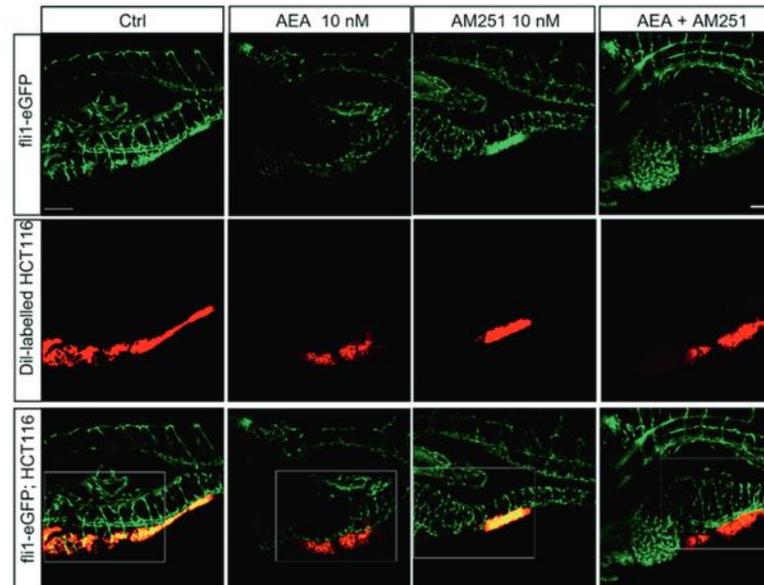
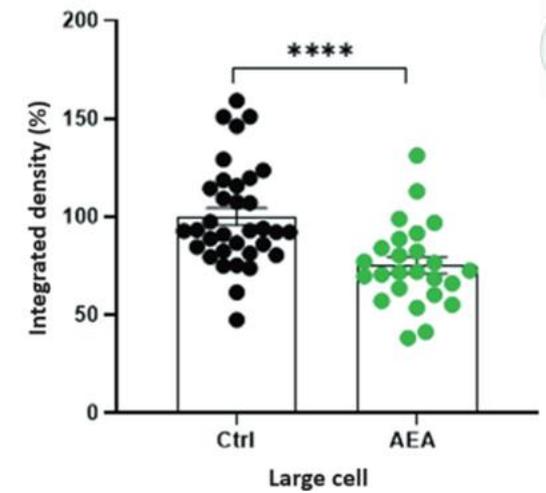
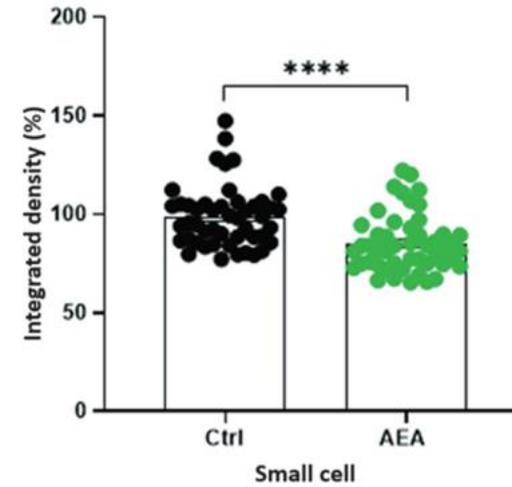
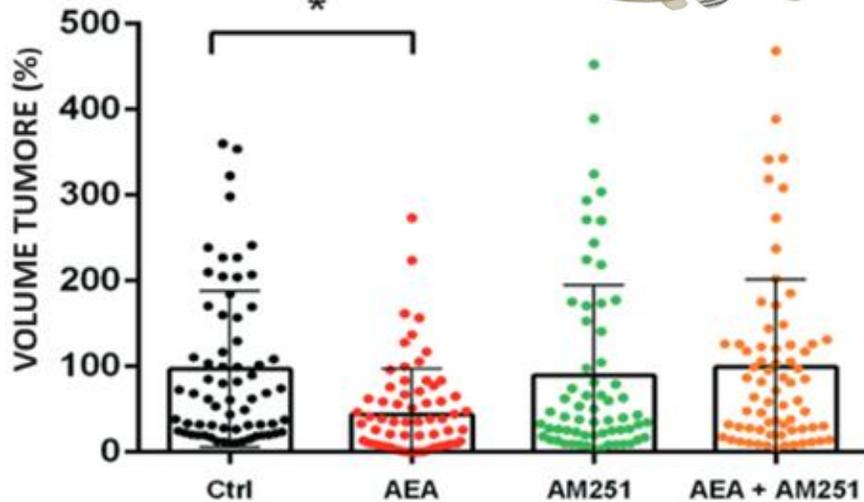


