

PREMIO “PROF. ANTONIO LLOMBART RODRIGUEZ-FINCIVO”
de la Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana

***EPDR1* overexpression in human colorectal cancer is related to
staging and favours cell proliferation and invasivity**

Dra. Josefa Castillo Aliaga

Universitat de València

Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

CÁNCER COLORRECTAL



- El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más común en el mundo y la cuarta causa de muerte relacionada con cáncer.
- **Aumento progresivo de la supervivencia de los pacientes en las últimas décadas:**
 - ✓ Prevención
 - ✓ Programas de cribado
 - ✓ **Mejora en los tratamientos por mejor comprensión de los aspectos biológicos de la enfermedad: Investigación**

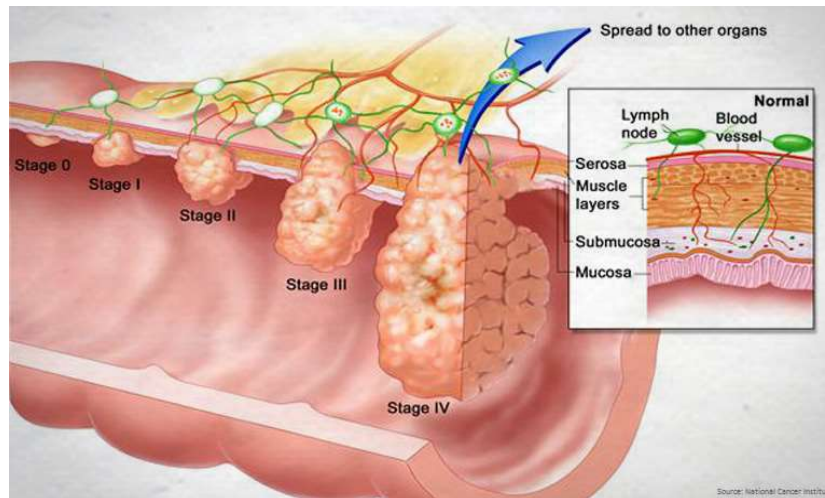
Supervivencia de paciente con CCR metastásico: 5 meses (antes del 2000) a >30 meses (actualidad)



Cuestiones por resolver: Resistencia a tratamientos y Metástasis

CLASIFICACIÓN TNM POR ESTADIOS DEL CCR (UICC; AJCC)

Trata de ordenar el CCR en función de su grado de malignidad: en base a tres parámetros, T, N y M, los tumores se clasifican en cuatro estadios (I,II,III,IV)



T: Grado de infiltración local del tumor
N: Número de nódulos linfáticos afectados
M: Metástasis

Estadio I: el tumor ha atravesado la mucosa invadiendo la capa muscular del colon o recto

Estadio II: el tumor atraviesa la pared del colon o recto.

Estadio III: afectación tumoral de los ganglios linfáticos.

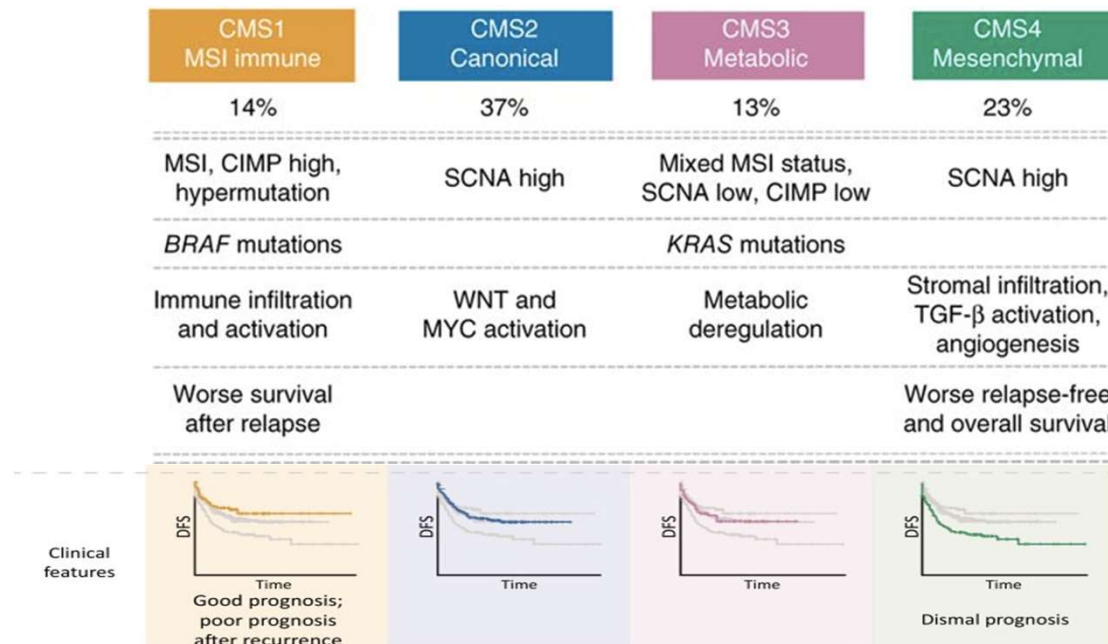
Estadio IV: el tumor se ha diseminado a otros órganos.

