



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Programa de Medicina 260S-RD778/98

“Estudio de acetilación de proteínas en
líneas celulares humanas de cáncer
colorectal *KRAS* mutado y salvaje”

Tesis doctoral presentada por:

Desamparados Roda Pérez

Directores:

Prof. Rosa Zaragoza Colom

Prof. Elena Ruiz y Garcia-Trevijano

Prof. Andrés Cervantes Ruiperez



Dr. Andrés Cervantes Ruiperez, Profesor titular del Dpto de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dra. Rosa Zaragoza Colom, Profesor ayudante del Dpto de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dra. Elena Ruiz y Garcia-Trevijano, Profesora titular del Dpto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que D^a Desamparados Roda Perez, Licenciada en Medicina por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección la presente tesis titulada:

“Estudio de la acetilación de proteínas en líneas celulares humanas de cáncer colorectal *KRAS* mutado y salvaje”

para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia, Y para que así conste, firman la presente en Valencia a 28 de Octubre de 2015.

Fdo. Prof A. Cervantes Ruiperez Fdo. Prof. Rosa Zaragoza Colom

Fdo. Prof. Elena Ruiz y Garcia-Trevijano

El trabajo experimental de esta tesis ha sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (FIS PI09/02480 Y PI12/02767 a A. Cervantes y FIS PI12/023494 a E. R. Garcia-Trevijano) y por la Generalitat Valenciana (PROMETEO 2013-005 a A. Cervantes).

Desamparados Roda ha disfrutado de un contrato de investigación en formación Río Hortega, financiado por el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación.

AGRADECIMIENTOS:

Primero y fundamentalmente a mis dos directoras de tesis, Rosa y Elena, por hacer esto posible en todos los sentidos, y llevar el proyecto a buen puerto desde el principio al final.

Muchiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiisimas GRACIASSSSSS!!!!!!!

No creo que las palabras sean la mejor manera de agradecerlo, pero de todas formas ahí quedan BIEN GRANDES.

A Andrés mi tercer director de tesis, por su apoyo incondicional que ha demostrado a lo largo del tiempo y por enseñarme el camino.

A Sergio por su infinita paciencia y amor. Y a toda mi familia por su cariño y comprensión.

A Ana Lluch por su guiarme y estar siempre ahí cuando la necesitas.

A Juan Viña por su paciencia y apoyo.

A Concha, Ivan y Teresa por su ayuda y ratos de risas.

Ana Bosch todavía tengo la esperanza de que vuelvas..

A Josefa por su ayuda y trabajo para finalizar la tesis

Y por todos aquellos que me han acompañado en el camino
estos años. Muchas gracias!!

ÍNDICE

INDICE.....
..... 12

ABREVIATURAS.....
.....21

INTRODUCCIÓN

I. Prevalencia y epidemiología del cáncer colorectal..... 19

II. Patogénesis y bases moleculares del CCR..... 22

 II.1. Factores de riesgo no genéticos..... 24

 II.2 Modelos moleculares de carcinogénesis del CCR... 25

 II.2.1. Modelo de inestabilidad cromosómica o vía
 clásica..... 26

 II.2.2. Fenotipo hipermetilador (CIMP). 29

 II.2.3. Clasificación molecular basada en la
 secuenciación..... 30

III. La evolución en el tratamiento del CCR. 32

 III.1. Agentes quimioterápicos en tratamiento adyuvante.
 35

 III.2. Terapias dirigidas anti-EGFR..... 36

III.3. Otros fármacos dirigidos contra una diana molecular específica.....	38
IV. Vía de EGFR y su relación con la carcinogénesis.....	40
IV.1. Receptor de EGF.	40
IV.2. Ligandos de EGFR.....	41
IV.3. Principales vías de respuesta a EGF.....	42
IV.3.1. Vía de las MAPKs: KRAS-RAF- ERK.....	46
IV.3.2. Vía de PI3K-AKT-mTOR.....	48
IV.3.3 Entrecruzamiento de vías de señalización RAS-RAF-ERK y PI3K-AKT-mTOR.....	50
IV.4. Mutaciones en KRAS y respuesta a tratamientos anti-EGFR.....	52
IV.4.1. Tipos de mutaciones en KRAS.....	52
IV.4.2. Prevalencia de las mutaciones en KRAS.	54
IV.4.3. Las mutaciones de KRAS en CCR y las terapias anti-EGFR.	56
V.1. Papel de las KAT/KDAC en CCR.....	63
V.2. Papel de las KAT/KDAC sobre proteínas no histónicas.....	64

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

I. HIPÓTESIS.....	69
II. OBJETIVOS.....	72

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cultivos celulares	76
II. Estudios de proliferación celular mediante marcaje con Bromodeoxiuridina.....	77
III. Ensayo de viabilidad celular mediante reducción de MTT	78
IV. Ensayo de adhesión celular.	79
V. Ensayos de migración celular mediante “Wound- healing”.....	80
VI. Extracción de DNA.....	80
VII. Secuenciación de mutaciones somáticas	81

INDICE

VIII. Extracción de RNA.....	82
IX. Transcripción reversa y PCR en tiempo real	83
X. Análisis de expresión génica mediante microarrays.....	85
XI. Extracción de proteínas	89
XII. Western blot.....	90
XIII. Inmunoprecipitaciones	93
XIV. Proteómica: Electroforesis bidimensional y análisis del acetiloma	95
XV. Análisis estadístico de los resultados.....	96

RESULTADOS

I. Líneas celulares con distinto estado mutacional de KRAS: Modelo para el estudio de sus dianas moleculares en el CCR.....	99
I.1. Caracterización de líneas celulares de CCR con distinto estado mutacional de KRAS en condiciones basales.	100
I.1.1. Caracterización genotípica.....	100
I.1.2. Caracterización morfológica.....	101

I.1.3. Efecto del estado mutacional de KRAS en la proliferación celular.	103
I.1.4. Estudios de adhesión y migración celular.	104
I.1.5. Efecto de la mutación de KRAS sobre la activación de ERK1/2 y AKT.	106
I.2. Caracterización de la respuesta a EGF en líneas celulares de CCR con distinto estado mutacional de KRAS.	108
I.2.1. Efecto de estado mutacional de KRAS sobre la proliferación celular en respuesta a EGF.	110
I.2.2. Efecto de estado mutacional de KRAS sobre la adhesión y migración celular en respuesta a EGF...	111
I.2.3. Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la activación de ERK1/2 y AKT en respuesta a EGF. .	113
II. Efecto del estado mutacional de KRAS en el acetiloma global en el cáncer colorectal.	114
II.1. Acetiloma global de líneas celulares HCT116, HAF1 y HAE6	115
II.2. Análisis funcional de las proteínas diferencialmente acetiladas.	122

INDICE

III. Perfil de expresión génica de células de CRC con distinto estado mutacional de KRAS	122
IV. La acetilación de la familia de las hnRNP en las células de CCR.....	129
IV.1. Análisis de la posible acetilación basal de hnRNPs dependiente del estado mutacional de KRAS.	129
IV.2 Acetilación de la hnRNPA1 y L en respuesta a EGF	133
IV.3. Papel de la mutación <i>KRAS</i> ^{A146T} en la acetilación de las hnRNPs.....	138

DISCUSIÓN

I. Visión global: principales aspectos estudiados.....	143
II. Consecuencias moleculares y biológicas del desequilibrio alélico en KRAS.	146
II.1 Eliminación del alelo mutado <i>KRAS</i> ^{G13D} y presencia de un único alelo salvaje.	146
II.2. Eliminación del alelo salvaje <i>KRAS</i> ^{WT} y presencia de un único alelo mutado (<i>KRAS</i> ^{G13D/-}).....	150

III. Dianas moleculares de KDAC/ KATs dependientes del estado mutacional de KRAS..... 152

 III.1 Funciones de las hnRNPs..... 156

 III.2 Expresión de las hnRNPs. 158

 III.3 Acetilación diferencial de hnRNPs en respuesta a EGF dependiente del estado mutacional de KRAS 160

 III.4 Futuras perspectivas: Función de la acetilación de hnRNPs..... 164

CONCLUSIONES

SUMMARY

I. Introduction..... 171

II. Aims..... 174

III. Results..... 177

 III.1. Differential effect of KRAS^{A146T} and KRAS^{G13D} in EGF-treated CRC cells. 177

 III.2. Differential mRNA levels in KRAS^{G13D} vs KRAS^{A146T} CRC cell lines 179

 III.3. Effect of KRAS mutations on the global acetylome of CRC. 180

INDICE

III.4. Acetylation of hnRNP family members	182
III.5. Acetylation of hnRNPA1 and L in response to EGF	183
III.6. Role of KRAS ^{A146T} mutation on hnRNP acetylation	184
IV. Discussion.....	186
V. Conclusions.	190

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA	193
--------------------	-----

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AKT	v-akt Murine Thymoma Viral Oncogene
AMPK	adenosine monophosphate kinase
BAD	Bcl-2 associated death promoter
BAX	Bcl-2 associated X protein
BCL-2	B-cell CLL/ lymphoma 2
BCL-X	BCL2-like 2
BIM	BCL2-like 11
BRAF	murine sarcoma viral oncogene homolog B
CCR	colorectal cancer
c-FLIP	cellular Fas associated death domein like IL inhibitory protein
EGF	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FOXO3	forkhead box O3
HER	human epidermal growth factor receptor
HER2	receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
GSK3	glycogen synthase kinase 3
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
IGF1	insulin growth factor 1
IGFR	IGF binding protein
IL	interleukin
IP	immunoprecipitation
KATs	acetyltransferases

KDACs	deacetylases
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Ku70	lupus Ku autoantigen <i>protein p70</i> .
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MDM2	murine double minute 2
MHC	major histocompatibility complex
MMP	matrix metalloproteinase
MS	mass spectrometry
c-MET	hepatocyte growth factor receptor
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF-KB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B cells
NO	nitric oxide
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
p-AKT	phosphorylated AKT
p-ERK	phosphorylated ERK
PDGF	platelet growth factor
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	phosphoinositide-3 kinase
PIP2	phosphatidylinositol bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol triphosphate
PKA	cAMP dependent protein Kinase
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on
RANK-L	receptor activator of NF-kB ligand

ABREVIATURAS

RAPTOR	regulatory associated protein of TOR
ROS	reactive oxygen species
S.E.M	standart error mean
STAT	signal transducer and activator of transcription
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TGF β	transforming growth factor beta
TSA	trichostatine
TSC1	tuberous sclerosis 1
VEGF	vascular endothelial growth factor

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I. Prevalencia y epidemiología del cáncer
colorectal.

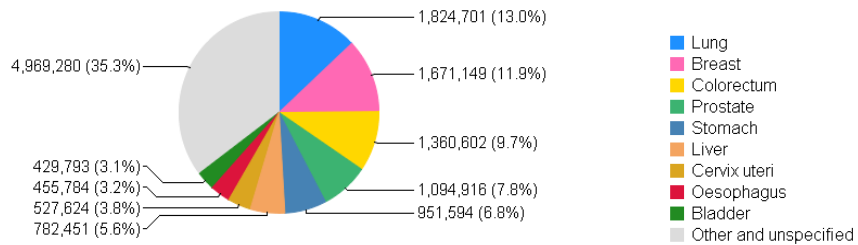
INTRODUCCIÓN

El cáncer es la causa más importante de morbilidad y mortalidad en Europa, después de las enfermedades cardiovasculares según la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo que representa un problema sanitario y social muy importante en la actualidad. El cáncer con mayor incidencia a nivel mundial es el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de mama y el cáncer colorrectal (CCR) (Figura 1). En los países europeos, el CCR es el más frecuente si se consideran ambos sexos en conjunto. Además ha sido considerado la segunda causa de mortalidad por cáncer en Europa y Estados Unidos [1, 2]. Según los datos del programa GLOBOCAN 2012, la estimación de la incidencia de cáncer en España superó los 200.000 casos, dentro de los cuales el CCR representa el cáncer con más casos en nuestro país para ambos sexos, con una incidencia del 15%. Si tenemos en cuenta la mortalidad en nuestro país, el cáncer de pulmón es que más muertes causa, con un 20% de las muertes producidas, seguido del CCR con un 14%

Figura 1. Epidemiología del cáncer. Estimación del número de casos de incidencia (gráfico superior) y mortalidad (gráfico inferior) mundial para ambos sexos y todas las edades para 2012 (tomado de <http://globocan.iarc.fr>).

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

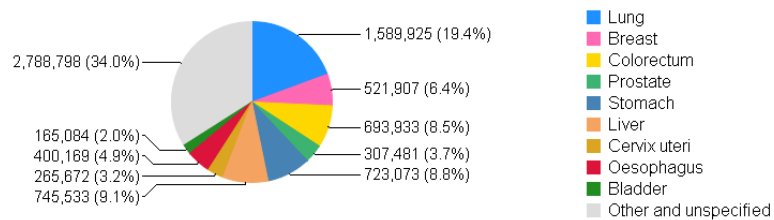
Incidence



Si tenemos en cuenta los datos de prevalencia para los

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Mortality



próximos 5 años, todo parece indicar que el número de nuevos pacientes diagnosticados de cáncer irá en aumento cada año, muy probablemente debido al envejecimiento de la población, estando por encima de los 500.000 casos para 2017 [3].

Afortunadamente, hay que destacar que la media de supervivencia en pacientes diagnosticados de CCR ha avanzado considerable en los últimos 20 años. Esto puede atribuirse no solo a la implantación de programas de cribado y diagnóstico, sino a la existencia de tratamientos más efectivos para la enfermedad en estadios iniciales y avanzados. [4-6] En un 75% de los pacientes la enfermedad se diagnostica en una etapa inicial, sin embargo, de ellos aproximadamente un 30% progresará a una enfermedad metastásica. Además, un 25% de los casos debuta con una enfermedad metastásica considerada mayoritariamente como incurable en el momento actual. [1, 2]

Todos estos datos nos ofrecen una idea de la importancia de esta enfermedad a nivel global hoy día, y la relevancia de su estudio, tanto en prevención, dado que su detección temprana aumenta sustancialmente la probabilidad de curación, como en el desarrollo de nuevas terapias capaces de controlarla y curarla.

II. Patogénesis y bases moleculares del CCR.

El CCR se produce cuando hay un crecimiento incontrolado de células del colon y/o el recto dando lugar a un tumor maligno. La mayoría de los tumores de CCR son de tipo epitelial, y en concreto el más frecuente es el adenocarcinoma, que representa el 90% de los CCR.

El CCR es una enfermedad en la que confluyen tanto causas genéticas como ambientales. La mayoría de los tumores colorectales (70-85%) se encuadran dentro de los tumores de tipo esporádico y que por tanto no poseen una carga genética heredada, mientras que una pequeña proporción de ellos corresponde a formas hereditarias, ya sea poliposis adenomatosa familiar (menos del 1%) o CCR hereditario no asociado a poliposis (2-5%). Los mayores factores de riesgo para padecerlo son la edad y el sexo masculino. Otros factores, como antecedentes familiares de CCR o la enfermedad intestinal inflamatoria también aumentan considerablemente el riesgo de sufrir este tipo de tumor. En concreto, las personas con un pariente de primer grado con CCR diagnosticado con más de 50 años de edad tienen de 2 a 3 veces más riesgo de presentar este cáncer con respecto al resto de la población. Este riesgo puede aumentar hasta 6 veces si el pariente de primer grado es menor de 45 años, o si hay dos miembros de primer grado

afectados [7]. De hecho, el CCR es uno de los tumores con un mayor número de pacientes con un parentesco familiar y se estima que en un 15-20 % adicional de casos puede existir un componente hereditario asociado aún no bien establecido.

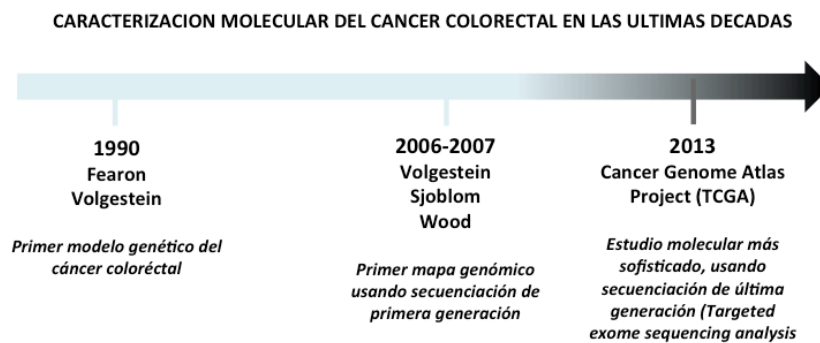
II.1. Factores de riesgo no genéticos.

Los principales factores de riesgo para la aparición de tumores esporádicos son de tipo ambiental y están particularmente asociados a comportamientos propios del estilo de vida occidental: dietas ricas en carnes rojas, la elevada ingesta de alcohol o la obesidad son factores de riesgo; mientras que las dietas ricas en fibra, calcio, vitamina D, ácido fólico o selenio podrían ser protectoras frente al desarrollo del CCR. [8] Junto a estos, hay que añadir otros que ya se conocían previamente como el tabaquismo, la edad avanzada o diversas enfermedades asociadas al intestino grueso como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa [9].

II.2 Modelos moleculares de carcinogénesis del CCR.

Como toda neoplasia, el CCR se desarrolla lentamente a lo largo de muchos años en un proceso conocido como la secuencia adenoma-carcinoma. Se trata de un proceso secuencial en el que debido a la aparición de mutaciones o a cambios epigenéticos se produce la activación de un oncogén o la inactivación de un gen supresor de tumores [10]. Estos cambios alteran la fisiología normal de la célula, confiriéndole además unas ventajas selectivas y unas características propias de las células tumorales entre las que destacan: la capacidad de crecimiento autocrino, la insensibilización a señales antiproliferativas, resistencia a la apoptosis, potencial replicativo ilimitado y la capacidad de invadir tejidos adyacentes y de producir metástasis [11].

Los análisis de los genes y rutas moleculares implicados en el CCR han llevado a establecer diferentes modelos moleculares de progresión del CCR (Figura 2).



INTRODUCCIÓN

Figura 2. Evolución de la caracterización molecular del CCR en las últimas décadas.

II.2.1. Modelo de inestabilidad cromosómica o vía clásica.