Anandamide (AEA)



Risultati

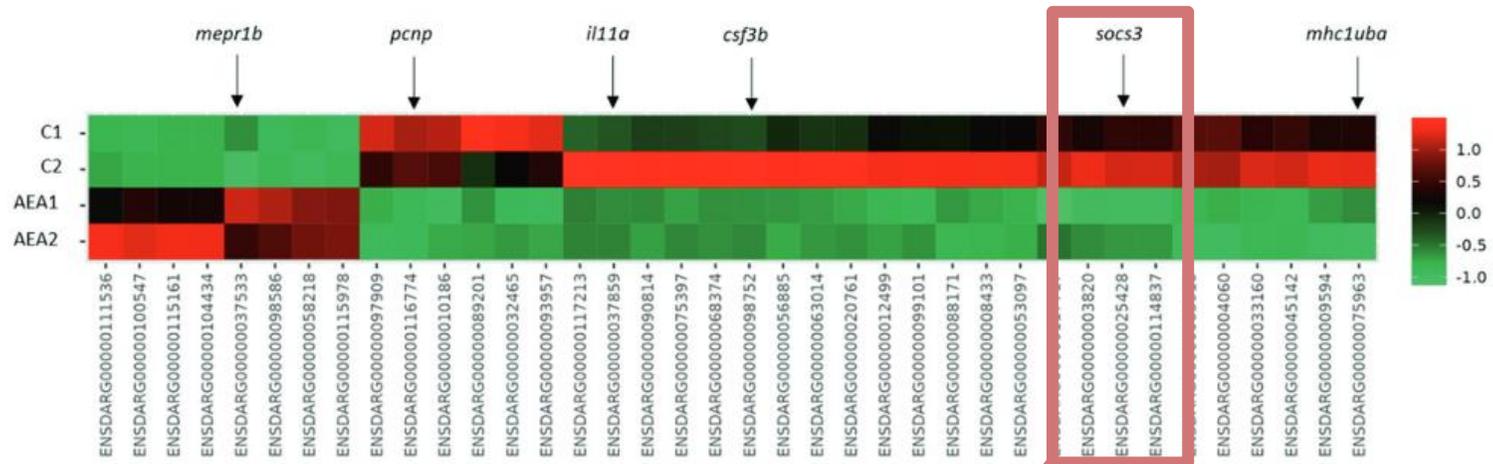
Cellule tumorali HCT116 iniettate in zebrafish. Valutazione del volume tumorale sotto l'azione dell' AEA, il suo agonista AM251 e l'associazione delle due molecole.



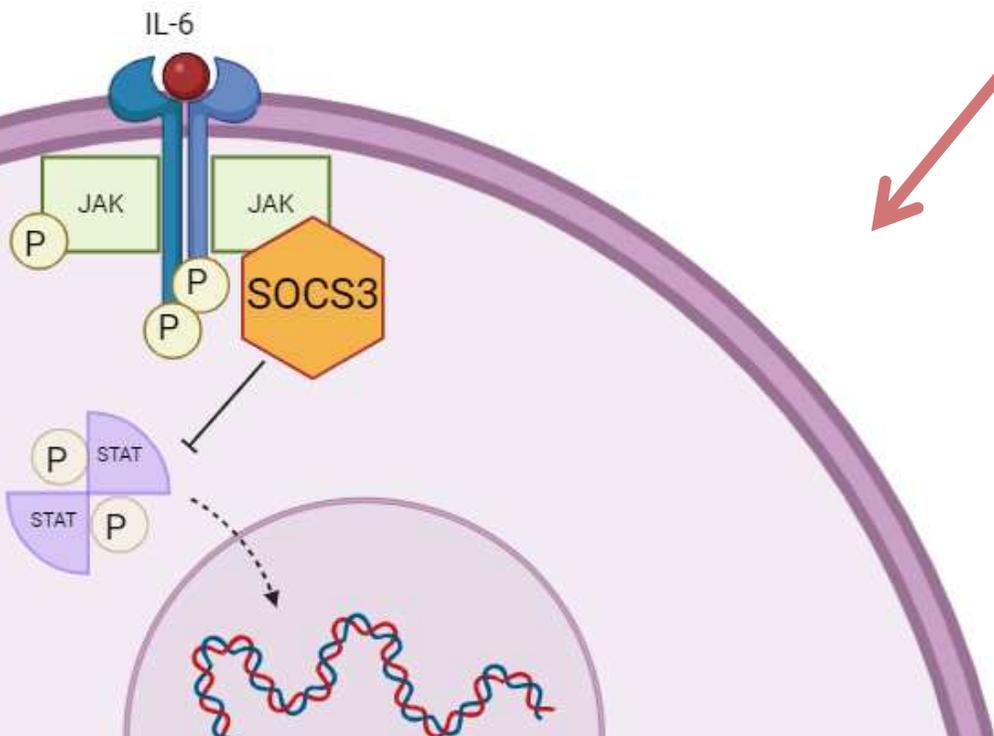
AEA riduce l'angiogenesi.