- Capacidad pronóstica limitada, en particular en la etapa metastásica
- Respuesta al tratamiento difícil de predecir

CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR

(Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer (CRCSC); Nat Med. 2015)

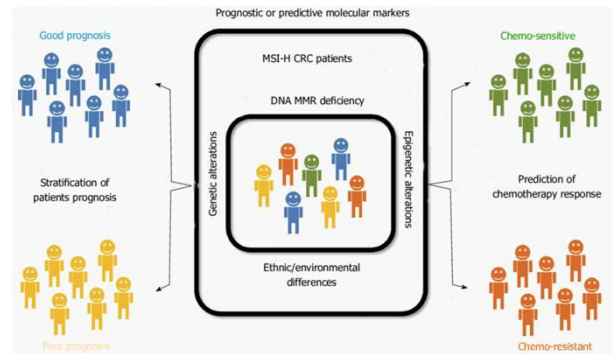
Objetivo: Identificar **firmas moleculares** que se puedan aplicar en la clínica para el tratamiento personalizado del paciente con cáncer.



- ✓ Clasifica en 4 subtipos moleculares identificados según sus patrones de expresión génica.
- ✓ Integra datos de mutaciones, número de copias, metilación, microRNA y proteómica.
- ✓ Se correlaciona con la supervivencia de los pacientes.

➤ *Un número importante de tumores no encaja en ninguno de estos subtipos por lo que el consenso debe ser revisado*

EL CÁNCER COLORRECTAL ES UN ENFERMEDAD HETEROGÉNEA



IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES MOLECULARES

- Mejorar la clasificación de los tumores para seleccionar el tratamiento más adecuado
- Predecir la capacidad invasiva de un tumor
- Dianas accionables en cáncer colorrectal



MEDICINA PERSONALIZADA/DE PRECISIÓN

ANTECEDENTES

ONCOLOGY REPORTS 36: 3627-3634, 2016

***In silico* RNA-seq and experimental analyses reveal the differential expression and splicing of *EPDR1* and *ZNF518B* genes in relation to *KRAS* mutations in colorectal cancer cells**

ÁNGELA L. RIFFO-CAMPOS^{1,3}, JOSEFA CASTILLO², AZAHARA VALLET-SÁNCHEZ^{1,2}, GUILLERMO AYALA⁴,
ANDRÉS CERVANTES^{2,5}, GERARDO LÓPEZ-RODAS^{1,2} and LUIS FRANCO^{1,2}



EPDR1 SE EXPRESA DIFERENCIALMENTE EN LÍNEAS CELULARES DE CCR EN RELACIÓN A LA MUTACIÓN EN KRAS

Cancer Letters 165 (2001) 71-79

The novel endymin related gene *UCCI* is highly expressed in colorectal tumor cells

Inko Nimmrich^{a,1}, Silke Erdmann^{b,1}, Ute Melchers^{a,1}, Slava Chtarbova^a, Ulrich Finke^c,
Sebastian Hentsch^d, Ingrid Hoffmann^a, Martin Oertel^e,
Werner Hoffmann^{e,2}, Oliver Müller^{a,*}



SE SOBREEXPRESA EN CCR (EN 2 DE 3 MUESTRAS DE PACIENTES Y EN LÍNEAS CELULARES DE CCR).

HOMOLOGÍA DE SECUENCIA CON EPENDIMINAS PROTEINAS CON PROPIEDADES ANTI-ADHESIVAS

Journal of Dermatological Science 83 (2016) 131-137

Dupuytren's disease susceptibility gene, *EPDR1*, is involved in myofibroblast contractility

Kim A. Staats^a, Timothy Wu^a, Bing S. Gan^{b,c}, David B. O'Gorman^{b,c}, Roel A. Ophoff^{a,d,e,*}