El primero de estos modelos fue el propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990. Estos autores desarrollaron un modelo molecular e histológico de la progresión del CCR, dividido en 7 etapas según los cambios histológicos y/ genéticos que se iban produciendo en el epitelio intestinal. Este modelo progresivo se desarrollaba durante un periodo aproximado de décadas (Figura 3).

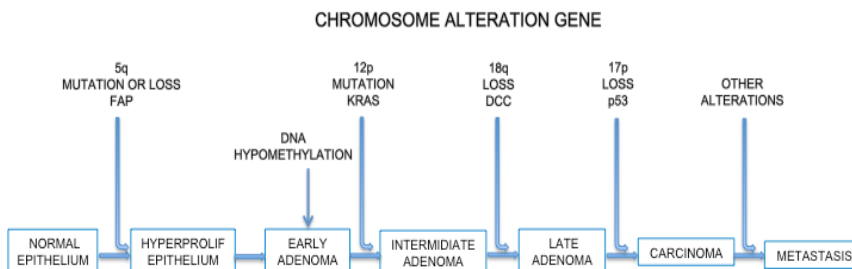


Figura 3. Secuencia de aparición de las principales anomalías cromosómicas en el CCR (modelo de Fearon and Vogelstein).

Basándose en datos histopatológicos y clínicos [12], los autores sugirieron que los CCR evolucionaban a partir

de un adenoma, que progresivamente aumentaba de tamaño, adquiriría displasia, y progresivamente evolucionaba a carcinoma. Aunque el proceso de progresión del adenoma era un proceso continuo, los autores describieron diferentes estadios en la formación del mismo:

- *Epitelio normal - Epitelio hiperproliferativo*: En los pacientes con poliposis, y quizá otros, la proliferación podría ser inducida por la inactivación o la pérdida del gen de la poliposis adenomatosa familiar en el cromosoma 5q [13].
- *Epitelio hiperproliferativo - Adenoma temprano*: Una de estas células hiperproliferativas podría convertirse en un pequeño adenoma debido a la aparición de fenómenos epigenéticos entre los que destacan los fenómenos de hipometilación génica y de hipermetilación de la región promotora, que contribuyen a la sobreexpresión e inhibición de oncogenes y genes supresores de tumores respectivamente [10, 14].
- *Adenoma temprano - Adenoma intermedio*: se caracteriza por la aparición, en un número elevado de casos (aproximadamente un 30-45%), de mutaciones activadoras en los codones 12, 13 y 61

del oncogén KRAS.

- *Adenoma intermedio - Adenoma tardío*: en esta fase se produce la mutación de genes codificados en la región del cromosoma 18q como DCC, Smad2 y Smad4.
- *Adenoma tardío - Adenocarcinoma*: se produce la inactivación del gen p53 (gen pro-apoptótico situado en cromosoma 17p) en aproximadamente el 80% de los casos [15].
- *Adenocarcinoma - Metástasis*: se produce la mutación tanto de oncogenes como de genes supresores de tumores en cromosomas adicionales, lo que proporciona al tumor la capacidad de progresar y de escapar de su localización original, produciendo metástasis en otros órganos.

El grupo de Volgestein de nuevo, fueron los primeros en investigar de manera más detallada los antecedentes genómicos del CCR, mediante secuenciación de primera generación o “adapted Sanger sequencing” [16, 17]. Los genes “driver” obtenidos rondaron los 140 e incluyeron algunos bien conocidos como APC, KRAS, PIK3CA, TP53, SMAD4, PTEN y FBXW7. Incluyendo

nuevos genes como RET, ALK, SMAD3, NF1. El número medio de mutaciones por tumor fue 76 con una media de 15 genes afectados por muestra. Estos datos pusieron de relevancia el gran número de alteraciones sin relevancia clínica que afectaban a cada tumor en el caso del CCR.

II.2.2. Fenotipo hipermetilador (CIMP).

En paralelo a la aparición del modelo molecular de progresión tumoral propuesto por Voslgestein, surgieron una serie de trabajos [18-20] que proponían un modelo diferente de desarrollo del CCR caracterizado por la aparición de inserciones o deleciones en secuencias microsatélites (fenotipo MSI), que no pueden ser reparadas debido a fallos en los mecanismos de reparación del DNA.

La inactivación del mecanismo reparador es causada principalmente (en más de un 80% de los casos) por la hipermetilación de la región promotora del gen MLH1 [19]. A raíz del descubrimiento de los fenómenos de hipermetilación en las regiones promotoras de genes como MLH1, se llevaron a cabo trabajos que revelaron la existencia de tumores que desarrollaban una hipermetilación masiva en las regiones promotoras de genes supresores de tumores, lo que ha llevado a proponer

INTRODUCCIÓN

la existencia de un tercer fenotipo en el CCR denominado fenotipo CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) o fenotipo metilador.

II.2.3. Clasificación molecular basada en la secuenciación masiva.

Gracias a la llegada de nuevas tecnologías, como la secuenciación de nueva generación, se ha podido caracterizar de forma más precisa las principales alteraciones moleculares ligadas al cáncer. Hasta ese momento los investigadores dividían biológicamente el CCR en dos subgrupos: tumores con inestabilidad de microsatélites (MSI), normalmente localizados en la región derecha del cólon, frecuentemente asociados a un fenotipo CIMP e hipermutados, o CCR con estabilidad de microsatélites pero inestabilidad cromosómica.

En el año 2012 se presentó El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) incluyendo un artículo dedicado en exclusiva al CCR. En él se analizaban los resultados de la secuenciación por nueva generación de 224 muestras de tumor y tejido no tumoral. Así se pudieron identificar dos subgrupos tumorales en función del número total de mutaciones por muestra: tumores hipermutados e hipomutados. Se consideró como hipermutados aquellos

tumores con una mediana de mutaciones totales de 728, y aquellos hipomutados los que presentaban una mediana de mutaciones de 58. Respecto a las mutaciones génicas, en global se identificaron 32 mutaciones somáticas como las frecuentes (Tabla I). Los genes más frecuentemente mutados en los tumores hipermutados fueron *ACVR2A* (63%), *APC* (51%), *TGFR2* (51%), *BRAF* (46%), *MSH3* (40%), y *FZD3* (29%). Mientras que las mutaciones más frecuentes en los hipomutados fueron *APC* (81%), *TP53* (60%), *KRAS* (43%), *TTN* (31%), *PIK3CA* (18%), *SMAD4* (9%) Y *CTNNB1* (5%). Dos genes presentaban una distribución diferente en ambos grupos de manera estadísticamente significativa *TP53*, y *APC*.

Rank	MutSig score— hypermutated	MutSig score— nonhypermutated
1	<i>BRAF</i>	<i>APC</i>
2	<i>APC</i>	<i>TP53</i>
3	<i>DMD</i>	<i>PIK3CA</i>
4	<i>CASP8</i>	<i>KRAS</i>
5	<i>MIER3</i>	<i>FBXW7</i>
6	<i>ATP6V0D2</i>	<i>SMAD4</i>
7	<i>SLC9A9</i>	<i>TCF7L2</i>
8	<i>PTPN12</i>	<i>TTN</i>
9	<i>CDC27</i>	<i>NRAS</i>
10	<i>MAP7</i>	<i>CTNNB1</i>
11	<i>FZD3</i>	<i>GRIK3</i>
12	<i>MYO1B</i>	<i>SMAD2</i>
13	<i>TCERG1</i>	<i>KIAA1804</i>
14	<i>SLITRK6</i>	<i>ACVR1B</i>
15	<i>ACOT12</i>	<i>GPC6</i>
16	<i>TPTE</i>	<i>EDNRB</i>
17	<i>RARB</i>	<i>SOX9</i>
18	<i>PTEN</i>	<i>WBSCR17</i>
19	<i>LEPREL1</i>	<i>FAM123B</i>
20	<i>SMAD4</i>	<i>ATM</i>

Tabla I. Genes más frecuentemente mutados en tumores hipermutados o hipomutados. Fuente: Atlas.

Respecto a la importancia de las diferentes vías moleculares en el CCR, se observó que la vía de las MAPquinasas o PI3K estaban alteradas. Concretamente proteínas como *IGF2*, *IGFR*, *ERBB3*, *MEK*, *AKT*, y *MTOR* se presentaron como dianas potencialmente interesantes para ser inhibidas en este tipo tumoral.

III. La evolución en el tratamiento del CCR.

El tratamiento del CCR ha experimentado una transformación radical en los últimos 20 años, incrementando así la supervivencia de los pacientes. La mediana de supervivencia de la enfermedad metastática se ha incrementado de unos 5 meses en aquellos pacientes no tratados, a aproximadamente 3 años en el grupo de pacientes que reciben un tratamiento quimioterápico combinado en el momento actual [21, 22].

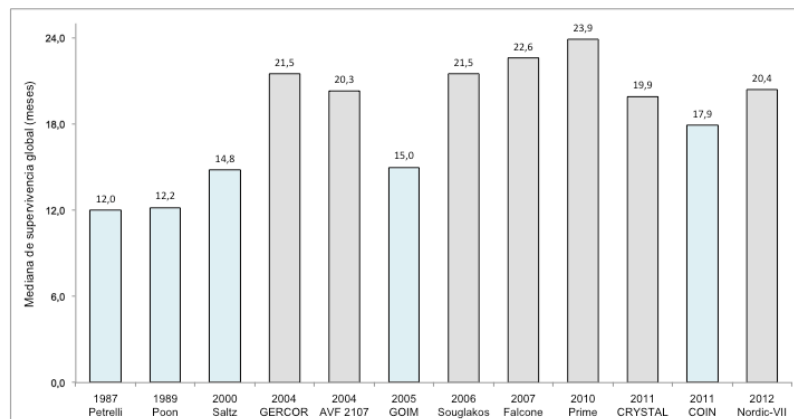


Figura 4. Tendencia en las medianas global de supervivencia en los principales ensayos clínicos del CCR. En azul los diferentes ensayos que mostraron supervivencias inferiores a los 18 meses. En gris últimos ensayos que muestran supervivencias claramente superiores a los 18 meses y cercanas a los dos años.

Para los pacientes con CCR en estadios iniciales la resección quirúrgica en la mayoría de los casos es curativa y no suelen necesitar ningún tratamiento adicional. No obstante, la gran mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadios más avanzados de la enfermedad, donde hay un alto riesgo de sufrir recidivas, por lo que estos pacientes son tratados con una terapia adyuvante después de la cirugía. La aplicación de tratamientos de quimioterapia o de radioterapia ha sido especialmente beneficiosa para pacientes con tumores colorrectales en estadio localmente avanzado y avanzado y en algunos casos también para aquellos con estadios

localizados [23].

El descubrimiento de nuevos fármacos citotóxicos y de anticuerpos monoclonales u otros agentes dirigidos contra dianas moleculares específicas, junto con la posibilidad de realizar tratamientos multidiana en los que se combinan varios de estos fármacos a la vez ha conducido a una mejora en la supervivencia y en la calidad de vida de los enfermos. Sólo aquellos ensayos que utilizaron una combinación de ambas formas de tratamiento obtuvieron una mediana de supervivencia que superó los 24 meses.

El *background* genético específico de cada tumor influye de manera definitiva en la efectividad de las terapias diana. Por ejemplo, en el caso de los fármacos anti-EGFR, cerca de un 70% de las muestras de CCR presentan heterogeneidad en las aberraciones genéticas presentes en los genes envueltos en la vía del receptor de EGF, que afectan negativamente a la respuesta al tratamiento con agentes diana contra este receptor. Además, la heterogeneidad molecular del CCR ha sido descrita como un factor clave en la evolución clonal de las diferentes poblaciones celulares durante el tratamiento con fármacos anti-EGFR [24].

III.1. Agentes quimioterápicos en tratamiento adyuvante.

Actualmente, los regímenes quimioterápicos están compuestos por el agente citotóxico 5-fluorouracilo (5FU), o su pro-fármaco oral capecitabina, junto con el agente alquilante del DNA oxaliplatino (OXA). El 5FU suele ir acompañado del fármaco coadyuvante leucovorina o ácido folínico (LV), que mejora los efectos antitumorales de 5FU, aumentando el potencial inhibitorio del 5-FU sobre la enzima timidato sintetasa, su principal diana. Comercialmente existen combinaciones de estos fármacos para el tratamiento del CCR: 5FU/LV/OXA (FOLFOX) o capecitabina/OXA (XELOX). De hecho, los regímenes que incluyen OXA han sido comparados con la administración de 5FU/LV solamente en tres grandes ensayos prospectivos en los que se ha demostrado que la administración conjunta con OXA mejora la supervivencia de los pacientes [25].

Además de las combinaciones descritas, otros fármacos también han sido estudiados para tratar el CCR. Uno de ellos es el irinotecan, un derivado sintético del agente antineoplásico camptotecina, que ha demostrado

ser eficaz en un amplio número de tumores. Su diana molecular es la Topoisomerasa I, esencial para los procesos de replicación, recombinación, reparación y transcripción del DNA. Este fármaco ha sido combinado en ensayos clínicos junto con 5FU/LV/OXA (FOLFIRINOX) o con 5FU/LV (FOLFIRI), como primera línea de tratamiento del CCR, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos regímenes [26-28].

III.2. Terapias dirigidas anti-EGFR.

En los últimos años gran parte del esfuerzo en investigación oncológica se ha centrado en la identificación de dianas terapéuticas específicas de las células tumorales para conseguir bloquear vías esenciales para el crecimiento tumoral. Con estos nuevos tratamientos dirigidos se pretende potenciar el efecto antitumoral del tratamiento quimioterapéutico, así como minimizar los efectos secundarios de los tratamientos asociados a la baja especificidad de la quimioterapia estándar.

Debido a la importancia que se le ha dado al papel del EGFR en la tumorigénesis, este receptor se ha

convertido en una prometedora diana terapéutica para los agentes antitumorales [29]. Una serie de estudios preclínicos demostraron que la activación de EGFR activaba diferentes procesos tumorales, estimulaba la proliferación celular, la angiogénesis, favorecía la diseminación metastásica, así como protegía las propias células de la apoptosis [30]. Por otro lado, diversos estudios clínicos mostraron que diferentes tipos tumorales presentaban niveles elevados de EGFR o de sus ligandos y que ambos factores se asociaban a una enfermedad más agresiva y un peor pronóstico [31].

Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que el bloqueo del EGFR y de su cascada de señalización permite inhibir el crecimiento tumoral, de modo que los pacientes pueden obtener beneficios terapéuticos [32]. De las estrategias que se han abordado para inhibir el EGFR así como la señal *downstream* que producen cabe destacar dos:

- ❖ El bloqueo con anticuerpos monoclonales, que se unen con alta afinidad al dominio externo del receptor compitiendo con los ligandos endógenos del receptor. Frente al EGFR tenemos los fármacos cetuximab y panitumumab que actúan como

antagonistas del receptor. Su afinidad por EGFR es mayor que la de otros ligandos como TGF- α o EGF, por lo que su unión al receptor bloquea de manera efectiva la fosforilación y por tanto la sucesiva activación de EGFR [33, 34].

- ❖ La inhibición de la actividad enzimática tirosina-quinasa del receptor a través de pequeñas moléculas inhibitoras. Estas previenen la autofosforilación del dominio tirosina-quinasa intracelular del receptor.

En aquellos pacientes de CCR con KRAS no mutado, se ha demostrado que el tratamiento combinado de agentes quimioterápicos con inhibidores de EGFR incrementó la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la tasa de respuesta en pacientes con KRAS no mutado versus el tratamiento quimioterápico [35-37].

III.3. Otros fármacos dirigidos contra una diana molecular específica.

Los avances en la investigación oncológica llevan a la práctica clínica el uso de pequeñas moléculas dirigidas a

inhibir o bloquear procesos celulares característicos de las células tumorales. Entre estos fármacos encontramos:

- ❖ Inhibidores de la angiogénesis como bevacizumab. Fue el primer fármaco antiangiogénico aprobado para el tratamiento del CCR por la Agencia Americana y Europea del Medicamento; se trata de un anticuerpo monoclonal que se une al Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), previniendo su interacción con sus receptores (VEGFR), reduciendo así la vascularización tumoral. Recientemente un meta-análisis de seis estudios fase III demostró que la combinación de bevacizumab a la quimioterapia estándar incrementa la tasa de respuesta, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de los pacientes [38].
- ❖ El aflibercep es una proteína recombinante que bloquea la activación de VEGF-A, VEGF-B y el factor de crecimiento de la placenta. Incrementa la supervivencia, el tiempo de supervivencia libre de progresión y la tasa de respuesta, cuando se combina en segunda línea con FOLFIRI en aquellos pacientes previamente pretratados con

oxaliplatino, independientemente de que hayan recibido un tratamiento previo con bevacizumab o no [39].

- ❖ Regorafenib es un inhibidor multikinasa oral selectivo aprobado recientemente en el tratamiento del CCR avanzado [40].

IV. Vía de EGFR y su relación con la carcinogénesis

IV.1. Receptor de EGF.

El EGFR es parte de una subfamilia de cuatro receptores de membrana muy similares entre sí: EGFR (o ErbB1), HER-2/neu (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3) y HER-4 (ErbB-4). También conocidos como receptores tirosina-quinasa de tipo I.

Los más estudiados han sido el EGFR (HER1) y el HER2, que fueron clonados y secuenciados en 1983, y en 1985 respectivamente [41]. En 1987 se consideró a HER2 sobreexpresado como factor de mal pronóstico en los tumores de mama. Por otro lado el EGFR es uno de los receptores más conocidos ya que está relacionado con la

progresión de diversos tumores malignos [42]. Todo esto hizo que comenzara el desarrollo clínico de tratamientos anti-ErbB (frente al EGFR y HER2).

EGFR es una proteína que está localizada en la membrana plasmática y está compuesta por tres dominios, un dominio extracelular, que constituye el sitio de unión al ligando y el sitio que favorece la dimerización, en el cual se encuentra el grupo amino terminal; una región transmembrana hidrofóbica, necesaria para el anclaje a la membrana, y finalmente un dominio intracelular, que posee el grupo carboxílico terminal. Este dominio intracitoplásmico posee actividad tirosina quinasa y los sitios de unión a sustratos.

IV.2. Ligandos de EGFR.