Il trattamento con AEA riduce la formazione di metastasi.

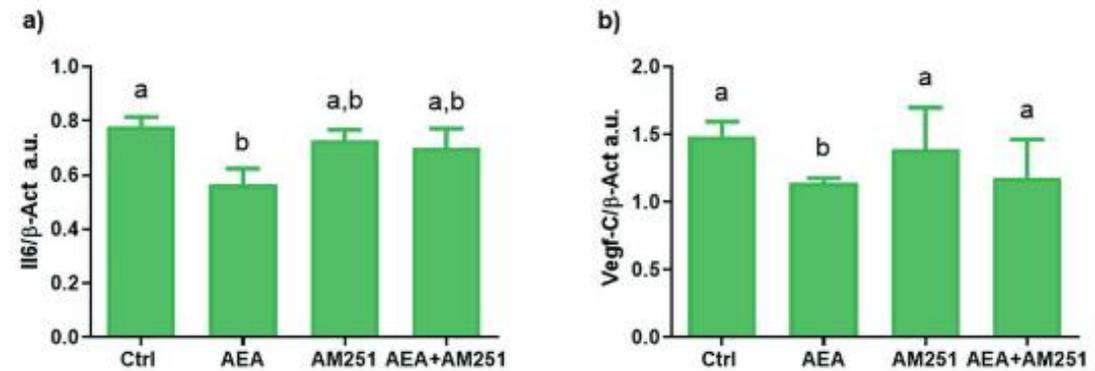
RNA-seq



L'analisi RNAseq e Western blot ha permesso l'identificazione di un insieme di trascritti e proteine che cooperano per la proliferazione delle cellule HCT116, ma ha anche permesso di riscontrare fattori che sotto l'effetto di AEA vengono sottoregolati al fine di limitare la crescita tumorale.



Western blot



Conclusioni

- Il $\Delta 9$ -tetraidrocannabinolo ($\Delta 9$ -THC) è stato associato alla promozione dell'angiogenesi e quindi alla crescita tumorale e alla formazione di metastasi.
- L'Anandamide (AEA) ha dimostrato di esercitare effetti opposti, riducendo il volume del tumore e influenzando negativamente fattori di trascrizione e proteici correlati all'angiogenesi.
- THC e AEA sembrano influenzare, anche se in maniera opposta, significativamente il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), le citochine, il fattore inibitorio della crescita delle cellule ematopoietiche (SOCS), e la via di segnalazione JAK/STAT e molti altri fattori.
- I risultati ottenuti offrono nuovi spunti per lo sviluppo di terapie antitumorali.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Bibliografia

Pagina 2

Colditz GA et al. Physical activity, obesity, and reduced risk of colon cancer: implication for prevention. *Cancer Causes Control* (1997); 8:649-667

Zaniboni A, Gennari L, Olmi P et al. I tumori del tratto gastroenterico. Masson (2003)

Pagina 4, 5, 6, 7:

Luo, Cong-Kai. «Cannabinoids Orchestrate Cross-Talk between Cancer Cells and Endothelial Cells in Colorectal Cancer», s.d.

(Pertwee et al. 2010)

(Progettazione e sintesi di modulatori allosterici del recettore cannabinoide CB1)

(Latorraca, Venkatakrishnan, e Dror 2017)

(«H. R. Bourne (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 134-142.pdf», s.d.)