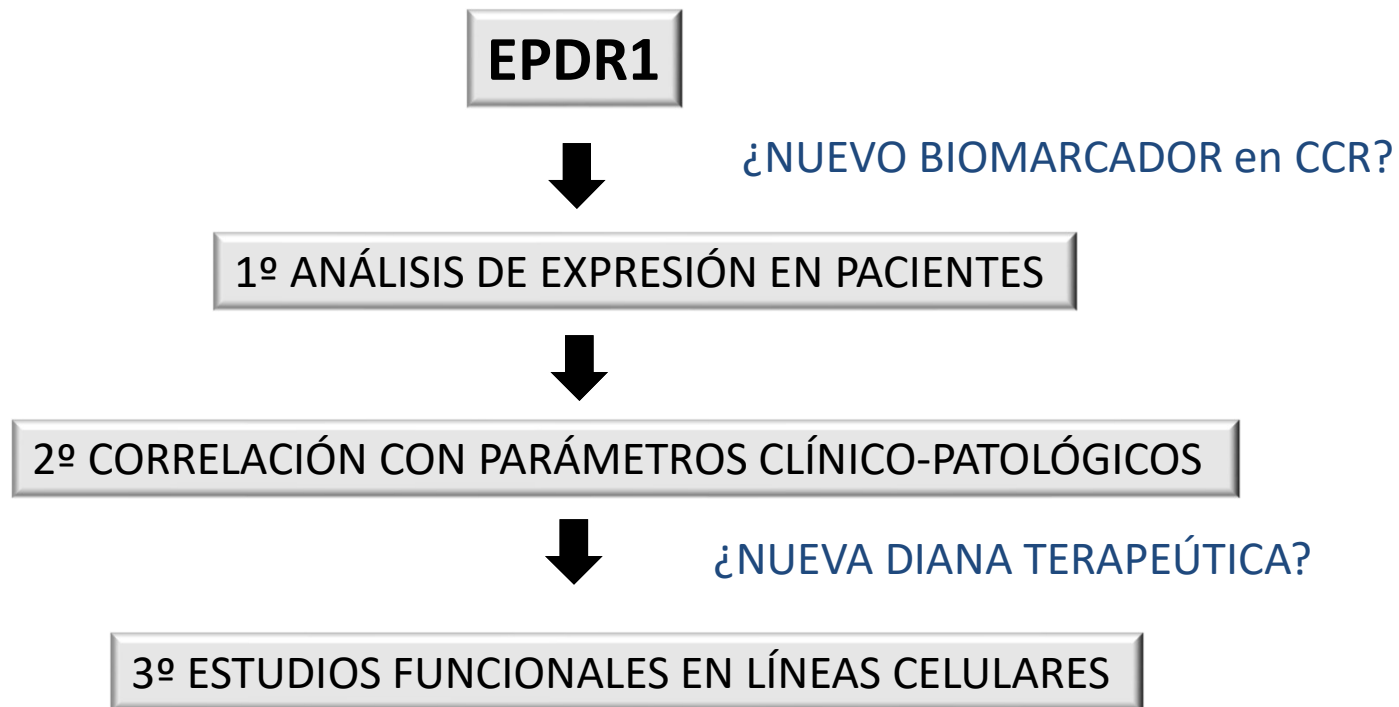


PATOLOGÍAS ASOCIADAS A DISFUNCIÓN EN ADHESIÓN CELULAR

HIPÓTESIS

EPDR1 PODRÍA TENER UN PAPEL EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL PROPORCIONANDO A LAS CÉLULAS QUE LO SOBREENPRESAN UN FENOTIPO MÁS INVASIVO

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO



METODOLOGÍA

1.- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE EDPR1 EN MUESTRAS DE PACIENTES

DIFERENTES COHORTES DE PACIENTES (RT-qPCR)

Cohorte de 43 pacientes: cDNA Tissue array” de Origene

Cohorte de 101 pacientes del Hospital Clínico de Valencia

IN SILICO EN DIFERENTES BASES DE DATOS. Muestras pareadas T/NT

Base de datos pública del TCGA (cohorte de 50 pacientes)

Base de datos pública de Kim et al., 2014 (cohorte de 36 pacientes)

2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO: **MODELO DE REGRESIÓN MÚLTIPLE**