El EGFR en condiciones normales está inactivo necesitando de ligandos para su activación. Existen al menos seis factores conocidos que se unen al EGFR, entre los que se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento tumoral alfa ($TGF\alpha$, Transforming growth factor alfa), la anfirregulina, la epirregulina, la epigenina y la heparin-binding EGF. Alguno

de estos a su vez puede interactuar con otros receptores de la misma familia de receptores.

Tras la unión a un ligando el monómero del EGFR homodimeriza o heterodimeriza con otros miembros de la familia ErbB, activándose así la actividad tirosina quinasa del dominio citoplasmático del receptor, autofosforilándose. La sobreactivación de la tirosina quinasa del receptor es el suceso clave que inicia la cascada de transducción de señales intracelulares dando lugar a oncogénesis [43].

IV.3. Principales vías de respuesta a EGF.

Los receptores tirosin-quinasa (RTK) se activan por la unión de diferentes ligandos y producen la activación de *RAS* a través de diferentes pasos.

Los miembros de la familia canónica de *RAS* GTPasas, o producto de los genes humanos *HRAS*, *NRAS* y *KRAS*, son proteínas muy conservadas entre especies y de expresión ubicua con un papel bien establecido en el control de la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis.

En las células de mamífero, se expresan cuatro proteínas RAS diferentes, HRAS, NRAS, y el producto de splicing alternativo del exon 4 de KRAS que da lugar a KRAS4A y KRAS4B, siendo esta última la isoforma que más se expresa. La comparación de la secuencia de las cuatro isoformas de RAS muestra que comparten una homología del 80%. El pequeño porcentaje de RAS que no comparte homología entre los miembros de la familia RAS es responsable de las distintas modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las distintas isoformas de RAS. Como resultado de las diferentes modificaciones post-traduccionales, las proteínas RAS se distribuyen en diferentes subdominios de la membrana celular.

Como hemos explicado previamente, tras su unión al ligando, los receptores RTK dimerizan permitiendo la autofosforilación de sus colas citoplásmicas con dominio Tyr-quinasa. Estos residuos fosforilados permiten la unión de diversas proteínas adaptadoras que contienen dominios SH2 o PTB como puede ser GRB2 (Figura 5).

Las proteínas adaptadoras reclutarán a su vez a los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina o GEF (como SOS) que facilitan la activación de RAS. Las proteínas RAS son pequeñas GTPasas de 21KDa que

INTRODUCCIÓN

oscilan entre su forma activa RAS-GTP, y su forma inactiva RAS-GDP (Figura 5).

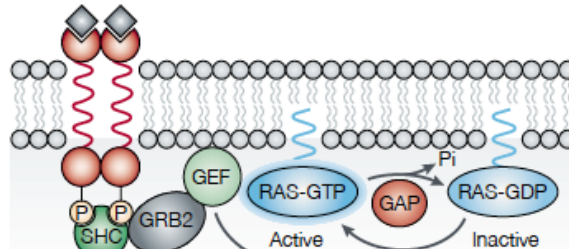


Figura 5. Activación de RAS por receptores RTK. RAS oscila entre su forma activa con GTP unido y su forma inactiva con GDP unido. Los factores GEF y GAP facilitan uno y otro estado de activación.

Los factores GEF facilitan la activación de RAS favoreciendo el desplazamiento de GDP y promoviendo la unión de GTP. Al unirse a GTP, RAS sufre un cambio conformacional que permite a sus sucesivos efectores unirse a su dominio RBD (dominio de unión a RAS), región que comparten todos los efectores de RAS.

Por otra parte, las proteínas de activación de GTPasas (GAP) regulan negativamente la activación de RAS. El estado activado de RAS está limitado por su baja actividad GTPasa intrínseca, que se acelera del orden de 10^5 veces por la unión de GAP, permitiendo que RAS vuelva a su estado inactivo con GDP unido.

Existen tres familias de GEFs, SOS, RASGRF y RASGRP, cada uno con múltiples miembros. A su vez, también existen varios GAFPs como p120 o NF1. Finalmente, RAS activado puede estimular una gran variedad de vías de transducción de señales o efectores (Figura 6). Muchas de las vías de los efectores de RAS son esenciales para la transformación neoplásica y son a su vez miembros de extensas familias de proteínas, como por ejemplo PI3K que comprende p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ o la familia de RAF quinasas que comprende CRAF, BRAF y ARAF [29].

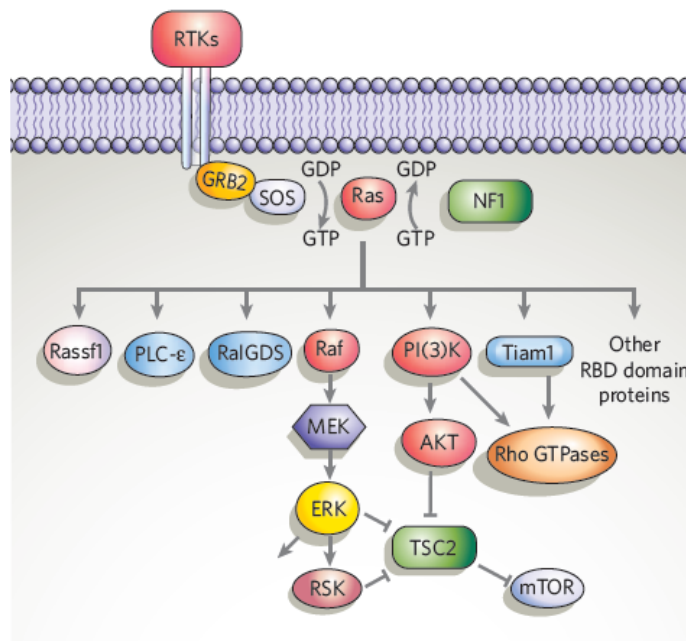


Figura 6. Efectores de RAS con dominio RBD. Ras puede unir y activar varios efectores. Raf y PI3K son las principales vías de transducción de señales desencadenadas por RAS

IV.3.1. Vía de las MAPKs: KRAS-RAF- ERK

La vía de señalización de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) presentan como característica un triple módulo con actividad quinasa que consiste en una MAPK quinasa quinasa (MKKK) que fosforila y activa una MAPK quinasa (MKK) que puede activar una MAPK terminal mediante la fosforilación dual en residuos de Thr y Tyr [44]:

- ❖ La familia de proteínas RAF (MKKK) son Ser/Thr quinasas con dominio de unión a RAS. La unión a RAS, induce la translocación de proteínas RAF a la membrana plasmática. que pueden ser fosforiladas por otras proteín quinasas como por ejemplo PKC. RAF fosforila y activa a su vez a MEK (MKK).
- ❖ MEK1/2 cataliza la fosforilación de ERK1/2 en Tyr204/187 y Thr202/185. Ambas fosforilaciones son un requisito imprescindible para la activación enzimática de ERK1/2.
- ❖ ERK1/2 catalizan preferentemente la fosforilación de sustratos con una secuencia Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro. Mientras que las proteínas RAF y MEK fosforilan un

número muy limitado de proteínas, ERK1/2 es capaz de catalizar la fosforilación de cientos de sustratos tanto citosólicos como nucleares incluyendo proteínas con función reguladora y factores de transcripción.

❖ Además, los componentes del módulo MAPK se asocian a muchas proteínas reguladoras como fosfatasas o proteínas andamio (Scaffold proteins):

a. Las fosfatasas, forman parte de un mecanismo de retroalimentación que restringe la duración de la señalización de las MAPK mediante la defosforilación de estas [45]. La defosforilación de ERK1/2 puede estar mediada por tirosin-fosfatasas específicas, Ser/Thr-fosfatasas y fosfatasas duales. La combinación de quinasas y fosfatasas hacen que la señalización por esta vía sea un proceso reversible.

b. Las proteínas andamio, como KSR1/2, IQGAP1, MP1 o β -Arrestin1/2, constituyen un punto de regulación crucial para las vías de transducción de señales. Interaccionan con múltiples miembros de la vía reuniéndolos en complejos, ayudándolos a localizarse en zonas específicas de la célula,

coordinando señales de retroalimentación positiva y negativa o integrando señales de otras vías.

IV.3.2. Vía de PI3K-AKT-mTOR

PI3K es otro de los efectores de RAS mejor estudiados y uno de los mediadores de RAS más importantes en la modulación de la supervivencia y la proliferación [46].

Esta vía se descubrió hace más de 20 años. En los últimos años se ha demostrado su papel central en diferentes procesos biológicos o patológicos desde la progresión del cáncer, al incremento metabólico, la supervivencia o la migración.

Se han descrito tres clases de PI3K de acuerdo a su estructura y función. La PI3K clase I es la que se ha relacionado más claramente con el desarrollo de cáncer. Esta proteína está compuesta por una parte reguladora y una catalítica. Las unidades reguladoras son tres diferentes $p85\alpha$, $p85\beta$, y $p55\gamma$, conocidas convencionalmente como p85. Además, las formas catalíticas $p110\alpha$, $p110\beta$, y $p110\delta$ son el producto de tres genes, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD*.

Hasta el momento los genes mutados más conocidos han sido *PIK3CA*, y *PIK3R1*.

Generalmente los PI3K se activan a través de los RTKs en respuesta a diferentes factores de crecimiento o por interacción directa con RAS (Figura 7), La subunidad reguladora, p85, se une directamente a los residuos fosforilados en Tyr de los receptores (aunque también pueden hacerlo por unión a proteínas G o a proteínas adaptadoras IRS).

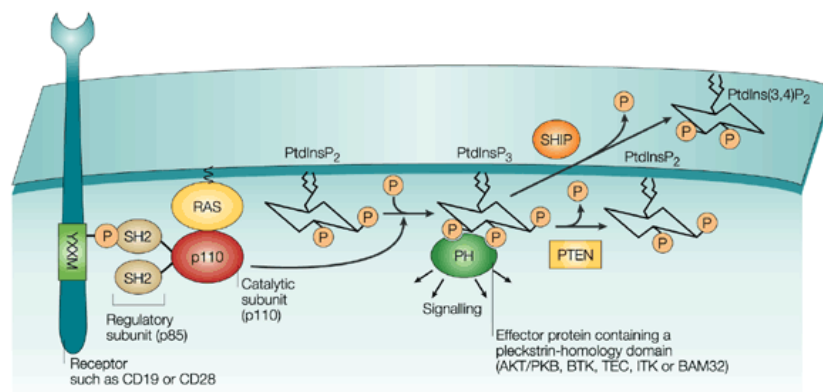


Figura 7. Mecanismo de activación de PI3K por unión a RTK o a RAS. P110 se libera de la restricción impuesta por p85 fosforilando su sustrato PIP2. PIP3 une proteínas con dominio PH como Akt que amplificarán la señal. El proceso es reversible gracias a la fosfatasa PTEN que desfosforila PIP3.

catalítica y localización de la PI3K en la membrana celular,

INTRODUCCIÓN

donde se encuentra su sustrato, el fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PIP2)

PI3K fosforila el PIP2 produciendo el PIP3. PTEN es una fosfatasa que actúa defosforilando PIP3, y limitando el tiempo de activación de la vía. PIP3 propaga la señal intracelularmente al unirse a la región o dominio PH de diferentes proteínas.

La serin-treonin quinasa AKT es la principal diana de PIP3. El PI3P permite la interacción clave entre las quinasas PDK1 y AKT. PDK1 es una quinasa que activa AKT fosforilándolo en la Thr308. Uniéndose a PIP3, AKT pasa a ser reclutada a la membrana celular y a fosforilarse por mTOR y PDK1 consiguiendo su completa activación.

Tras su activación AKT fosforila a su vez a un rango muy amplio de proteínas que regulan diversas funciones celulares.

IV.3.3 Entrecruzamiento de vías de señalización RAS-RAF-ERK y PI3K-AKT-mTOR.

La primera evidencia de la interacción entre RAS y PI3K vino del hecho de encontrar cierta actividad PI3K en inmunoprecipitados de RAS [47]. Posteriormente se demostró que existía una interacción directa entre estas

dos proteínas y que RAS es capaz de unir PI3K cuando RAS se encuentra en su forma activa con GTP unido [48]. Además, se ha podido demostrar que RAS activo se une a p110 γ aumentando considerablemente la actividad catalítica de PI3K, aunque en condiciones fisiológicas esta activación es transitoria. Datos de diferentes estudios sugieren que RAS también necesita interactuar con p110 β para conseguir su actividad oncogénica.

También existe una interconexión entre ambas vías a nivel de RAF. AKT interactúa y fosforila RAF en Ser259 en su dominio regulador. Esta fosforilación inhibe la activación de RAF y mTOR también puede conectar ambas vías de transducción. mTOR está formado por dos complejos diferentes mTORC1 y mTORC2. Tanto la vía de PI3K como KRAS, pueden regular la actividad de mTORC1 mediante la fosforilación del complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2). A su vez mTORC1 activa p70S6K que fosforila IRS1, produciendo la inhibición de PI3K y AKT, activando por tanto un círculo negativo de retroalimentación.

Además, distintos ligandos pueden activar simultáneamente ambas vías. La activación de c-MET, el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

puede activar la vía de las RAS-RAF-ERK así como la vía de PI3K/AKT. Por ejemplo c-MET puede activar RAS favoreciendo la unión de SHC y GRB2. Por otro lado SHP2 también puede ser un nexo de unión de la vía de c-MET a la cascada de las MAPK ya que la reducción de SHP2 por GAB1 puede ser responsable de mantener la fosforilación de las MAPKs. Por otro lado c-MET puede interaccionar directamente con la subunidad p85 de PI3K directamente o indirectamente a través de GAB1.

La vía del factor transformador de crecimiento β (TGF β) también mantiene una íntima relación con la vía de las MAPKs. El TGF β puede modificar la actividad de diferentes quinasas clave en la vía de las MAPKs como p38 o ERK.

IV.4. Mutaciones en KRAS y respuesta a tratamientos anti-EGFR

IV.4.1. Tipos de mutaciones en KRAS.

RAS fue uno de los primeros oncogenes descubiertos ([49, 50] y se sabe que es uno de los genes más comúnmente mutados, afectando aproximadamente a

un 30% de todos los tumores [51, 52]. De hecho, la primera mutación en identificarse en un oncogén humano fue una mutación puntual en el gen *KRAS*, que provoca la sustitución de glicina por valina en la posición 12 de la proteína [53].

Hoy se sabe que las mutaciones puntuales que provocan activación de las proteínas RAS se agrupan en las regiones que codifican los aminoácidos 12, 13, 59, 61, 117 y 146, siendo las más comunes las que afectan a los codones 12 y 13. Las mutaciones en el exón 2 de *KRAS* (ya sea en el codón 12 ó 13) alteran la secuencia de aminoácidos adyacentes al sitio de unión de GDP/GTP, reduciendo la actividad GTPasa de la proteína *KRAS*. En el caso de *KRAS* no mutado, ambos codones, el 12 y el 13, codifican para el aminoácido glicina; sin embargo tras la mutación este residuo cambia y no siempre es el mismo (Figura 8). Las mutaciones más frecuentes producen la sustitución de este aminoácido por aspartato o valina en el codón 12 (G12D o G12V) y aspartato en el 13 (G13D), afectando a la estructura y conformación de la proteína.

La activación constitutiva de *KRAS* genera una estimulación celular constante de diversas funciones oncogénicas tales como: el crecimiento, progresión del ciclo

celular, la transformación del metabolismo hacia programas predominantemente anabólicos que sustentan los elevados requerimientos tumorales, la estimulación de la angiogénesis, la inmortalización celular o el incremento de la motilidad y el potencial metastático[54].

No obstante, es importante señalar que las distintas mutaciones en las proteínas RAS inducen cambios conformacionales distintos en función del codón y aminoácido afectado, lo que puede tener efectos diferentes sobre el grado de activación de KRAS. Consecuentemente, cada mutación puntual puede activar diferencialmente a los efectores de RAS, y asociarse a distintas vías de señalización o participar en la activación diferencial de procesos celulares, como la proliferación, la regulación de la muerte celular o la migración.

IV.4.2. Prevalencia de las mutaciones en KRAS.

Las proteínas de la familia RAS se expresan de manera diferencial en los distintos tipos celulares, lo que explicaría las variaciones en la frecuencia de las mutaciones en los genes *RAS* encontradas en los diversos tipos de tumores. La mayoría de las mutaciones que afectan a los genes de esta familia se producen en el gen

KRAS. Son especialmente comunes en tumores de páncreas (70-90% de prevalencia), colon (35-50%), intestino delgado (35%), cánceres biliares (20-30%) y cáncer de pulmón (20-30%) [55, 56]. En contraste las mutaciones de NRAS son menos habituales, y se detectan principalmente en tumores hemato-linfáticos (10%), y melanomas (20%), mientras que las mutaciones de HRAS son dominantes en tumores cervicales (9%), de ovario (23%) y de glándula salivar (15%) [57].

Además, si nos centramos únicamente en KRAS, encontramos diferencias en la incidencia del tipo específico de mutación, dependiendo del tipo de tumor. Por ejemplo las mutaciones de KRAS^{G12D} son las más comunes en los cánceres pancreáticos (dos tercios de ellos), mientras que se presentan en casi la mitad de los CCR. Por otro lado, la mutación de KRAS^{G12C} es la más común en los tumores de pulmón, presente en casi la mitad de ellos.

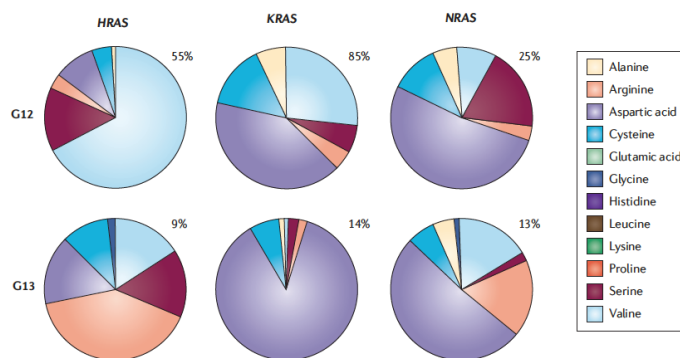


Figura 8. Distribución de las diferentes mutaciones de RAS en los tumores sólidos.