(Shao et al. 2016)

Elena Butturini, Alessandra Carcereri De Prati, e Sofia Mariotto, «Redox Regulation of STAT1 and STAT3 Signaling», *International Journal of Molecular Sciences* 21, fasc. 19 (24 settembre 2020): 7034

Xiang Mao et al., «Structural Bases of Unphosphorylated STAT1 Association and Receptor Binding», *Molecular Cell* 17, fasc. 6 (marzo 2005): 761–71,.

Pagina 8, 9, 10:

Francesca Maradonna et al., «A Zebrafish HCT116 Xenograft Model to Predict Anandamide Outcomes on Colorectal Cancer», *Cell Death & Disease* 13, fasc. 12 (23 dicembre 2022): 1069,

Yu Gao et al., «The Roles of SOCS 3 and STAT 3 in Bacterial Infection and Inflammatory Diseases», *Scandinavian Journal of Immunology* 88, fasc. 6 (dicembre 2018): e12727,

Stefano A Pileri, «LIVELLI SIERICI DI VEGF, IL-6, TNF-ALPHA E b-FGF IN PAZIENTI AFFETTI DA MIELOMA MULTIPLA ALLA DIAGNOSI ARRUIOLATI NEL PROTOCOLLO CLINICO BOLOGNA 2002», s.d.

BCL-2 expression is mainly regulated by JAK/STAT3 pathway in human CD34⁺ hematopoietic cells

Potenziale attività terapeutica degli inibitori della MAGL, enzima del sistema endocannabinoide

Riassunto

La ricerca effettuata si è soffermata su alcuni fattori che si è visto possono regolare l'insorgenza del cancro al colon retto, l'Anandamide e il THC (tetraidrocannabinolo). Essi sono due composti strettamente legati che agiscono sul sistema endocannabinoide del corpo umano. L'Anandamide è un endocannabinoide ovvero un cannabinoide prodotto dal corpo stesso. Il THC, d'altra parte, è un fitocannabinoide trovato nella pianta di cannabis. Entrambi l'Anandamide e il THC si legano ai recettori cannabinoidi CB1 e CB2 nel corpo umano, influenzando una serie di processi fisiologici e biochimici.

Nello studio del THC i recettori CB1 e CB2 sono stati mostrati essere sovraespressi sulle cellule tumorali rispetto alle cellule normali in vari tipi di cancro. In questo studio, si è indagato il ruolo dei cannabinoidi nella progressione del cancro colon-rettale (CRC) e identificato i possibili meccanismi molecolari attraverso cui si verificano questi effetti. È stata riscontrata un'iperespressione dei recettori CB1 e CB2 nei pazienti con cancro colon-rettale, nei modelli murini di CRC indotti da azoximetano/solfato di sodio di dextrano (AOM/DSS) e nei modelli murini di metastasi del CRC. Dai risultati ottenuti, si è rilevato anche un aumento dei livelli di VEGF, ciò induce angiogenesi e promuove la metastatizzazione che è stata valutata andando a determinare l'effetto che il mezzo di condizionamento ha sulle hiPSC-Ecs.

Al contrario del THC, l'Anandamide si è visto vada a diminuire il volume tumorale e soprattutto vada a ostacolare l'angiogenesi andando ad agire sulle vie IL-6 JAK/STAT, così da non permettere la trascrizione di fattori angiogenici (es. VEGF). Per valutare gli effetti di AEA si sono iniettate cellule HCT116 nella vena di Cuvier degli zebrafish, i quali sono stati trattati con AEA e AM251 il suo agonista. Dal sequenziamento del RNA sono stati riscontrati geni espressi differenzialmente (DEGs) nelle larve trattate con AEA e nelle larve trattate con AEA + AM251. Ulteriori analisi come la Western blot delle proteine Vegf-C e Il6, ha rivelato una significativa riduzione nei xenotrapianti esposti all'AEA. I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che l'AEA, mediante la downregulation di alcuni mRNA, possano contribuire alla diminuzione delle proteine Il6 e Vegf trovate nei xenotrapianti esposti all'AEA. In particolar modo tra i vari trascritti valutati ci si è soffermati su socs3 il quale sembra intervenire nella via IL-6 JAK/STAT, andando a regolarne la trascrizione.