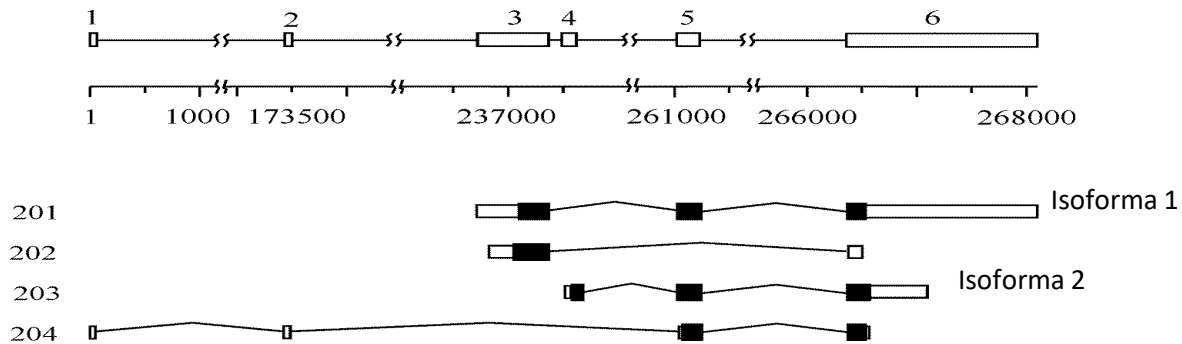
3.- ESTUDIOS DE **METILACIÓN DEL DNA** DEL GEN EPDR1 EN LÍNEAS CELULARES CCR

4.- ENSAYOS FUNCIONALES EN DOS LÍNEAS DE CCR: HCT116 y DLD1

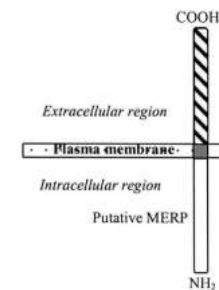
SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE **siRNAs**

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN, INVASIÓN Y ADHESIÓN

EPDR1 (Ependymin-related gene)



C.C. Gregorio-King et al. / Gene

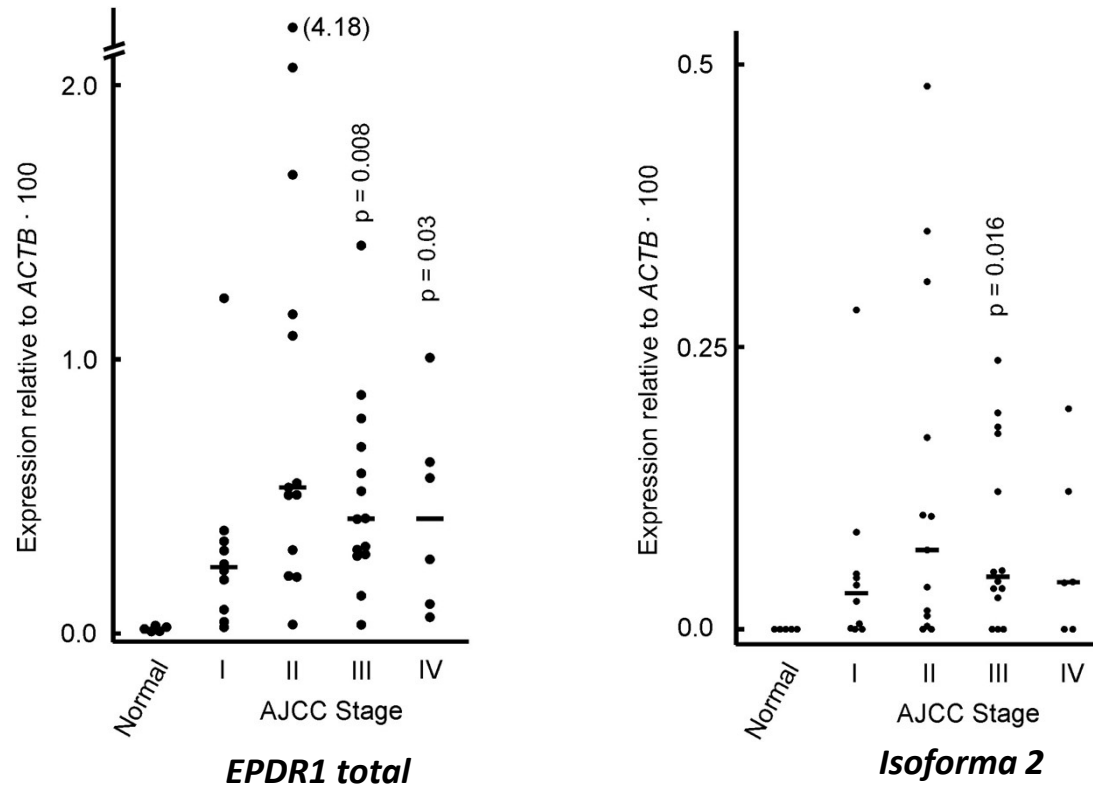


- Gen EPDR1 situado en el cromosoma 7
- Por ayuste alternativo se producen 4 isoformas.
- La isoforma 1, canónica, es mayoritaria. Codifica una proteína transmembrana tipo II similar a proteínas de adhesión: Ependiminas y Protocadherinas.
- La isoforma 2 difiere en su extremo N-terminal y por tanto no expresa el dominio transmembrana. Su expresión es muy baja pero se detecta en CCR.