Es de destacar, que no todas las mutaciones son iguales; si bien todas ellas producen la activación constitutiva de KRAS, el grado de dicha activación y sus efectos posteriores varían en función del aminoácido introducido. Así, en el cáncer de colon y de pulmón las mutaciones de *KRAS*^{G12V} se han asociado a un peor pronóstico que las mutaciones en *KRAS*^{G12D}. Del mismo modo, *KRAS*^{G12V} tiene una actividad GTPasa más débil y mayor unión a ATP que *KRAS*^{G12D}.

IV.4.3. Las mutaciones de KRAS en CCR y las terapias anti-EGFR.

Tal y como se ha comentado anteriormente, aproximadamente un 50% de los tumores de CCR presentan mutaciones KRAS. De éstas el 80-90% se producen en los codones 12 ó 13. En cambio las mutaciones en otros codones (61, 117 y 146) tienen una incidencia mucho menor (<5% del total de las mutaciones en KRAS) y su relevancia clínica todavía no ha sido estudiada en profundidad [58].

Parece un hecho demostrado que la presencia de mutaciones en KRAS en los codones 12 ó 13 son marcadores predictivos negativos del tratamiento anti-EGFR [59]. Amado et al. fueron los primeros en determinar dentro de un ensayo clínico, que únicamente los pacientes que no presentaban una mutación para el gen KRAS se beneficiaban del tratamiento anti-EGFR [37, 60, 61].

De esta forma ya en Febrero del 2009, la American Society for Clinical Oncology (ASCO) recomendó el empleo de estos fármacos únicamente a la subpoblación de pacientes con KRAS no mutado por ser factor pronóstico. Posteriormente se unió también la Agencia Europea de medicamentos (EMA) y la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) al haberse demostrado en ensayos independientes que pacientes con mutaciones en el codón 12 y 13 de KRAS en el tumor no respondían al tratamiento anti-EGFR confirmando su valor predictivo. La mutación haría que la cascada de señalización estuviera activada constitutivamente no haciendo efecto el anti-EGFR ya que se trata de un bloqueo de la vía por encima de la mutación [36].

No obstante, diferentes estudios retrospectivos han analizado el efecto de las terapias anti-EGFR en CCR

INTRODUCCIÓN

portadores de estas mutaciones más frecuentes (12 y 13) y existe cierta controversia sobre el beneficio terapéutico en aquellos pacientes con mutaciones en el codón 13. En este sentido, diferentes estudios han tratado de establecer si las mutaciones de KRAS tenían un papel pronóstico en CCR, comparando fundamentalmente la presencia de mutaciones en el codón 12 con las del 13 y con pacientes sin mutaciones en KRAS [62, 63]. Se ha podido concluir que el grupo de pacientes con mutaciones en el codón 12 presentaba una mortalidad por CCR estadísticamente superior. Además, KRAS^{G12D} es más frecuente en lesiones no metastásicas, mientras que G12V está presente en lesiones metastásicas, incrementa la tasa de recidiva tumoral y se asocia con una menor supervivencia del paciente. Sin embargo los pacientes con mutaciones en el codón 13 no presentaban un pronóstico significativamente peor que los pacientes con KRAS no mutado y, según los últimos estudios retrospectivos, parece ser que este subgrupo de pacientes sí que podría beneficiarse de las terapias dirigidas anti-EGFR.

Sin embargo estos resultados respecto a la mutación G13D, no se han reproducido en otra reciente publicación

por lo que a falta de estudios retrospectivos deberían considerarse como no concluyentes [64].

Respecto al análisis de las mutaciones en otros codones menos frecuentes como el 61 o el 146 para determinar si podían ser también un factor pronóstico no se ha podido concluir nada, dada la baja frecuencia de estas mutaciones.

INTRODUCCIÓN

Según estos datos, solo el 50% de los pacientes con CCR en estadios avanzados podría beneficiarse de las terapias anti-EGFR, que serían aquellos pacientes con KRAS no mutado. A pesar de estos resultados no todos los pacientes KRAS no mutado presentan respuesta o incremento en la supervivencia tras recibir tratamiento anti-EGFR, siendo esta del 60% aproximadamente. Entre los diversos motivos para explicar esta falta de respuesta al tratamiento encontramos mutaciones en otros genes como BRAF (15% de los CCR con KRAS salvaje), NRAS (10% de los CCR sin mutaciones en KRAS), PI3K [65] o PTEN, o incluso mutaciones en el propio KRAS que no hayan sido analizadas [36] (Figura 9).

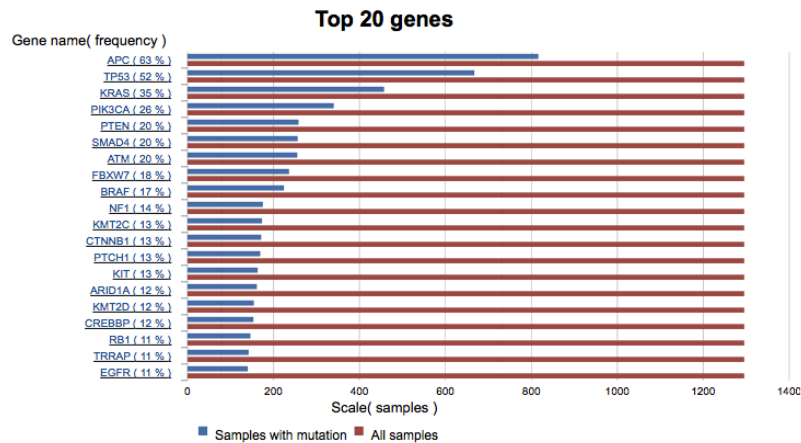


Figura 9. Principales mutaciones presentes en el CCR (COSMIC)

Por tanto las nuevas recomendaciones de la Sociedad Americana de Oncología incluyen el testar la presencia de las siguientes mutaciones en KRAS y NRAS debido a la nueva evidencia existente sobre la ausencia de beneficio del tratamiento con anticuerpos anti-EGFR en estos grupos de pacientes:

- KRAS exón 3 (codón 59 y 61) y exón 4 (codón 117 y 146).
- NRAS exón 2 (codón 12 y 13), exón 3 (codón 59 y 61) y 4 (codón 117 y 146).

V. Actividad de las KAT/ KDAC y cáncer.

En las dos últimas décadas, la acetilación de histonas ha sido objeto de intenso estudio por su destacado papel sobre la regulación de la expresión génica. Las lisina acetiltransferasas (KAT) se encargan de añadir grupos acetilos a los residuos de lisina de proteínas específicas, como parte del proceso de maduración post-traduccional que estas sufren hasta llegar a ser activas. Debido a la importancia que tiene este proceso de adición de grupos acetilo en las histonas, las KAT suelen llamarse de modo genérico HAT (histonas acetiltransferasas), pese a que su acción no se restringe de modo exclusivo a esas proteínas.

INTRODUCCIÓN

El proceso inverso al llevado a cabo por las HAT es realizado por las enzimas denominadas lisina desacetilasas (KDAC), más conocidas como histona desacetilasas (HDAC). Estas enzimas se encargan de la eliminación de los grupos acetilo presentes en residuos de lisina de proteínas concretas, siendo especialmente relevante su papel en la modificación de las histonas.

Entre los factores que se ven alterados en la carcinogénesis, las KDAC (y en ciertos casos las KAT) ocupan un papel que se muestra cada día más importante. La hipoacetilación de histonas está relacionada con la progresión de diversos tipos de tumores. Esta hipoacetilación puede deberse tanto a un descenso de la actividad de las HAT como a un incremento o alteración en la actividad de las HDAC. Por ejemplo, un incremento en la actividad de la HDAC1 está presente en cánceres de estómago, de próstata, de colon y de mama; la sobreexpresión de la HDAC2 se da en el cáncer de cuello de útero y de estómago; las HDAC3 y 6 también se expresan de forma anómala en tumores de mama y de colon, etc. La sobreexpresión de estas HDACs, así como su reclutamiento aberrante sobre promotores específicos, provoca en muchos casos la represión de genes supresores de

tumores, induciendo así la compactación de la cromatina de estos genes y por lo tanto su silenciamiento. Esto propicia la aparición y el desarrollo del tumor.

Esta actividad aberrante de las HDACs y su implicación en la progresión tumoral favoreció que se aprobase el uso de inhibidores de HDACs (vorinostat, romidepsin y belinostat) en los tratamientos de linfomas. No obstante, los fármacos inhibidores de HDACs han sido ineficaces como monoterapia en el tratamiento de tumores sólidos. Uno de los grandes problemas ha sido la toxicidad, debido en parte a la falta de especificidad de estos compuestos. Sin embargo si se han podido determinar resultados interesantes cuando estos inhibidores de HDACs se emplean combinados con otros fármacos, aumentando sus efectos anti-tumorales [66].

V.1. Papel de las KAT/KDAC en CCR.

En el CCR también se ha descrito la sobre-expresión de las diferentes HDACs; de hecho, se ha podido determinar que el tratamiento de células de CCR con butirato sódico, un inhibidor de KDACs, altera su respuesta a la apoptosis. En otro estudio dónde se empleaba el

butirato sódico sobre tejido tumoral del ratón, observaron un aumento en la acetilación de la histona H3, en regiones promotoras de diferentes genes clave para la apoptosis celular como FAS, p21 o p27. La sobreexpresión de estos genes llevó a la inhibición de la proliferación celular y a la inducción de la apoptosis [67].

Por otro lado, hay que destacar que las mutaciones de KRAS activan constitutivamente las principales rutas de señalización intracelular, que a su vez fosforilan y activan a las KATs. La activación tanto de la vía de MAPK como de AKT, induce la actividad de la KAT p300, facilitando su asociación con otras proteínas, aumentando la acetilación de histonas y regulando la expresión génica [68].

V.2. Papel de las KAT/KDAC sobre proteínas no histónicas.

Desde hace décadas se sabe que la acetilación de lisinas es importante para la función, interacción o estabilidad de diversas proteínas no histónicas como por ejemplo factores de transcripción tales como c-myc, STAT3

o NFkB, proteínas del citoesqueleto, chaperonas como HSP90 o incluso las propias KATs, entre otras.

En el cáncer también es importante el papel que desempeñan las KDACs en la acetilación de proteínas no histónicas. Por ejemplo, HDAC1 actúa sobre el factor supresor de tumores p53 desacetilándolo. Cuando HDAC1 se sobreexpresa, p53 se hipoacetila y pierde sus funciones, favoreciendo así dos características básicas de las células tumorales: la división descontrolada y la resistencia ante señales pro-apoptóticas [69]. Aunque las KDACs se han considerado importantes dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer, la realidad es que hasta la fecha se desconoce el mecanismo específico por el cual los inhibidores de KDACs tienen algún efecto beneficioso en tales terapias. Es más, aunque estos inhibidores se han utilizado con cierto éxito en la clínica, se ha podido demostrar que mientras que su efecto sobre la acetilación de histonas es el mismo para dos inhibidores de KDACs distintos (SAHA y MS-275), la acetilación de proteínas citosólicas es diferente para cada inhibidor. Por ejemplo, HSP90 una chaperona que se inactiva tras su acetilación, se hiperacetila en respuesta a SAHA, pero no en respuesta a MS-275. Previsiblemente, los distintos

inhibidores tendrán un efecto diferencial, no sólo sobre las proteínas acetiladas, sino de forma mucho más amplia. El bloqueo de HSP90 a través de la acetilación, resulta en una desestabilización de las proteínas que modula y que son críticas para la supervivencia de las células tumorales [70]. Resulta por tanto crucial, no sólo la identificación de aquellas proteínas que sufren esta modificación post-traducciona, sino de las vías de señalización que conducen a su acetilación y a la modulación de las KATs/KDACs implicadas. El éxito clínico de los inhibidores de KDACs en el tratamiento específico de algunos tipos de cáncer, así como de otras posibles patologías dependerá de ello.

Con respecto a las KATs/KDACs implicadas en la acetilación de proteínas no histónicas, se sabe que existen pocas KDACs citosólicas (fundamentalmente la HDAC6) y sin embargo se han descrito proteínas acetiladas de localización exclusivamente citoplásmica. Las HDACs -4 y -5, mediante un mecanismo modulado por las proteínas 14-3-3, viajan de forma constante del citosol al núcleo y viceversa [71]. La modulación de la actividad catalítica de estas HDACs tampoco se conoce con exactitud. En este sentido, se sabe que ERK1/2 interacciona y fosforila HDAC4 *in vitro* o incluso que en células tumorales en las

que la vía de KRAS se encuentra sobreactivada, HDAC4 está sobreexpresada, pero se desconoce el papel de dicha fosforilación sobre HDAC4 [72]. Otro dato interesante que sugiere un “crosstalk” entre fosforilaciones y acetilaciones, es que se ha podido demostrar que la propia proteína 14-3-3 se acetila y que la acetilación de esta proteína en determinados residuos bloquea su unión a proteínas fosforiladas [73].

Cada vez se hace más pausable la idea de una interconexión funcional entre las diferentes modificaciones post-traduccionales (acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación, etc). Al igual que en la fosforilación, la acetilación modifica una amplia variedad de proteínas celulares, pudiendo afectar a diferentes funciones biológicas incluyendo la afinidad de la proteína por el DNA o por otras proteínas, su estabilidad o incluso la localización subcelular de la proteína. En el estudio más amplio del acetiloma de células tumorales que se ha realizado hasta la fecha, se identificaron más de 1750 proteínas que sufren esta modificación post-traducciona, sin embargo, se desconoce en respuesta a qué estímulos fisiológicos y sobre todo patológicos se produce dicha acetilación y las consecuencias biológicas de la misma [73].

I. I

CoI

CC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

consideran ambos sexos, y continúa siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo a pesar del gran progreso que se ha experimentado con el desarrollo de nuevas terapias.

La introducción de nuevos agentes terapéuticos junto con el descubrimiento y validación de marcadores de predicción y pronóstico ha permitido individualizar las estrategias terapéuticas para maximizar la eficacia de estas. A pesar de todo ello, se ha registrado una elevada incidencia de resistencia a dichos fármacos. Entre los fármacos con mayor eficacia en el tratamiento del CCR, se encuentran los anticuerpos dirigidos contra la familia de receptores epidérmicos (HER). Sin embargo, la respuesta a estos fármacos está limitada tan sólo a un grupo de pacientes. La presencia de mutaciones en algunos de los genes de las vías de transducción de señales desencadenadas por estos receptores se ha relacionado con la resistencia intrínseca de las células tumorales a dicho tratamiento. En concreto, las mutaciones del oncogen KRAS, presentes en aproximadamente el 40% de los CCR, activan constitutivamente la vía de señalización por debajo de EGFR, por lo que son un factor predictivo negativo del tratamiento con anticuerpos anti-EGFR.

Por tanto, para incrementar la eficacia de los tratamientos en CCR en este tipo de pacientes con KRAS constitutivamente activo, sería necesario conocer las dianas moleculares de este oncogen así como los mecanismos moleculares implicados en la modulación de sus efectos biológicos.

Recientemente se ha sugerido que la resistencia a terapias anti-EGFR podría estar mediada por cambios de acetilación de proteínas histónicas y no histónicas

Existen datos en la literatura en los que se demuestra que la vía de RAS/RAF/MEK/ERK participa en la modulación de la actividad de la acetiltransferasa p300 [74, 75]. Por otro lado, se ha demostrado que la expresión y actividad de las KATs se encuentra incrementada en tumores colorectales humanos. [76-79]

El papel de la acetilación de histonas como factor epigenético regulador de la expresión génica ha sido ampliamente estudiado en diversos tipos de cáncer: leucemias, cáncer pancreático, cáncer de colon, etc. [80-82]

Sin embargo, la acetilación de proteínas no histónicas asociadas al CCR y el estado mutacional de KRAS no ha sido estudiado hasta la fecha.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de partida es que la actividad de desacetilasas/acetiltransferasas podría depender del estado mutacional de KRAS y que las dianas moleculares de estas KATs/KDACs podrían ser importantes factores de resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR que se observa en pacientes con KRAS mutado

II. OBJETIVOS

Nuestro objetivo global incluía determinar el papel de las mutaciones en KRAS sobre el estado de acetilación global de proteínas no histónicas en células de CCR, así como la identificación de dichas proteínas como posibles dianas moleculares de la activación constitutiva de la vía de KRAS. Para ello, utilizamos tres líneas de CCR, las HCT116 y sus derivadas con distinto estado mutacional para KRAS, las HAF1 y HAE6. Las tres líneas, disponibles comercialmente, fueron adquiridas el GRCF Biorepository and Cell Center de la Universidad Johns Hopkins.

Con este fin se han abordado una serie de objetivos concretos:

1. Caracterización del comportamiento tumoral (proliferación, adhesión y migración) y de las vías de señalización MAPK/AKT en las tres líneas de CCR cuya

única diferencia es el estado mutacional de KRAS. Idoneidad de las líneas celulares como modelo de estudio.

2. Estudio diferencial de la expresión génica global y del acetiloma en líneas celulares humanas de CCR con diferente estado mutacional de KRAS.
3. Identificación de las proteínas acetiladas, dianas moleculares de desacetilasas/ acetiltransferasas dependientes del estado mutacional de KRAS y estudio de la acetilación de dichas proteínas como parte de la respuesta a EGF.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cultivos celulares

Se utilizaron tres líneas de cáncer de colon como modelo de estudio, las HCT116 y sus derivadas con distinto estado mutacional para Kras, las HAF1 y HAE6. Las tres líneas, disponibles comercialmente, fueron adquiridas el GRCF Biorepository and Cell Center de la Universidad Johns Hopkins.

Las células se cultivaron bajo condiciones estándar a 37°C y 5% de CO₂ utilizando medio de cultivo de McCoy5A (Gibco), suplementado con 2nM glutamina (Sigma-Aldrich), 1% de los antibióticos penicilina/estreptomicina (Life Technologies) y 10% suero bovino fetal (FBS) (Gibco). Para el mantenimiento de las líneas celulares se utilizaron placas de 100 mm, mientras que para la realización de los experimentos se utilizaron placas de cultivo de 60 mm o bien placas de 6 pocillos de 30mm. Todos los experimentos se llevaron a cabo cuando las placas presentaron una confluencia de un 70-80%. En aquellos experimentos en los que se sometió a las células a un tratamiento, estas se lavaron exhaustivamente con PBS1x y se privaron de suero durante las 24h previas al tratamiento.

Los reactivos empleados en el tratamiento de las distintas líneas celulares fueron: Factor de crecimiento epidérmico (EGF, 20ng/mL), Tricostatina A (TSA, 0.5 μ M) ambos de Sigma Aldrich, y los inhibidores UO126 (10 μ M) de Promega y LY294002 (10 μ M) de Calbiochem.

II. Estudios de proliferación celular mediante marcaje con Bromodeoxiuridina.

Se midió la tasa de proliferación celular testando la tasa de incorporación de la bromodeoxiuridina (BrdU) al DNA mediante el kit de Calbiochem. Brevemente, las células se sembraron con una densidad de 5x10³ células/por pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos. Después de 24h deprivadas de suero, las células se trataron con factor de crecimiento epidérmico (EGF) 20ng/ml en un medio de cultivo libre de suero. La bromodeoxiuridina se añadió a cada pocillo en presencia o ausencia de EGF. En los tiempos indicados las células se fijaron durante 30min en soluciones de fijación o desnaturalización. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-BrdU (1:100) durante una hora, y tras sucesivos lavados se incubaron con un IgG HRP-conjugado durante 30min. Finalmente se añadió

substrato de tetrametil benzidina durante 15min y se bloqueó la reacción al añadir 1.25M de ácido sulfúrico. La absorbancia se midió en cada pocillo utilizando unas longitudes de onda de 450 y 540 nm.

III. Ensayo de viabilidad celular mediante reducción de MTT.

En algunos casos, tal y como se indica en el pie de figura correspondiente, la tasa de proliferación celular se determinó mediante ensayo por reducción de MTT (bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2-5-difeniltetrazólico). El ensayo de reducción de MTT es un método simple, utilizado para determinar la viabilidad celular y, de forma indirecta la proliferación celular, mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. Como consecuencia de la reacción, se produce un cambio de coloración del amarillo al púrpura.

Tras eliminar el medio de cultivo y lavar las placas dos veces con PBS a 37°C se añadieron 3mL de MTT (1mg/ml en medio DMEM, filtrado con filtros de 0.2µm) y se

incubaron las células durante 1h. Posteriormente se retiró la solución de MTT y se lavaron las placas con PBS 1x. Se añadieron 2mL de N-propanol y se incubaron de Nuevo las placas 30min, bajo agitación suave y protegidas de la luz. Finalmente se recogió 1mL de N-propanol y se centrifugó 2min a 12000g; se diluyó 1:4 y se midió la absorbancia a 560nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

IV. Ensayo de adhesión celular.

Para determinar la capacidad de adhesión celular de las diferentes líneas, en base al estado mutacional de *Kras* se emplearon frascos de cultivo de 35mm recubiertos con fibronectina ($2,5\mu\text{g}/\text{cm}^2$, BD Biosciences) a una temperatura de 37°C durante 1h. Tras lavar los frascos dos veces con PBS 1x, se sembraron las células a una densidad de 5×10^5 y se cultivaron a 37°C durante 2h. Posteriormente se realizó un lavado con medio de cultivo para eliminar las células no adheridas en ese tiempo y se cuantificaron las células adheridas de forma manual mediante un microscopio invertido. (Nikon Eclipse Ti).

V. Ensayos de migración celular mediante “Wound-healing”.

El wound-healing assay es una técnica sencilla para el estudio de la migración celular *in vitro*. Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos con el fin de conseguir una monocapa de células confluyente sobre la que se realizó una “herida” o raya con una punta de micropipeta manualmente, dibujando una línea recta por el centro de la placa. Finalmente, la capacidad de las células para migrar a la herida realizada se monitorizó tomando fotografías a unos tiempos determinados (0, 24 y 48h) a través del microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse Ti (10x Magnification) y, posteriormente, el área de la herida se determinó utilizando el software Image J.

VI. Extracción de DNA.

Para la extracción de DNA genómico partíamos de aproximadamente 5×10^6 células recogidas con PBS1x. Estas células en suspensión se centrifugaron 5 min a 300g, descartando el sobrenadante. Posteriormente el precipitado celular se resuspendió en 200 μ l de PBS1X y se incubó con 20 μ l de proteinasa K y 200 μ l de buffer de lisis, del kit comercial de QIAGEN (QIAamp DNA Mini kit) buffer) a

56°C durante 10 min. A continuación se añadieron 200µl de etanol (100%) y tras mezclar con vórtex se pasó la mezcla a una columna del kit, donde el DNA queda retenido en un filtro. Tras varios lavados con tampones de lavado incluidos en el kit, se añadieron 200µl de tampón de elución, se incubó 1 min y se centrifugó a 6000g durante 1min para recuperar el DNA purificado.

VII. Secuenciación de mutaciones somáticas

Las mutaciones somáticas más frecuentes en cáncer colorectal se secuenciaron utilizando OncoBasic S1 & S1.v2 y S2 & S2.v2 kits para la detección de mutaciones somáticas Sexplexing (utilizando un test de secuenciación Multiplex, Genetest). Estos kits permiten el estudio de 5 genes (AKT, KRAS, NRAS, BRAF y PI3K) a partir de 5ng de DNA.

Las secuenciaciones de estos genes en los exones indicados se llevaron a cabo en el servicio de secuenciación y genotipado de la Unidad Central de investigación de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Valencia (ver tabla en la sección de Resultados).

VIII. Extracción de RNA

Para el aislamiento de mRNA de las líneas celulares de cáncer de colon, primero se utilizó un reactivo comercial TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies) para lisar las células. A continuación, se purificó el lisado empleando una columna (RNeasy Mini Kit, Qiagen) de acuerdo las instrucciones del fabricante. El eluido final que contenía el mRNA se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Para la cuantificación de RNA se empleó el NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies), realizándose la medida espectrofotométrica a 260 nm. Hay que tener en cuenta las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , ya que la relación A_{260}/A_{280} indica el grado de pureza del RNA aislado respecto a la presencia de proteínas, considerándose libre de proteínas cuando el cociente alcanza 1.8; mientras que la relación A_{260}/A_{230} , es indicativo de la posible presencia de sales en la solución, carbohidratos u otros contaminantes, considerándose que el DNA es puro cuando este ratio se sitúa en torno 1.5-2.2. Y la integridad del RNA se estudió midiendo el 28S/18S ratio mediante un RNA 6000 Nano Labchips usando un Bioanalizador 2100 Agilent (Agilent Technologies).

IX. Transcripción reversa y PCR en tiempo real

La técnica RT-qPCR (retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa) sirve para cuantificar el mRNA en pequeñas cantidades e incluso en pequeño número de células. Partiendo del mRNA aislado y cuantificado, en primer lugar se realizó una retrotranscripción (RT) empleando para ello 2µg de RNA por muestra. Se utilizó el kit High-capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems). Las condiciones que se emplearon en el termociclador Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems) fueron las siguientes: 37°C durante 60min y después 95°C durante 5 min.

Una vez obtenido el cDNA, se prepararon las muestras por triplicado para la amplificación mediante qPCR de los genes específicos de estudio (1µl cDNA en un volumen de reacción de 10µl). Para llevar a cabo la reacción de amplificación se emplearon Taqman Universal Master Mix o Fast SYBR Green Master Mix (ambos de Applied Biosystems) y el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 50°C para conseguir un efecto "hot-start", 95°C durante 2 min y, a continuación, 40 ciclos de: 95°C durante 15seg y 60°C durante 1min.

MATERIALES Y MÉTODOS

Respecto a la familia de genes de las hnRNPs, se diseñaron cebadores específicos empleando la aplicación Primer-BLAST (Tabla II) y siendo el GAPDH su gen control o *housekeeping*. Para el resto de genes analizados por qPCR: KRAS, ADAM19, CATEPSINA C, CATEPSINA L y 18S se adquirieron sondas Taqman pre-diseñadas (Applied Biosystems) (Tabla III).

Tras analizar los resultados del real-time PCR se obtuvieron los diferentes Ct (Threshold cycle o ciclo umbral) para cada una de nuestras condiciones. El nivel de expresión relativa para cada uno de los genes se calculó a partir de la siguiente fórmula: $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. El programa informático que controló la reacción y permitió analizar los experimentos fue el SDS 2.3 (Applied Biosystems).

Tabla II. Cebadores específicos para nuestros genes diana de la familia hnRNP.

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
hnRNP A1	TAGGCTGGCAGATACGTTTCG	CGGGCTCTTTAGGAGACTCTG
hnRNPA3	TTGTGTGGTAATGAGAGACCCC	CACTACACGCCCATCAACCT
hnRNPA2/B1	CAGCGGCAGTTCTCACTACA	TTTCTCTCTCCATCGCGGAC
hnRNPL	CACCCCGCAGAATATGGAGG	CACTGGTGGACCCATCCTTC
GAPDH	CCAAGGTCATCCATGACAAC	TGTCATACCAGGAAATGAGC

Tabla III. Ensayos Taqman empleados en la cuantificación de genes

Gen	Nombre	Ensayo Taqman
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogen homolog	Hs00270666_m1
ADAM 19	ADAM metallopeptidasa dominio 19	Hs00224960_m1
CTPC	Catepsina C	Hs00175188_m1
CTPL	Catepsina L	Hs00964650_m1
18S	RNA Ribosomal 18S	Hs99999901_s1

X. Análisis de expresión génica mediante microarrays.

Los estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Multigénico de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Valencia; empleándose el biochip de Affymetrix *GeneChip® Human Gene 1.0 ST*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se realizaron con muestra de RNA procedente de tres experimentos independientes. A partir de 5µg de RNA total se sintetizó su DNA complementario con el kit *Ambion® WT Expression* (Applied Biosystems), mediante un proceso de transcripción reversa el RNA total es amplificado con el uso de cebadores aleatorios que contienen la secuencia del promotor T7. La reacción de amplificación sintetiza cDNA de cadena única que se convierte a DNA de doble cadena, el cual actúa como molde para la posterior transcripción. La reacción usa una DNA polimerasa y una RNasa H para simultáneamente sintetizar la segunda cadena de DNA y degradar el RNA inicial.

Una vez obtenido el cDNA de cadena doble, se llevó a cabo la síntesis del RNA antisentido mediante transcripción *in vitro* de la segunda cadena de cDNA, usando la polimerasa de RNA T7. Tras la incubación toda la noche de la reacción de transcripción *in vitro*, se procedió a la purificación del RNA antisentido mediante su captura con bolas magnéticas. Así las enzimas, sales, fosfatos inorgánicos y nucleótidos no incorporados al DNA fueron eliminados para mejorar la estabilidad del cRNA.

A continuación se realizó la síntesis de DNA de cadena simple mediante una transcripción reversa de la cadena de RNA antisentido. Para ello se utilizaron cebadores sintetizados al azar y tanto desoxiuridina trifosfato (dUTP) como desoxitimidina trifosfato (dTTP) en un ratio fijo, de forma que las cadenas de sDNA sintetizadas contenían ambos tipos de nucleótidos. Una vez sintetizada la cadena de DNA se hidrolizó el cRNA molde mediante la enzima RNasa H. Una vez degradado el RNA, se purificó el DNA de cadena simple para eliminar enzimas, sales y dNTPs no incorporados. Así, el cDNA de cadena simple con sentido ya estaba preparado para la fragmentación y marcaje posteriores.

Para llevar a cabo la fragmentación, el DNA de simple cadena se trató con uracil-DNA glicosilasa (UDG) y endonucleasaapurínica/apirimidínica (APE1) que reconocen específicamente los residuos de dUTP no naturales y rompen la cadena de DNA. Tras la fragmentación, se realizó marcaje terminal del DNA mediante la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), la cual une terminalmente a los fragmentos de DNA un reactivo que lleva unido covalentemente biotina.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de este momento se usó el kit *GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain* (Affymetrix). En primer lugar se hibridaron las muestras en los biochip *GeneChip® Human Gene 1.0 Sense Target (ST)*. Para ello se preparó un coctel de reacción al cual además de los reactivos y el DNA fragmentado (5,5 µg) se añadieron los controles de hibridación que permiten evaluar la eficiencia de hibridación de la muestra e indirectamente la calidad del RNA inicial. Este cóctel de hibridación se introdujo dentro en los biochips siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante (Applied Biosystems), y se mantuvo durante 16h a 45°C en el horno de hibridación *GeneChip® Hybridization Oven 640*.

Posteriormente, tras varios lavados, se procedió a la tinción y escaneado del biochip, gracias al escáner *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix). Completado el escaneo de los biochips, se obtiene una imagen (archivo .DAT) que se procesó mediante el Software Affymetrix *GeneChip® Command Console* (AGCC) dando lugar a un archivo .CEL. Dichos datos, obtenidos de los tres replicados para cada línea celular se analizaron empleando la librería Limma de la herramienta informática R/ Bioconductor [83].

Los genes expresados de manera diferencial se

identificaron a través de una comparación utilizando un t-Student por parejas. Se consideró como significativo una diferencia mayor a 0.05. Sólo aquellos genes con un doble cambio mayor de 1.5 fueron considerados como expresados de manera diferencial y candidatos a un estudio mayor ulterior.

Estos genes además se clasificaron de acuerdo a categoría biológica siguiendo los criterios de *Gene Ontology Consortium*, como se ha descrito en otras publicaciones previamente. [83]

XI. Extracción de proteínas

Las proteínas totales se extrajeron a partir de las placas de 6cm cultivadas con las distintas líneas de cáncer de colon. Para ello, se lisaron con tampón RIPA (1,8mM NaH₂PO₄, 8,4mM Na₂HPO₄, SDS 0,1% (p/v), Tritón-X100 1% (v/v), 0,1M NaCl, Deoxicolato sódico 0,5%) suplementado con 1mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 2µl/mL de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) y 5 µl/mL de inhibidores de fosfatasa (Calbiochem) y 10mM butirato sódico (Sigma Aldrich), usando una jeringa de 29G. Después de la homogenización, la muestra se incubó

MATERIALES Y MÉTODOS

durante 1h a 4°C en una máquina rotatoria seguido de una centrifugación a 4°C a máxima velocidad (14000g) durante 30min. El sobrenadante, que era el que contenía el extracto proteico, se recogió y se almacenó a -80°C hasta su cuantificación.

Las muestras de proteínas obtenidas se cuantificaron mediante el reactivo comercial Bradford-assay (Bio-Rad protein assay) siguiendo las instrucciones del fabricante, con un estándar de albúmina de suero bovina (BSA). El estándar BSA de proteína se prepara con un rango de diluciones de 0.05µg/µL a 0.5µg/µL. 2µL de cada muestra y estándar se pipetearon en diferentes pocillos de una placa de 96 pocillos, junto a 200µL de colorante diluido en cada pocillo. La muestra y el reactivo se incubaron 5min a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia en un lector Multiskan FC (Thermo Scientific) a 595nm.

XII. Western blot

Se prepararon entre 10 y 25 µg de extracto proteico para la electroforesis y estudio por Western Blot (WB). Para ello se desnaturalizaron con tampón de carga 5x (SDS-Laemmli

Buffer: 50% glicerol v/v, 10% SDS, 25% β -mercaptoetanol y 0,05% de azul bromofenol en tampón Tris-HCl 0,3 M pH 6,8) y calentando a 95°C. A su vez se prepararon geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) verticales de 1mm de espesor a un porcentaje variable entre 12 y 8% de acrilamida, dependiendo del tamaño de las proteínas de interés, para proceder a su separación por tamaño y carga.

Los geles se sumergieron en tampón de electroforesis (0,25 M pH 8,6 Tris-HCl; 1,92 M glicina, 1% SDS (p/v) preparado al 1x y se cargaron las muestras en los pocillos dejando un pocillo para el patrón molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder de 10 a 180 kDa). A los geles se les aplicó una diferencia de potencial primero de 80 V y, más a o menos cuando alcanzaba la mitad del gel, se les subió el voltaje a 120 V.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protran®, Whatman) utilizando tampón de transferencia (tampón Tris-HCl 0,25 M pH 8,6, 1,92 M glicina y 20% metanol (v/v)) aplicando una diferencia de potencial de 110 V durante 50 minutos, 60 V durante 90 minutos u over night (o/n). Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon durante una hora con BSA al 5% en TBS-T (0.25M TrisHCl pH 7.5, 0.15M

MATERIALES Y MÉTODOS

NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20) en agitación durante 1h a temperatura ambiente. seguido de la adición del anticuerpo primario (Tabla IV), preparado con BSA al 1% en TBS-T. Para todos los anticuerpos las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación, seguido de cuatro lavados con TBS-T. A continuación, las membranas se incubaron durante 1h con el anticuerpo secundario (dilución 1/5000), que esta conjugado con peroxidasa. Según el primerio sea de procedencia mouse o rabbit se añadirá anticuerpo secundario anti-mouse (Inmunoglobulins/HRP) (Ref. Dako, P0447) o anti-rabbit (Inmunoglobulins/HRP) (Ref. Dako, P0450).

Finalmente las membranas se lavaron con TBS-T y los inmunocomplejos formados en las membranas se revelaron usando un reactivo quimioluminiscente (ECL™ Western Blotting Detection Reagent. GE Healthcare). La reacción entre la peroxidasa y el luminol emite una señal luminosa que impresiona sobre una película fotográfica (Amersham Hyperfilm MP), que se reveló en una máquina Curix60 (AGFA). La intensidad de las bandas se midió mediante densitometría usando Image J, un dominio público del programa de procesamiento de Java. La igualdad de carga

se confirmó revelando contra β -actina, como control de carga.