EPDR1 es una proteína de función desconocida

Expresión de EPDR1: “cDNA Tissue array” de Origene

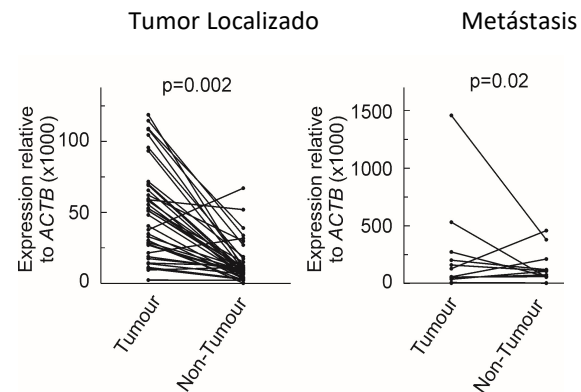
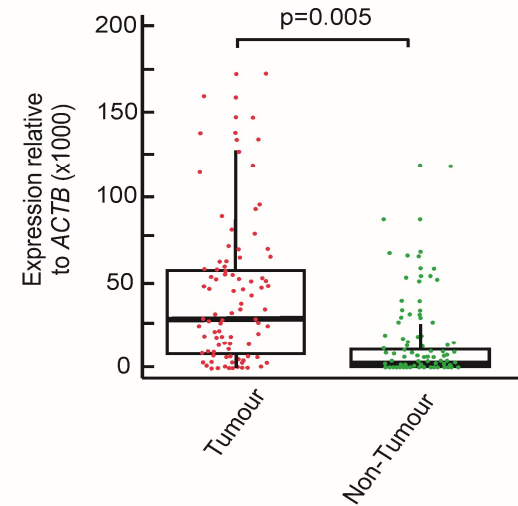
Total de 43 muestras: 5 normales, 38 tumorales de diferentes estadios



- ✓ ***EPDR1 se sobreexpresa en tumores de pacientes con cáncer colorrectal***
- ✓ ***La expresión de la isoforma 2 de EPDR1 en pacientes es muy baja y diferencia dos subgrupos de pacientes: de expresión indetectable o detectable***

Expresión de EPDR1 en una cohorte de 101 pacientes del Hospital Clínico

Patients' characteristics n (%)	
Median Age	73 (range 37-96)
Sex	Male 61 (60.3%)
	Female 40 (39.6%)
T stage	T1 9 (8.9 %)
	T2 17 (16.8%)
	T3 30 (29.7%)
	T4 26 (25.7%)
	nd 19 (18.8%)
N stage	N0 47 (46.5%)
	N1 22 (21.8%)
	N2 13 (12.9%)
	nd 19 (18.8%)
M stage	M0 82 (81.2%)
	M1 19 (18.8%)
AJCC Stage	I 12 (11.9%)
	II 35 (34.7%)
	III 35 (34.7%)
	IV 19 (18.8%)
Vascular invasion	Yes 35 (34.7%)
	No 56 (55.4%)
	nd 10 (9.9%)
Peritoneal invasion	Yes 30 (29.7%)
	No 61 (60.4%)
	nd 10 (9.9%)



- ✓ ***EPDR1 se sobreexpresa en tumores de pacientes con cáncer colorrectal***
- ✓ ***Mayor expresión en Tumor respecto a No Tumor en muestras pareadas***

DEPENDENCIA DE LA DIFERENCIA DE EXPRESIÓN DE EPDR1 CON PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS MODELO DE REGRESIÓN MÚLTIPLE

Parameters	Expression difference	Model p-value	Global p-value
T	T1	36,457	
	T2	171,332	0,9292
	T3	45,833	0,0014
	T4	26,697	0,0005
N	N0	44,437	
	N1	95,265	0,0148
	N2	80,234	0,0113
M	M0	33,084	
	M1	206,376	0,0066
AJCC	I	40,776	
	II	28,839	0,0003
	III	31,172	0,5734
	IV	206,376	NA*

✓ **Aumento de la expresión de EPDR1 en Tumor vs No tumor dependiente del parámetro T, N y M, así como del estadio.**

Análisis “in silico” de la expresión de EPDR1

Base de datos pública del TCGA (The Cancer Genome Atlas)

Cohort	No. of patients	FC*	P-value
All the patients	50	1.705	$3.631 \cdot 10^{-5}$
Stage I	8	1.421	0.328
Stage II	24	1.614	0.0068
Stage III	9	2.645	0.0038
Stage IV	9	1.743	0.0176

- ✓ La expresión de EPDR1 es significativamente mayor en muestras pareadas T/NT del TCGA en estadíos II, III y IV.

Base de datos pública de Kim et al., 2014

: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/218851>).

Paired samples	No. of patients	FC*	P-value
Primary tumour <i>vs</i> normal mucosa	18	2.150	$7.99 \cdot 10^{-5}$
Metastasis <i>vs</i> normal colonic mucosa	18	2.518	$4.04 \cdot 10^{-6}$

- ✓ La expresión de EPDR1 es significativamente mayor en T/NT tanto en tumor localizado como en metástasis.