Tabla IV. Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot

ANTICUERPOS	
PROTEINAS	COMPAÑÍA (ORIGEN)
hnRNPA1	Abcam (ab5832)
hnRNPA3	Abcam (ab50949)
hnRNPA2/B1	Abcam (ab64800)
hnRNPL	Abcam (ab6106)
GADPH	Abcam (ab8245)
Acetyl-Lys	Cell Signaling Technology (9441)
pAKT	Cell Signaling Technology (40665)
AKT	Cell Signaling Technology (9272)
ERK	Santa Cruz Biotechnology (sc-93)
pERK	Santa Cruz Biotechnology (sc-7383)
KRAS	Millipore (05-516)
Talin	Sigma-Aldrich (T3287)

XIII. Inmunoprecipitaciones

Partiendo de extractos de proteínas totales (500 μ g) procedentes de los distintos cultivos celulares, se realizaron inmunoprecipitaciones, con el fin de comprobar interacción entre dos proteínas, para ello se emplearon dynabeads

MATERIALES Y MÉTODOS

(Invitrogen, Life Tech). (50:50 v/v) que habían sido previamente bloqueadas con BSA $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 4h a 4°C . Las muestras fueron sometidas a preclearing con $30\mu\text{L}$ de estas beads durante 1h a 4°C . A continuación se centrifugaron a $12000g$ durante 5 min y el sobrenadante para cada condición experimental se incubó durante toda la noche con anticuerpos específicos o con suero normal IgG (Dako), como control negativo, en rotación a 4°C . Al día siguiente, se añadieron $50\mu\text{L}$ de beads con el objetivo de retener los complejos antígeno-anticuerpo (inmunocomplejos), los cuales después de centrifugar, precipitaron al fondo. Los sobrenadantes se descartaron, y cada sedimento (las beads junto con los inmunocomplejos) se lavó tres veces con Tris-HCl 0.05M pH 8, para retirar las impurezas y las uniones no específicas. Después de los lavados, los inmunocomplejos se hirvieron en tampón de carga para separar las beads y los anticuerpos de las proteínas inmunoprecipitadas. Luego se sometieron a western blot, como se ha descrito anteriormente. Un 1% de los extractos de proteínas utilizados para la inmunoprecipitación, se cargó como control positivo (Input).

XIV. Proteómica: Electroforesis bidimensional y análisis del acetiloma

Para cada una de las tres líneas celulares, 100 μ g de proteínas totales fueron sometidas a una electroforesis bidimensional (2D-DIGE), en el Laboratorio de Proteómica de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Valencia.

Para ello, las proteínas fueron sometidas a la primera dimensión, separándose en este caso, según su punto isoeléctrico gracias al uso de tiras IPG de 24cm, con un gradiente de pH (pH 3-11, GE Healthcare) en un Ettan IPGphor™ IEF System 3 (GE healthcare). Dichas tiras se cargaron a continuación, en la parte superior de un gel de acrilamida (12,5% de SDS-PAGE), para separar las proteínas en este caso en función del tamaño. Posteriormente los geles se tiñeron mediante un gel de tinción proteica SYPRO Ruby de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Posteriormente se obtuvieron las imágenes proteicas en un sistema Typhoon™ Trio Imager.

En paralelo los geles 2D fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa y analizados mediante western blot con un anticuerpo anti-acetil lisina (Cell Signalling

Tech.). Los puntos correspondientes a proteínas acetiladas se superpusieron al gel teñido de SYPRO Ruby previamente, con el objetivo de identificar los puntos o spots acetilados, que debían ser extraídos del gel y analizados por espectrometría de masas. Los materiales de los geles se procesaron mediante una estación de Massprep. El NanoLC-ESI-MS/MS y su posterior análisis se llevaron a cabo por el Servicio de Proteómica y Bioinformática del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra (Pamplona, España).

XV. Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados se expresaron en todos los casos como medias \pm SEM. Se analizó mediante un test de Student si existían diferencias significativas entre las respectivas medias. Se consideró que existían diferencias significativas entre las medias si la significación o el valor p eran inferiores a 0,05.

Para el análisis estadístico del wound-healing se aplicó un ANOVA de dos factores, obteniéndose las gráficas y los P valores con el software GraphPad Prism®.

Se realizaron estudios independientes con un mínimo de tres replicados por condición para permitir una comparación estadística de los mismos.

RESULTADOS

I. Líneas celulares con distinto estado mutacional de KRAS: Modelo para el estudio de sus dianas moleculares en el CCR.

Las mutaciones en KRAS^{G13D} conducen a la activación constitutiva de esta quinasa y de toda su vía de señalización. La consiguiente desregulación de las dianas moleculares de KRAS^{G13D} estimula, entre otros procesos, la proliferación, migración y adhesión celular en el CCR.

Con objeto de determinar si la eliminación de un alelo con una mutación activadora en *KRAS*^{G13D} podía ser un modelo relevante para investigar el papel del estado mutacional de *KRAS* en la modulación de sus dianas moleculares, en este estudio se utilizaron tres líneas celulares:

Las células HCT116 (*KRAS*^{G13D/WT}) con un alelo mutado y el otro salvaje, y sus dos clones isogénicos, HAF1 (*KRAS*^{WT/-}) y HAE6 (*KRAS*^{G13D/-}) a los que se les había delecionado un alelo G13D o WT respectivamente. Las tres líneas, mostraban además una mutación activadora en PI3K (H1047R/WT), genotipo bastante frecuente en pacientes con CCR.

RESULTADOS

I.1. Caracterización de líneas celulares de CCR con distinto estado mutacional de KRAS en condiciones basales.

I.1.1. Caracterización genotípica.

Para realizar la primera caracterización molecular de las tres líneas, se secuenciaron todos aquellos genes propuestos como marcadores con valor de predicción de respuesta a terapias antitumorales.

Como se muestra en la Tabla V, esta secuenciación seleccionada o “targeted” permitió caracterizar las principales mutaciones somáticas en las tres líneas isogénicas:

Tabla V. Genes y codones secuenciados para la detección de mutaciones somáticas en células de CCR.

Gen	Exon	Codons
<i>BRAF</i>	15	472, 594, 596, 600
<i>KRAS</i>	2	12, 13
	3	61
	4	117, 146, 147
<i>NRAS</i>	2	12, 13
	3	61
	4	117, 146, 147
<i>AKT1</i>	3	17
<i>PIK3CA</i>	2	60, 88, 110, 111
	4	345,
	7	420,

	9	542, 545, 546, 549
	20	1025, 1043, 1047, 1049

Sorprendentemente, aunque todas las mutaciones que se encontraron en la línea HCT116 también estaban presentes en las células HAE6, la línea celular HAF1 mostró tener una “hotspot mutation” $KRAS^{A146T}$ en el alelo considerado inicialmente como salvaje. Esta mutación no-canónica se localiza fuera de los codones más comúnmente secuenciados como son el 12, o 13. Localizándose en el codón 146.

La mutación en $KRAS^{A146T}$, aunque hasta la fecha no está bien caracterizada, es una de las mutaciones cuya aparición durante el tratamiento se ha descrito recientemente [84, 85].

Por tanto caracterizamos la línea celular portadora de una mutación de $KRAS^{A146T}$, comparada con HCT116, o HAE6.

1.1.2 Caracterización morfológica.

Posteriormente, se caracterizó morfológicamente las tres líneas celulares en unas mismas condiciones de crecimiento constante en medio al 10% FBS. Como se

RESULTADOS

muestra en la figura 10, se pudieron observar claras diferencias morfológicas entre las tres líneas celulares aparentemente relacionadas con el estado mutacional de KRAS.

La línea celular HAF1 portadora de un único alelo con una mutación en *KRAS*^{A146T} presentaba una morfología celular más redondeada, de mayor tamaño y un crecimiento en islotes formando rosetas. Por otra parte, las células HAE6 portadora de un único alelo *KRAS*^{G13D} mutado presentaba una morfología celular fusiforme y un crecimiento de células de forma aislada.

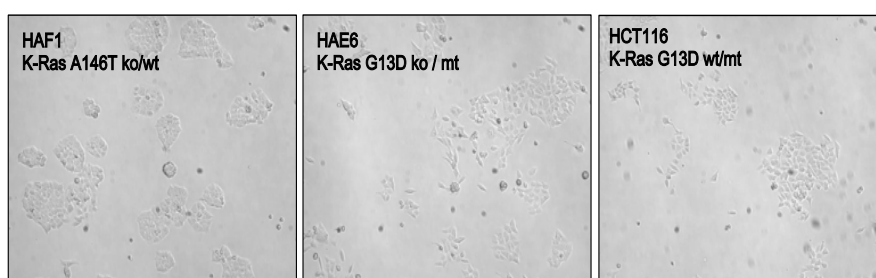


Figura 10. Caracterización morfológica de líneas de CCR. Imágenes de campo claro de células HAF1, HAE6 y HCT116 en condiciones basales. Las imágenes fueron tomadas tras 24h de cultivo en medio 10% FBS.

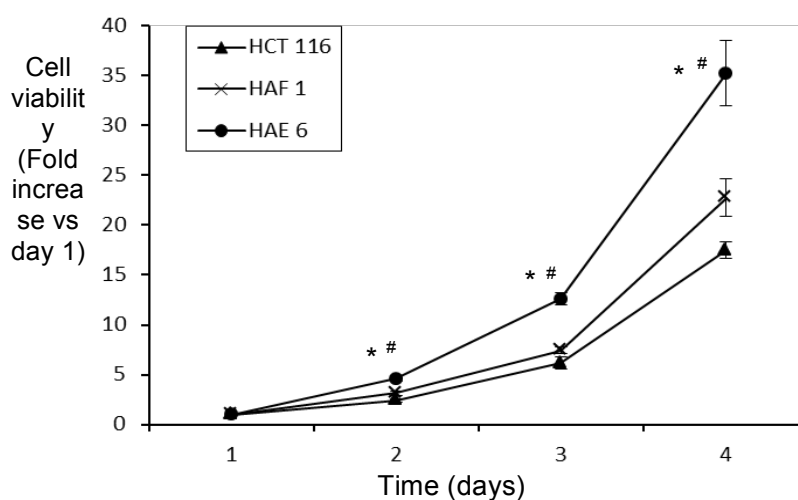
Este tipo de crecimiento podría sugerir una mayor capacidad metastásica dependiente del estado mutacional de KRAS. Consecuentemente con esta idea, las células HCT116 portadora de un alelo *KRAS*^{G13D} mutado y otro

salvaje, presentaba una morfología más similar a las células HAE6, con forma fusiforme aunque con mayor número de islotes celulares que la anterior.

1.1.3 Efecto del estado mutacional de KRAS en la proliferación celular.

Con el objeto de determinar si la proliferación de estas líneas celulares era dependiente del estado mutacional de *KRAS* las tres líneas celulares se cultivaron en condiciones de crecimiento continuo (10%FBS). La tasa de proliferación celular y curva de síntesis de DNA de cada línea celular se determinó mediante un ensayo de MTT y marcaje con BrdU respectivamente.

Es de destacar que en medio al 10% FBS la línea celular HAE6 (*KRAS*^{G13D/-}) mostró una proliferación significativamente superior a las otras dos líneas celulares, HCT116 y HAF1, entre las que no se encontraron diferencias significativas (Figura 11).



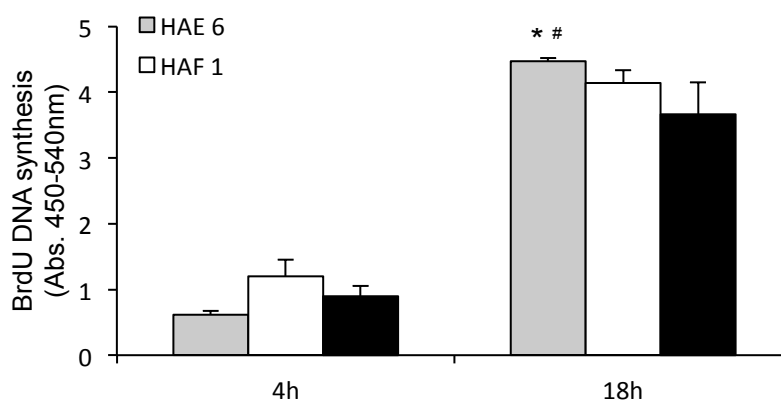


Figura 11. Proliferación y síntesis de DNA de células de CCR con distinto estado mutacional de KRAS. A. La proliferación de las tres líneas celulares durante 4 días en condiciones de crecimiento continuo (FBS 10%) se cuantificó mediante ensayo de MTT. Los resultados se expresan como veces respecto al día 1 para cada línea celular. **B.** Medida de síntesis de DNA mediante marcaje con BrdU en células HAF1, HAE6 y HCT116 tras 4 y 18h de crecimiento en medio con 10%FBS. * $p < 0.005$ vs. HAF1; # $p < 0.005$ vs. HCT116

exponencial de crecimiento, era significativamente superior en la línea celular HAE6 que en las otras dos líneas (Figura 11B)

1.1.4 Estudios de adhesión y migración celular.

Para estudiar la relevancia de la presencia de la mutación de *KRAS* sobre la invasividad celular, se llevaron a cabo análisis de adhesión y migración celular. Para ello, tal como se indica en el apartado de materiales y métodos, se midió

la adhesión celular a placas recubiertas de fibronectina tras 2h de plaqueo.

De acuerdo con los resultados previos, la línea celular HAE6 también mostró los niveles más bajos de adhesión celular (Figura 12); siendo éstos significativamente inferiores a los observados en HAF1 y HCT116. No se detectaron de nuevo, diferencias significativas entre HAF1 y HCT116.

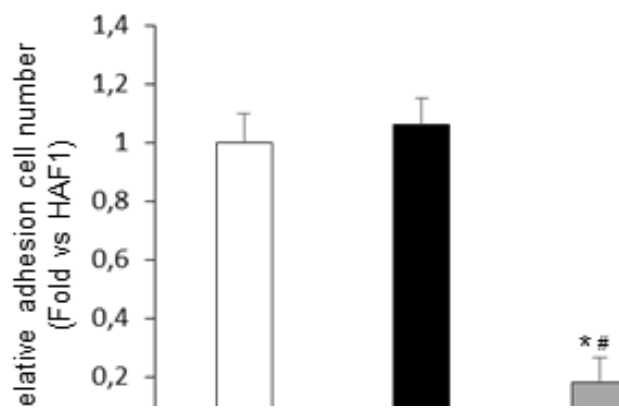


Figura 12. Adhesión celular en líneas de CCR Adhesión celular de HAF1, HCT116 y HAE6 a placas recubiertas de fibronectina. Las células adheridas tras 2h de plaqueo se contaron y los valores normalizados respecto al total de células plaqueadas se representaron como número de veces respecto a HAF1. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (n=4). * $p < 0.005$ vs. HAF1; # $p < 0.005$ vs. HCT116.

ensayo de “wound-healing” mostró diferencias significativas entre las tres líneas celulares que no habían sido observadas en los análisis previos. Como se muestra en la figura 13, se observó un gradiente de migración celular para

RESULTADOS

las tres líneas. HAE6 mostró la mayor tasa de migración, seguido de HCT116 y HAF1.

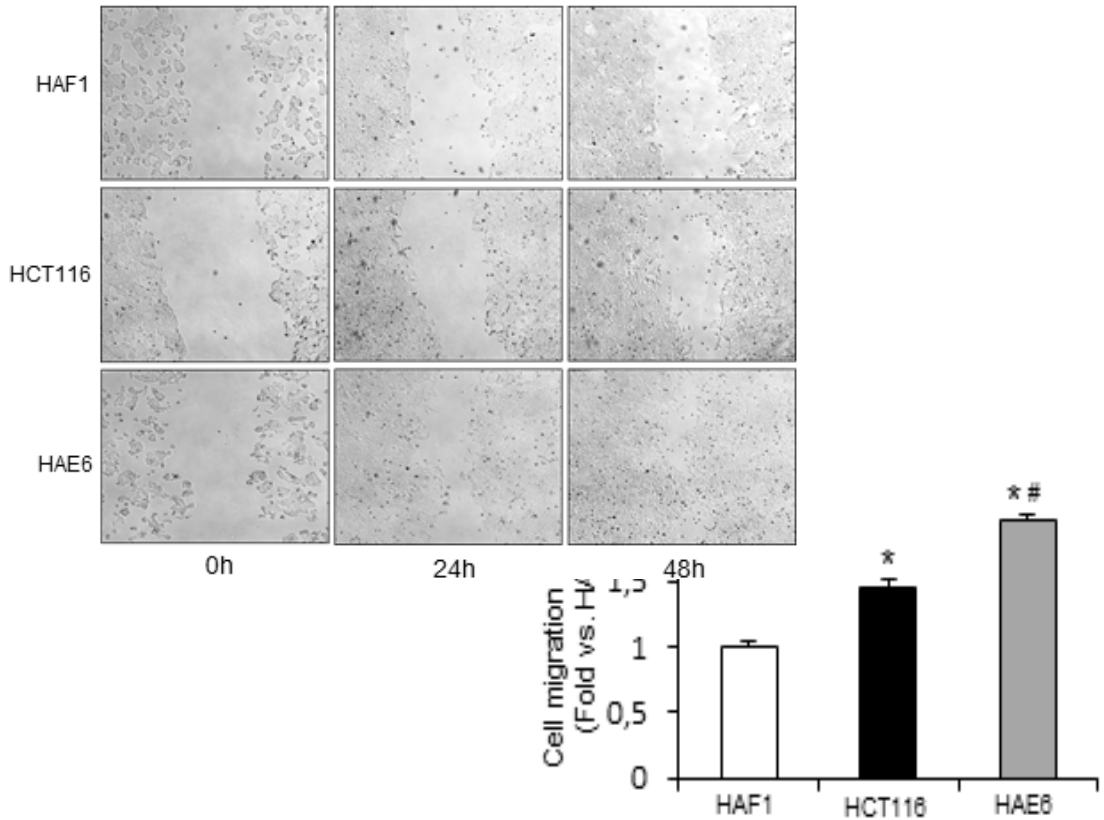


Figura 13. Migración celular en células de CCR. Análisis de migración celular mediante ensayos de “wound-healing”. Las imágenes de microscopio muestran la zona de la herida (paneles izquierdos), migración celular a las 24h (paneles centrales) y 48h (paneles derechos) de las tres líneas. **B.** La Migración celular a la zona de la herida se contabilizó a las 48h. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (n=4). * p<0.005 vs. HAF1; # p<0.005 vs. HCT116.

1.1.5 Efecto de la mutación de KRAS sobre la activación de ERK1/2 y AKT.

Se estudiaron los efectos de la mutación de *KRAS* sobre la activación de sus dianas moleculares en la vía RAS-RAF-MEK o PI3K-AKT-mTOR.

En condiciones de proliferación basal, no se detectó una activación o fosforilación diferencial en de ERK o AKT entre las líneas isogénicas. (Figura 14).