LA EXPRESIÓN DE EPDR1 ESTÁ DESREGULADA EN CÁNCER COLORRECTAL Y SU SOBREENPRESIÓN SE CORRELACIONA CON PARAMETROS DE INTERÉS CLÍNICO

Pacientes

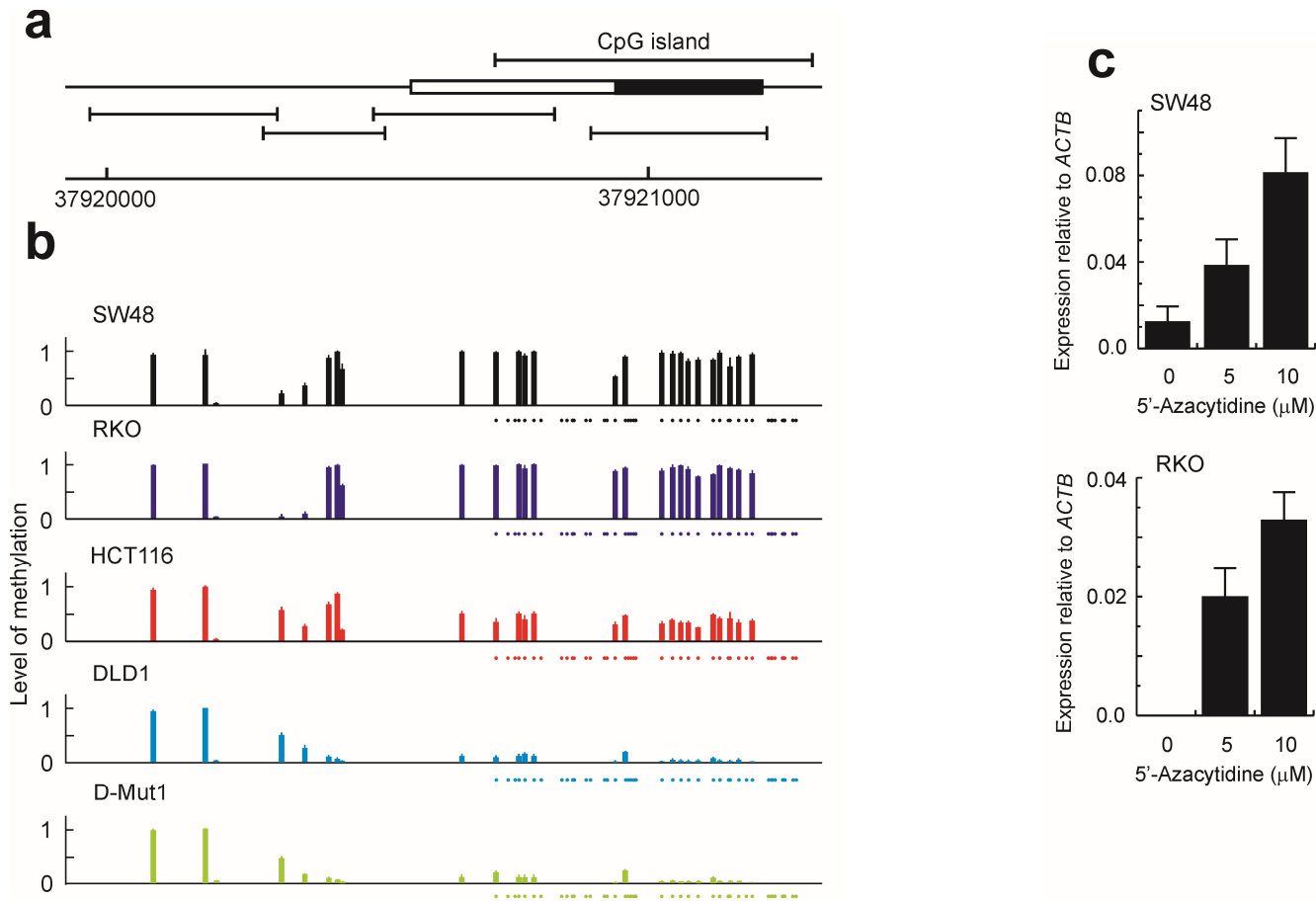


Líneas celulares

QUÉ MECANISMOS PODRÍAN ESTAR IMPLICADOS EN LA SOBREENPRESIÓN DE EPDR1 EN CCR

QUÉ PAPEL JUEGA EPDR1 EN LA MALIGNIDAD TUMORAL

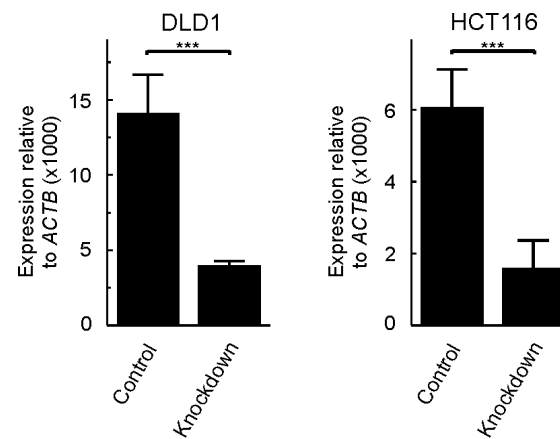
Estudio de la Regulación Epigenética de EPDR1 en líneas CCR