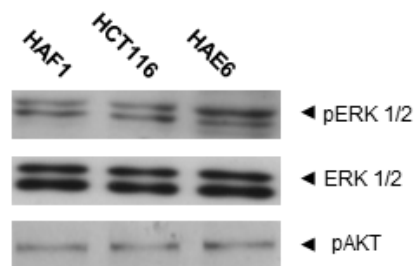


Figura 14. Efecto del estado mutacional de *KRAS* sobre la activación de ERK1/2 y Akt Los niveles de ERK y AKT totales y fosforilados se analizaron mediante Western Blot en las tres líneas celulares. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

Este resultado no es extraño ya que las tres líneas isogénicas eran portadoras también de una mutación activadora en *PI3KCA*.

En este sentido, numerosos modelos preclínicos han sugerido que los tumores portadores de una mutación en *KRAS* requieren de una inactivación conjunta de las dos vías moleculares principales RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT para poder bloquear de manera efectiva

mecanismos de retroalimentación, activación celular y cross-talk. [86, 87]. Por ejemplo la inhibición de MEK por un fármaco ya aprobado para comercialización como el selumetinib en pacientes con mutaciones de *KRAS*, puede estimular la fosforilación de AKT [88-90]. Por otro lado las mutaciones en PI3K/AKT y RAS/RAF coexisten con frecuencia en pacientes con tumores avanzados [91] y resistencia al tratamiento

De hecho, concretamente en el cáncer colorrectal se ha demostrado que puede existir una mayor resistencia al tratamiento en aquellos pacientes portadores de una doble mutación en *KRAS* y *PI3KCA* debido a una activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico en relación a mecanismos de retroalimentación.

I.2. Caracterización de la respuesta a EGF en líneas celulares de CCR con distinto estado mutacional de *KRAS*.

Los resultados anteriores sugieren que la mutación en *KRAS*^{A146T} es la que presenta un menor potencial tumoral. Sin embargo el crecimiento no-sincronizado de las diferentes líneas celulares podría dificultar el correcto

estudio de la influencia de *KRAS* en su respuesta a estímulos. Por tanto, para poder explorar en profundidad los efectos y dianas moleculares de la mutación en *KRAS*^{A146T} frente a los ya conocidos de la mutación en *KRAS*^{G13D}, las células HAF1 y HAE6 se cultivaron en medio en ausencia de suero y se estimularon con EGF.

Para descartar la posibilidad de que los efectos observados en estos experimentos fueran debidos a que el estado mutacional de *KRAS* afectara a sus niveles de expresión, previamente se hizo un análisis de expresión de *KRAS* mediante qPCR en ambas líneas celulares.

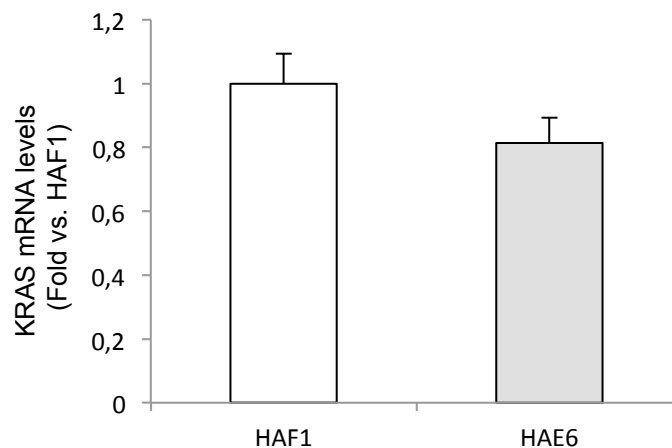


Figura 15. Expresión de *KRAS* en células HAF1 y HAE6 . Análisis de niveles de mRNA de *KRAS* mediante RT-qPCR. Los datos obtenidos se normalizaron por los niveles de 18S y representaron como la media \pm SEM vs. HAF1. No se encontró significación estadística.

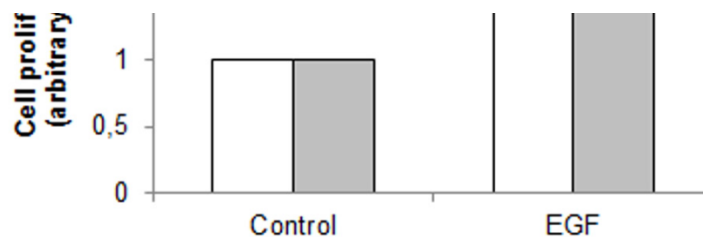
RESULTADOS

1.2.1. Efecto de estado mutacional de KRAS sobre la proliferación celular en respuesta a EGF.

La tasa de síntesis de DNA tras 24h de estimulación con EGF muestra que aunque este factor de crecimiento es capaz de inducir la proliferación celular en ambas líneas, existían diferencias significativas entre ellas (Figura 16). Al contrario de lo observado en los estudios con células en estado basal (10% FBS), las células HAF1 presentaban una mayor tasa de proliferación celular que las HAE6 en respuesta a EGF.

Este resultado sugiere que posiblemente, aunque la tasa de proliferación basal sea superior en aquellas células con una mutación KRAS^{G13D}, es precisamente esta mutación la que limita su capacidad de respuesta proliferativa a un estímulo.

Figura 16. Proliferación celular en respuesta a EGF. Análisis de síntesis de DNA mediante marcaje con BrdU en células HAF1 y HAE6 en presencia o ausencia de EGF (20ng/ml). Los datos se expresan como veces sobre controles sin tratar. Media \pm SEM (n=4). * p<0.05 EGF vs. Control no tratado.



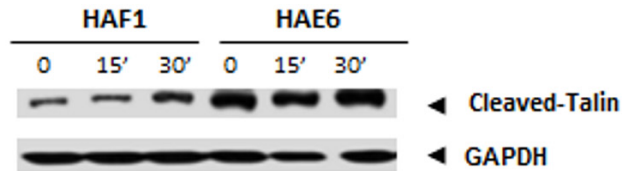
1.2.2. Efecto de estado mutacional de KRAS sobre la adhesión y migración celular en respuesta a EGF.

Los experimentos de adhesión celular no pudieron realizarse en un medio libre de suero ya que la línea celular HAF1 no toleraba su tripsinización después de 24h sin aporte de suero. Un aumento el corte de la proteína de adhesión celular, talina, se ha relacionado con una menor adhesión celular [92].

La adhesión celular se midió por tanto de forma indirecta analizando mediante western blot los niveles de talina cortada. Como se observa en la figura 17A, y en consonancia con los experimentos descritos en la figura 12 en células sin estimular, los niveles de talina truncada eran ya superiores en células HAE6 a los encontrados en células HAF1 sugiriendo una menor capacidad de adhesión de las células HAE6 y por tanto mayor capacidad invasiva. El análisis de respuesta a EGF en ambas líneas parece confirmar esta hipótesis. Efectivamente, mientras que el procesamiento de la talina se inducía en respuesta a EGF en células HAF1, este corte proteolítico permanecía

RESULTADOS

constante en las células HAE6 a lo largo de la curva de tratamiento con EGF. Sin embargo, en respuesta a EGF se observa que aunque los niveles de talina cortada eran constantes en HAE6, seguían siendo superiores en esta línea celular a los máximos alcanzados en las células



HAF1.

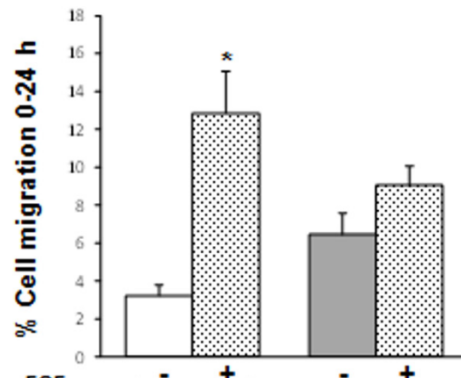


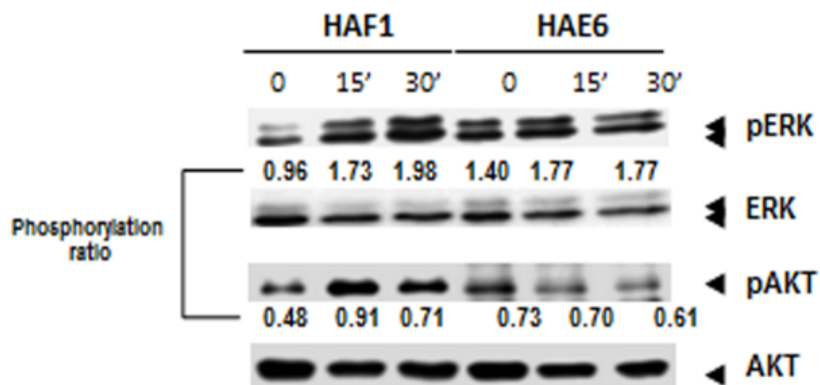
Figura 17. Adhesión y migración celular en respuesta a EGF.
A. Adhesión celular determinada mediante análisis de los niveles de talina cortada por western blot, tras el tratamiento con EGF (20ng/ml) a los tiempos indicados. Se utilizó la expresión de GAPDH como control de carga. Experimento representativo de n=3. **B.** Migración celular mediante "wound healing" en presencia o ausencia de EGF. Los datos se expresan en porcentaje de migración sobre el área inicial a las 24h tras la herida. Media \pm SEM (n=4). * p<0.05 EGF vs. Control no tratado.

Los resultados derivados del análisis de migración celular también muestran que las células KRAS^{G13D} resultan insensibles al tratamiento con EGF (Figura 17B). Mientras que en las células HAF1 se observa un aumento de la migración celular en respuesta a EGF, no se pudieron encontrar diferencias significativas entre células HAE6 estimuladas o sin estimular con el factor de crecimiento.

1.2.3. Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la activación de ERK1/2 y AKT en respuesta a EGF.

Dados los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se podría especular con la hipótesis de que la hiperactivación de ERK1/2 inducida por la mutación en KRAS^{G13D} pudiera alcanzar un plató más allá del cual las células no pudieran ser sobre-estimadas con EGF.

Efectivamente, el análisis de activación de las vías de RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K mediante western blot muestra que aunque EGF induce rápidamente la fosforilación de ERK1/2 y AKT en células HAF1, la respuesta al factor de



crecimiento en células HAE6 es apenas detectable. Tal y como se muestra en la figura 18, aunque los niveles de fosfo-EK1/2 en células HAE6 estaban considerablemente elevados en las células sin tratar, permanecían inalterados

Figura 18. Vías de señalización de KRAS en células tratadas con EGF. Niveles de ERK y AKT totales y fosforilados analizados mediante Western Blot en células HAF1 y HAE6 tras el tratamiento con EGF (20ng/ml) a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. El ratio de fosforilación indica niveles de proteína fosforilada/proteína total.

descrito en la literatura para otras líneas celulares portadoras de mutaciones en ambos genes PI3K y KRAS, el factor EGF no sólo no indujo la fosforilación de AKT, sino que incluso la disminuye considerablemente.

II. Efecto del estado mutacional de KRAS en el acetiloma global en el cáncer colorectal.

De todos nuestros experimentos anteriores se podría deducir que las líneas celulares utilizadas reflejan de alguna forma el panorama que se encuentra con frecuencia en pacientes con CCR y por tanto constituiría un modelo relevante para estudiar el efecto del estado mutacional de

KRAS sobre dianas moleculares por debajo de KRAS en la vía de señalización.

En este sentido una reciente publicación [93] proponía que la vía de PI3K/AKT promovía la resistencia al tratamiento con gefitinib (inhibidor actividad tirosin-kinasa del EGFR) en tumores con mutaciones en KRAS. El grupo sugería que la causa principal de esta resistencia estaba relacionada con un mecanismo dependiente de la acetilación proteica. Este grupo argumentaba que la interacción entre BAX y Ku70 estaba regulada por mecanismos dependientes de la acetilación proteica [93]. El grupo mostró que tratando las células con los inhibidores de desacetilasas, tricostatina A o sirtuina se conseguía sensibilizarlas al tratamiento con gefitinib debido a la inhibición de la fosforilación de AKT y la liberación de BAX de su unión con Ku70.

Se estudió por tanto, si el acetiloma global estaba modificado por la presencia de mutaciones activadoras en *KRAS*, como en nuestro caso *KRAS*^{G13D} y *KRAS*^{A146T}.

II.1. Acetiloma global de líneas celulares HCT116, HAF1 y HAE6

Las tres líneas celulares se cultivaron en medio suplementado con FBS 10%. Posteriormente las proteínas

RESULTADOS

se aislaron, inmunoprecitaron y finalmente analizaron en un western blot mediante anticuerpos anti-acetil(Lys).

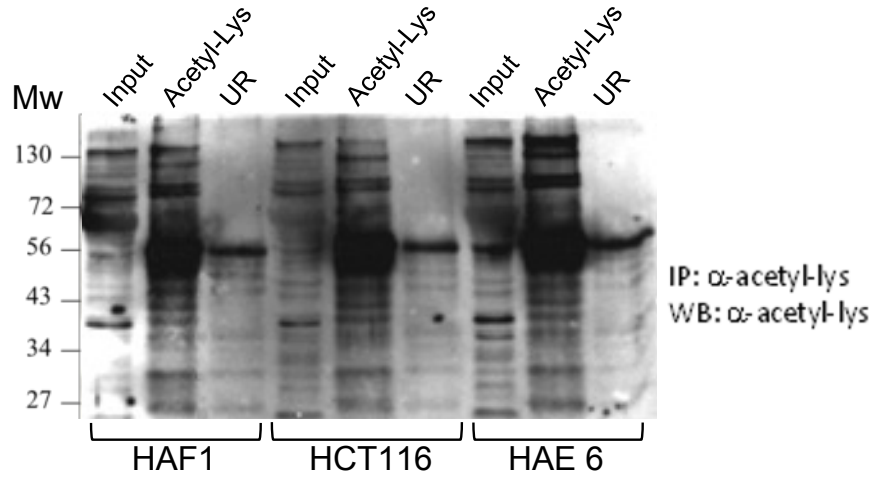


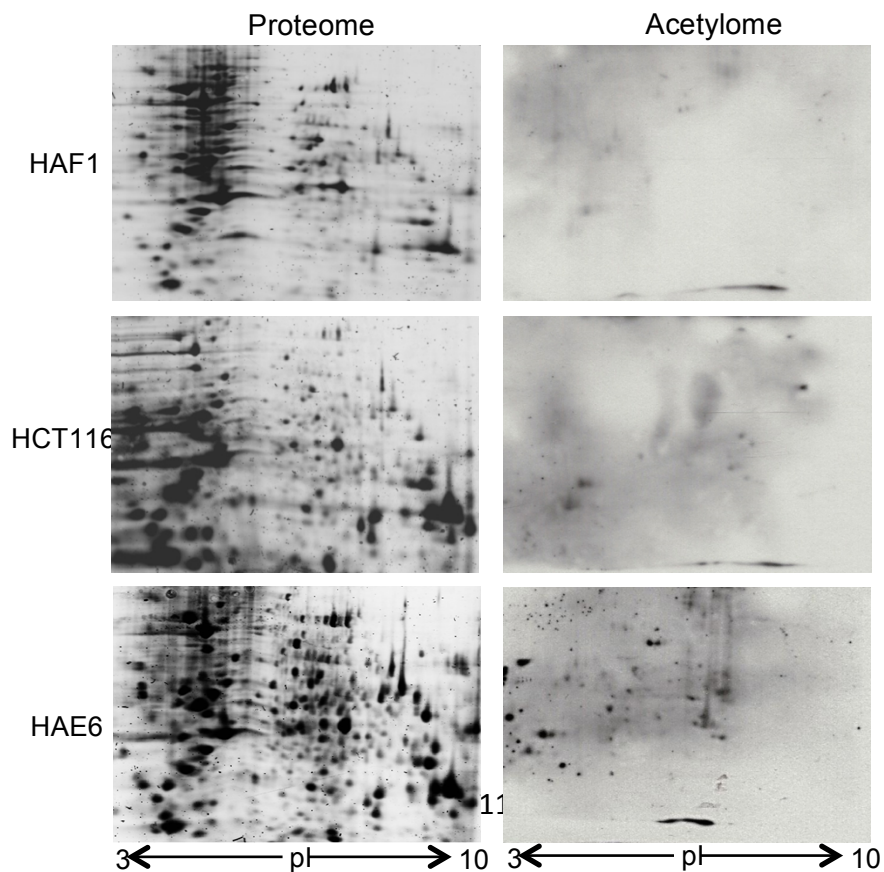
Figura 19. Niveles de acetilación de proteínas en células de CCR. Extractos proteicos de cada línea celular inmunoprecitados y análisis mediante WB con anti cuerpos anti-acetil(Lys). Se cargaron como Input un 1% de cada muestra sin inmunoprecipitar. Se utilizó IgG de suero de cabra control de especificidad de la inmunoprecipitación (UR).

Es de destacar que el patrón global de acetilación de las tres líneas celulares era marcadamente diferente y aumentado en la línea celular HAE6. (Figura 19)

Con objeto de realizar un estudio más exhaustivo del acetiloma de las líneas celulares, se llevó a cabo un análisis proteómico mediante geles 2D seguidos de western blot con anticuerpos anti-acetil(Lys) .Coincidiendo con nuestro

análisis preliminar, y de acuerdo con el número de “spots” detectados en los geles 2D, el acetiloma global de las células HAE6 era mayor que el de las células HAF1 (Figura 20).

Estos resultados sugieren una posible correlación entre la acetilación de proteínas diana y la mayor capacidad de proliferación, migración y adhesión celular observada en las células HAE6. Por tanto, la acetilación de determinadas proteínas podría tener un papel importante en la modulación de la invasividad tumoral de las células de CCR, en particular de las células HAE6.



Para estudiar las proteínas diana cuya acetilación depende

Figura 20. Análisis del acetiloma de células de CRC. Perfiles de expresión proteica de la línea celular HAF1, HCT116 y HAE6 en geles 2D-PAGE, teñidos con SYPRO ruby (paneles izquierdos) o trasferidos y analizados por western blot con anticueros anti-acetil(Lys) (paneles derechos). El pH aumenta de izquierda a derecha en la abcisa y el peso molecular disminuye desde arriba abajo en la ordenada.

del estado mutacional de KRAS, los “spots” positivos se escindieron del gel y se identificaron por espectrometría de masas. Aunque se consiguieron identificar un total de 67 “spots”, tan sólo se seleccionaron aquellos con una puntuación de Mascot dentro del rango de confianza y un elevado grado de coincidencia con los péptidos. Tal como se muestra en la tabla VI, con estos criterios se identificaron 36 proteínas diferencialmente acetiladas en HAE6.