✓ **La expresión de EPDR1 se regula por Metilación del DNA en líneas de CCR**

ESTUDIOS FUNCIONALES EN LÍNEAS CELULARES *IN VITRO*

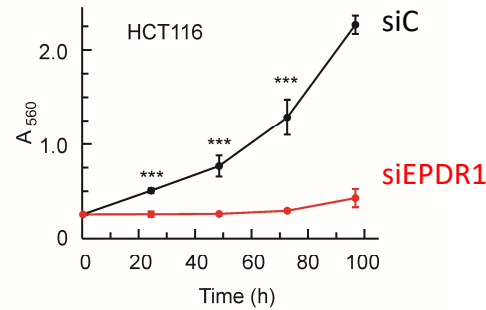
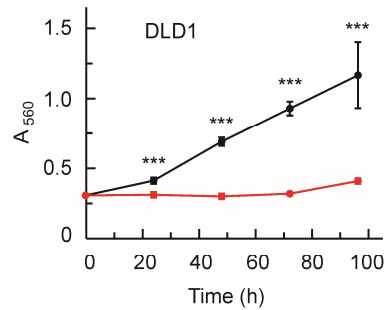
Silenciamiento de EPDR1 con siRNAs en las líneas de CCR: DLD1 Y HCT116



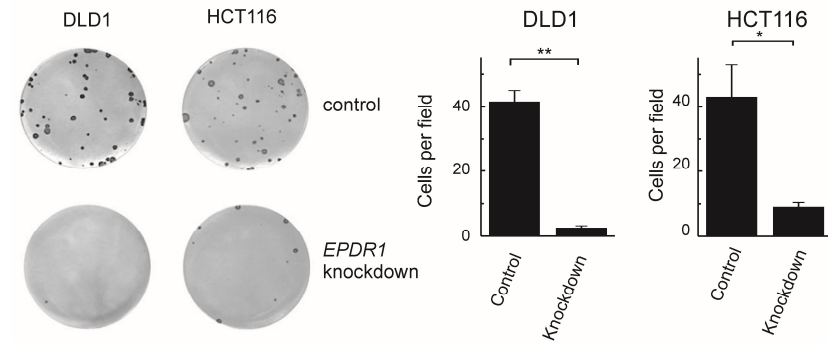
Comprobamos que la reducción de expresión de EPDR1 es > 70%

Ensayos de silenciamiento con siRNAs en HCT116 y DLD1

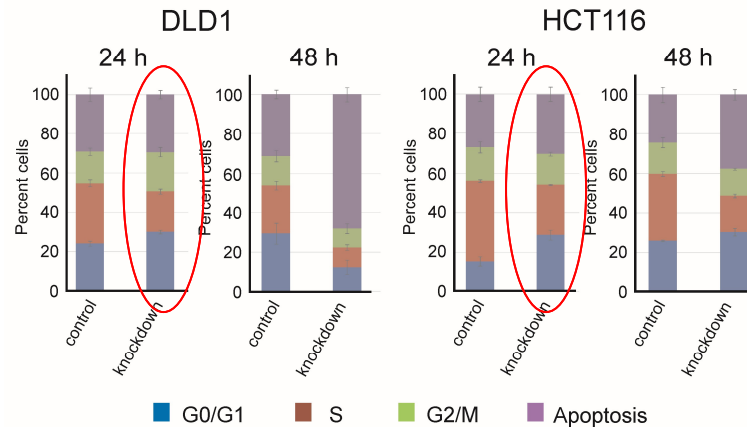
MTT assay of cell proliferation



Colony formation assays



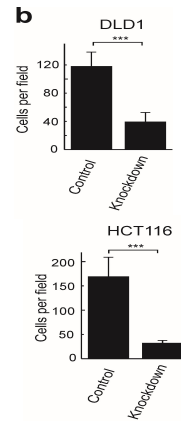
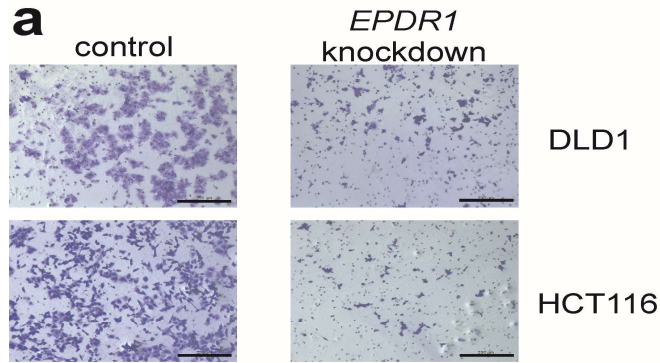
Flow-cytometry cell cycle analysis



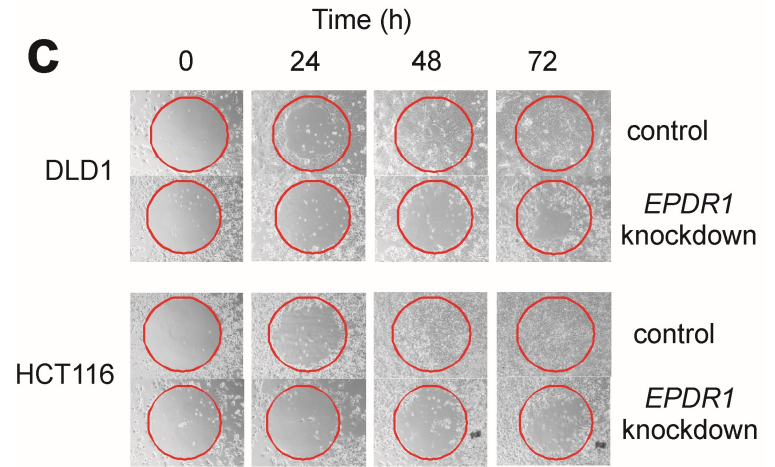
✓ EPDR1 aumenta la proliferación celular en líneas de CCR

Ensayos de silenciamiento con siRNAs en HCT116 y DLD1

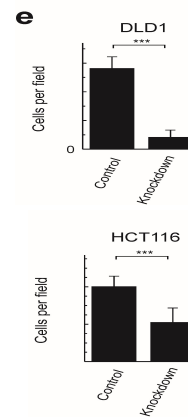
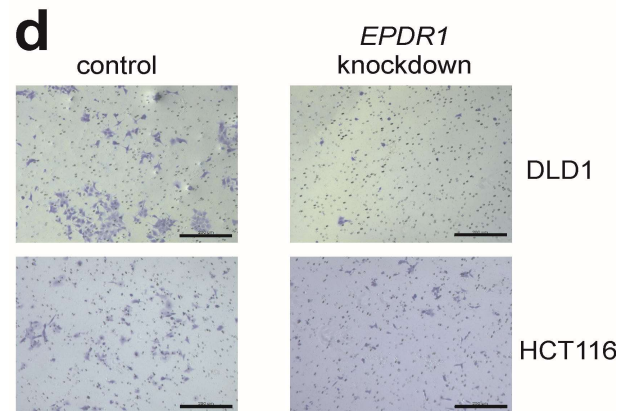
Transwell migration assay



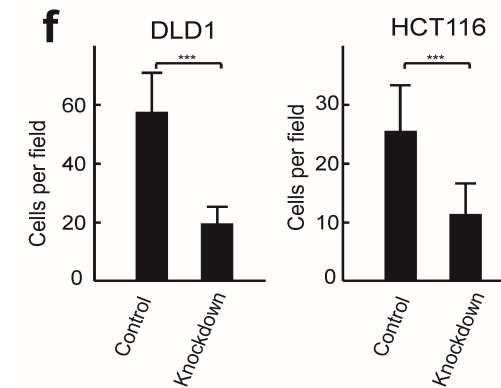
Wound-Healing assay



Transwell Invasion assay



Adhesion of cells to type I collagen-coated plates



✓ EPDR1 promueve la migración, la invasión y la adhesión a colágeno I en líneas de CCR

CONCLUSIONES

- EPDR1 se sobreexpresa en cáncer colorrectal
- La sobreexpresión de EPDR1 se correlaciona con el grado de infiltración local del tumor, con metástasis y con el número de nódulos linfáticos afectados.
- Los resultados *in vitro* corroboran el papel de EDPR1 en crecimiento tumoral y en la diseminación de las células de cáncer que lo sobreexpresan.

EPDR1 PODRÍA TENER UN PAPEL RELEVANTE EN **CÁNCER COLORRECTAL**,
COMO UN NUEVO **BIOMARCADOR** PARA LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR
Y UNA NUEVA **DIANA TERAPEÚTICA** ACCIONABLE

AGRADECIMIENTOS



Investigadores Básicos

Luís Franco

Paco Gimeno

Gerardo López

Ángela Riffo

Guillermo Ayala

Maribel Rodrigo

Lab Organoides!

Fernanda, Federica,
Zahara, Fany, Manuel,
Marta

TEAMWORK, COMPROMISE, RESEARCH

Investigadores Clínicos

Andrés Cervantes

Valentina Gambardella

Noelia Tarazona

Marisol Huerta

Carolina Martínez

Tania Fleitas

Desamparados Roda

A Mi Familia, Mi Madre, A Javi, Xavi y Lola