Mediante un estudio bibliográfico y usando la base de datos de PubMed que permite identificar el interactoma de las diferentes proteínas, se observó que muchas de estas proteínas se habían descrito en publicaciones previas como dianas potenciales de acetiltransferasas o deacetilasas, ya que aparecían acetiladas bajo diferentes circunstancias.

Algunas de ellas incluso, se había demostrado experimentalmente que interaccionaban de forma directa con una acetiltransferasa o desacetilasa (Tabla VI).

RESULTADOS

Biological process	Molecular function	Accession number	Symbol	Protein Name	Interacting Deacetylase	Reference	Interacting Acetyltransferase	Reference	Reported acetylation	
Cell growth and/or maintenance	Structural molecule activity	P68363	TAB1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	HDAC6	EMBO J. (2003) 22(5):1168-79 Cell Death Differ. (2013) 20(10):1305-16		n.d.	J Cell Biol. (1987) 104(2):289-302.	
		P60709	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1		n.d.	p300 KAT5	Mol Syst Biol. (2011) 7:538 J Biol Chem. (2010) 285(13):9556-68. Cell. (2000) 102(4):463-73.	Curr Opin Cell Biol. (2013) 25(1):30-8	
		P63261	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2		n.d.	KAT5	Cell. (2010) 143(2):313-24	Curr Opin Cell Biol. (2013) 25(1):30-9	
		P02545	LIMNA_HUMAN	Lamin-A/C		n.d.	KAT5	Cell. (2005) 122(6):957-68	Science. (2009) 325(5942):834-40	
		P14136	GFAP_HUMAN	Glial fibrillary acidic protein		n.d.		n.d.	n.d.	
	Cytoskeletal anchoring activity	P15311	EZR1_HUMAN	EZRIN			n.d.		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40
		Catalytic activity	P31930	OCR1_HUMAN	Cytochrome b-c1 complex subunit 1.	SIRT7	Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40
			P40826	MDHM_HUMAN	Malate dehydrogenase, mitochondrial	HDAC5	Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M110		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40
			P00505	AATM_HUMAN	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	HDAC5	Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M111		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40
			P23526	SAHH_HUMAN	Adenosylhomocysteinase	HDAC5 SIRT1	Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M112		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40
P04075	ALDOA_HUMAN		Fructose-bisphosphate aldolase A	HDAC5	Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M113		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40		
RNA metabolic process	RNA binding	P04406	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	SIRT1	Nat. Cell Biol. (2010) 12(11):1094-100	p300 KAT5	Nat Cell Biol. (2008) 10(7):866-73 Mol Cell. (2004) 15(6):853-65	Science. (2009) 325(5942):834-40	
		P00338	LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	HDAC5	Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M113	PCAF KAT5	Science. (2009) 325(5942):834-40	Science. (2009) 325(5942):834-40 & spectrometry platform Henk Stunnenberg	
		P22234	PUR6_HUMAN	Multifunctional protein ADE2	SIRT7	Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40	
		P11940	PABP1_HUMAN	Polyadenylate-binding protein 1	SIRT7 HDAC5	Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M109		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40	
		P14866	HNRP1_HUMAN	Heterogeneous nuclear	HDAC5	Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M110		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40	
		P09651	ROA1_HUMAN	Heterogeneous nuclear	HDAC5	Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M111		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40 & spectrometry platform Henk Stunnenberg	
Energy Metabolism	Catalytic activity	P22626	ROA2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HDAC5	Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M112		n.d.	Anal Chem. (2009) 81(11):4493-501 Science. (2009) 325(5942):834-40 & spectrometry platform Henk Stunnenberg	
		P51891	ROA3_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	SIRT7 HDAC5	Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M113		n.d.	Science. (2009) 325(5942):834-40	
		P17844	DDX5_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	HDAC1 HDAC2 HDAC3	J Biol Chem. (2010) 285(6):5428-37. Oncogene. (2007) 26(40):5865-76. J Biol Chem. (2010) 285(40):30445-52.	CBP/p300	Oncogene. (2003) 22(1):151-6	Science. (2009) 325(5942):834-40	

Protein metabolism	Chaperone activity	P78371	TCPB_HUMAN	T-Complex protein 1 subunit beta	HDAC3 HDAC5 SIRT7	<p> Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M109 Mol. Syst. Biol. (2013) 9(0):672 Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
		P49368	TOPQ_HUMAN	T-Complex protein 1 subunit gamma	HDAC3 HDAC6 SIRT7	<p> Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M109 Mol. Syst. Biol. (2013) 9(0):672 Cell Death Differ. (2013) 20(10):1306-16 Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
		P48643	TCPE_HUMAN	T-Complex protein 1 subunit epsilon	HDAC3 HDAC5 HDAC6 SIRT7	<p> Genes dev. (2002); 16(24):3130-5 Mol. Syst. Biol. (2013) 9(0):672 Cell Death Differ. (2013) 20(10):1306-16 Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
		P40227	TCPZ_HUMAN	T-Complex protein 1 subunit zeta	n.d.	n.d.	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
		P50990	TCPO_HUMAN	T-Complex protein 1 subunit theta	HDAC1 HDAC2 HDAC5	<p> PLoS Pathog. (2010) 6(6):e1000865 Mol. Syst. Biol. (2013) 9(0):672 Mol Cell Proteomics (2012) 10(2):M109 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
		P08107	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HDAC1 HDAC2 SIN3A SIN3B	<p> Mol Cell. (2003) 12(3):723-34 Genes Dev. (2003) 17(7):986-911 </p>	ep400	Science. (2009)325(5942):834-40
		P11021	GRP78_HUMAN	78kDa glucose-regulated protein	SIRT3 HDAC5 HDAC6	<p> Proteomics (2009) 9(9):2444-56 Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M109 Cell Death Differ. (2013) 20(10):1306-16 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
	Heat Shock protein activity	P11142	HSP7C_HUMAN	Heat shock 71kDa protein	HDAC3 HDAC1 HDAC2 SIN3A SIN3B HDAC6 HDAC10	<p> Genes dev. (2002); 16(24):3130-5 Genes Dev. (2003) 17(7):986-911 Cell Death Differ. (2013) 20(10):1306-16 J. Biol. Chem. (2010) 285(10):7167-76 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40 Anal Chem. (2009); 81(11):4935-501.
		P10809	CH60_HUMAN	60kDa heat shock protein, mitochondrial	HDAC1 HDAC5 SIRT1 SIRT3	<p> J Biol Chem. (2002) 277(1):3590-7 Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M110 10(2):M110.004317 Proteomics (2009)9(9):2444-56 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
	Translation regulatory activity	P49411	EFTU_HUMAN	Elongation factor Tu, mitochondrial	HDAC 5 SIRT7	<p> Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M110 Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
		Q13347	EIF3L_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit l	SIRT2 SIRT7	<p> Nature (2012) 482(7348):251-5 Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
		P13639	EF2_HUMAN	Translation Elongation factor 2	n.d.	n.d.	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
Cell communication; signal transduction; apoptosis	Calcium-dependent binding	P08133	ANXA6_HUMAN	Annexin A6	SIRT7	<p> Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
		Q8WUM4	PDC6L_HUMAN	Programmed cell death 6-interacting protein	SIRT7	<p> Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
	Voltage-gated anion channel activity	P21796	VDAC1_HUMAN	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	SIRT7 HDAC5	<p> Mol Cell Proteomics (2012) 11(5):60-76 Mol Cell Proteomics (2011) 10(2):M109 </p>	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40
Unknown process	Unknown function	O75083	WDR1_HUMAN	WD repeat-containing protein 1		n.d.	n.d.	Science. (2009)325(5942):834-40

n.d.: Not described

II.2. Análisis funcional de las proteínas diferencialmente acetiladas.

El estudio de la función biológica de las proteínas acetiladas demostró que estas proteínas podían agruparse en cuatro categorías principales; primero crecimiento y mantenimiento celular, segundo con el metabolismo energético, tercero con el procesamiento metabólico del RNA y finalmente con el metabolismo proteico. (Figura 21).

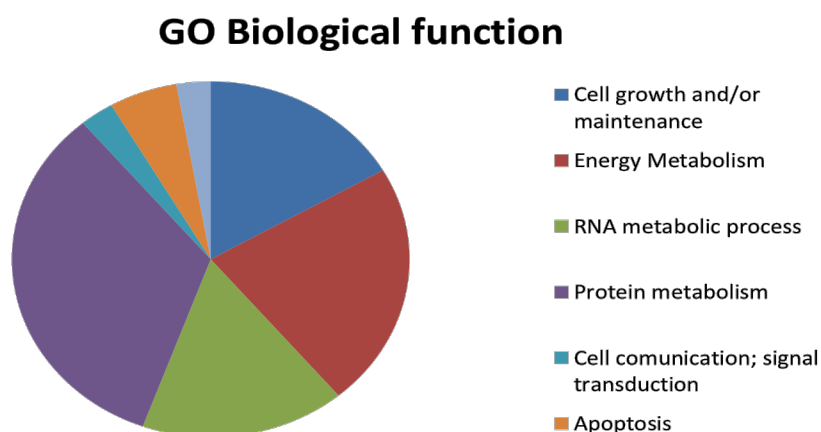
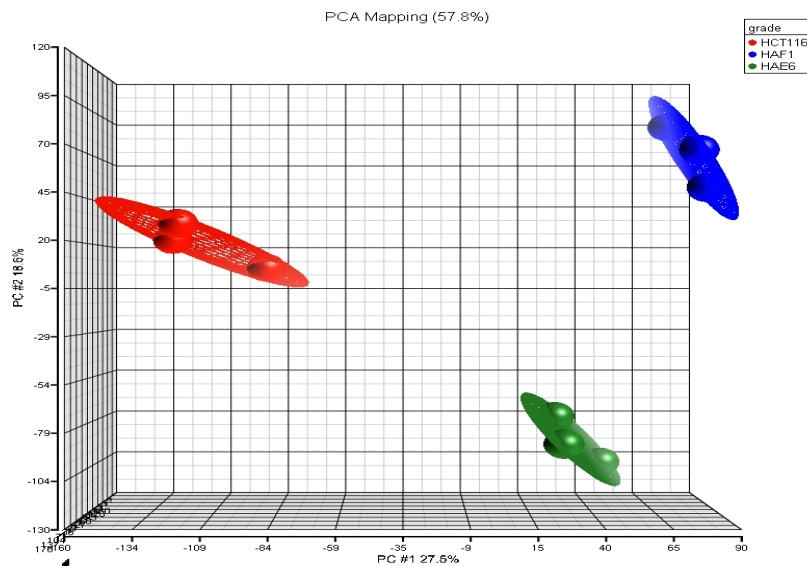


Figura 21. Distribución de funciones biológicas. Representación gráfica de la distribución de funciones biológicas asignadas a las proteínas identificadas en el acetiloma de las líneas celular HAE6.

III Perfil de expresión génica de células de CRC con distinto estado mutacional de KRAS

Para poder determinar los posibles efectos del estado mutacional de KRAS sobre la transcripción global de genes,

realizamos un análisis de expresión mediante microarrays de Affymetrix de las tres líneas celulares, HAF1, HCT116 y HAE6. Los datos obtenidos fueron procesados y analizado el mapa de PCA (Principal Component Analysis) para asegurar la homogeneidad de resultados en las tres muestras utilizadas para cada línea (Figura 22). El análisis de mRNA total de las tres líneas cultivadas en condiciones de crecimiento continuo mostró una distribución de cada línea homogénea y bien diferenciada del resto (tabla de



datos incluida en un CD anexo).

RESULTADOS

El análisis de expresión de las muestras se realizó tomando como referencia la expresión génica obtenida en las células HAF1. Como se observa en los diagramas de Venn (Figura 23), aquellas líneas celulares portadoras de una mutación *KRAS*^{G13D} en un alelo, HAE6 y HCT116, estaban en su mayoría infra-expresados respecto a la línea celular HAF1. Sin embargo, la mayoría de los genes no presentó diferencias de expresión significativas. Y tan sólo una minoría mostró un sobre-expresión diferencial entre las líneas celulares.

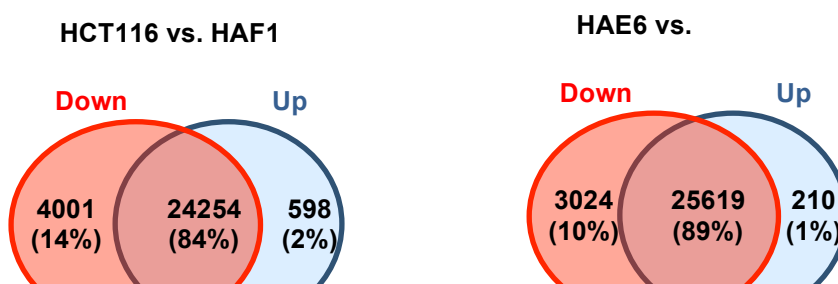
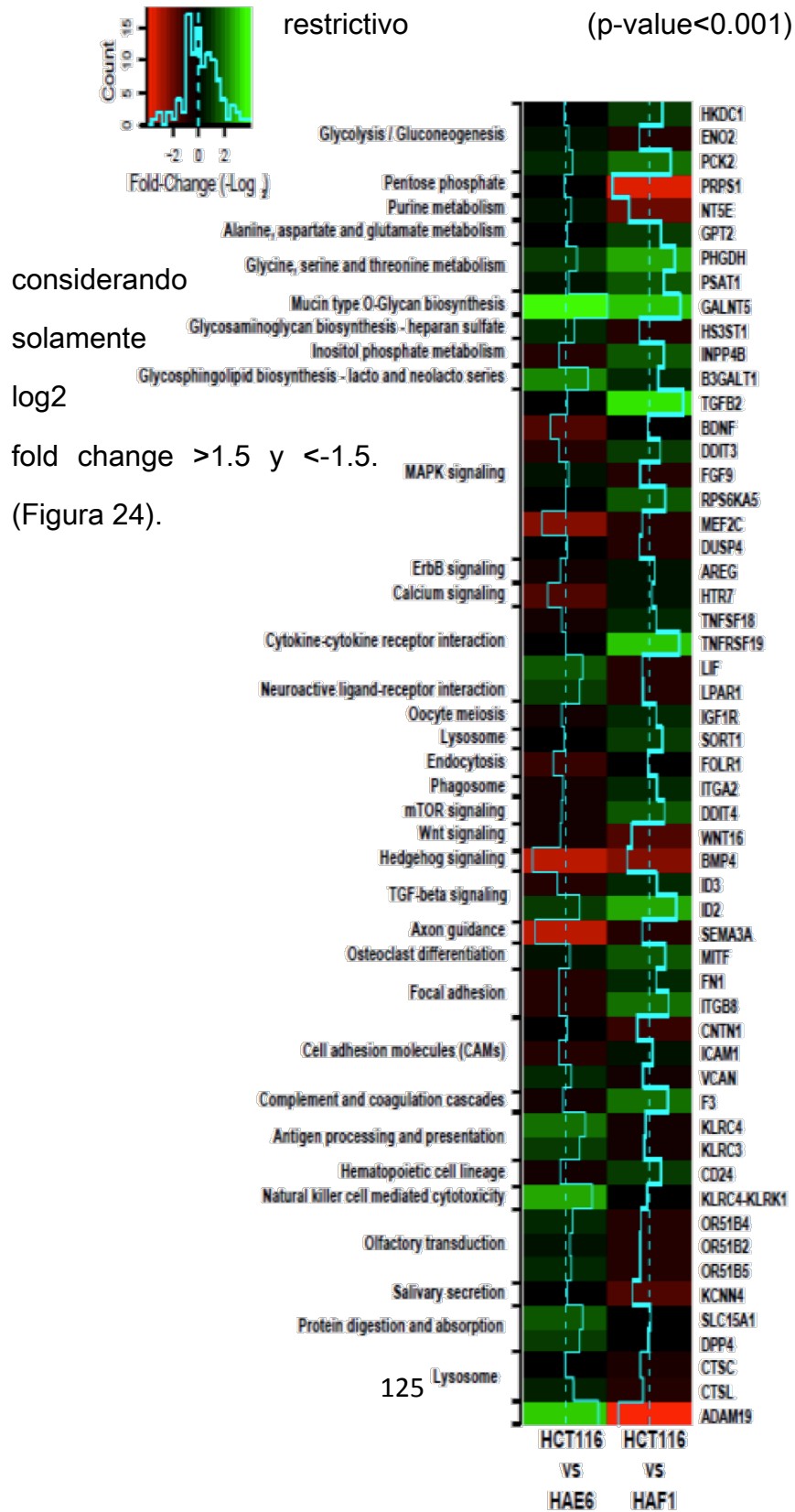


Figura 23. Análisis global de expresión en células de CCR. Diagrama de Venn en el que se muestra el porcentaje de genes aumentados o inhibidos en las dos líneas celulares portadoras de la mutación de *KRAS*^{G13D} HAE6 y HCT116 comparado con los niveles de mRNA encontrado en la línea celular HAF1.

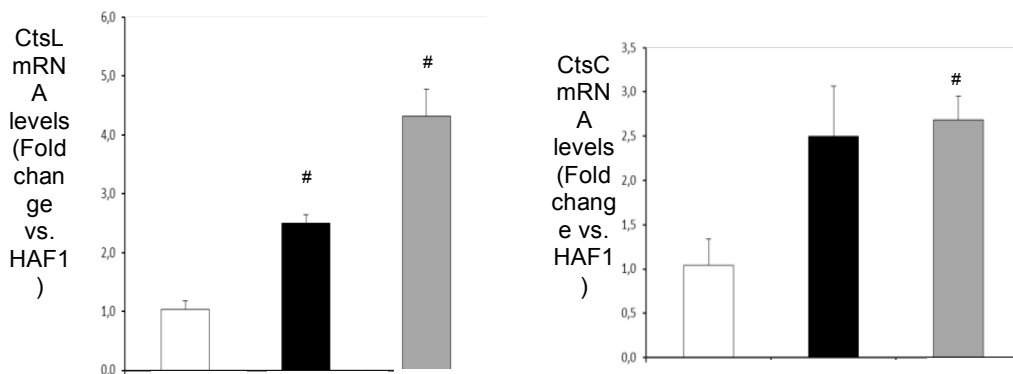
Con objeto de determinar si entre los genes de expresión diferencial encontrados en las líneas HAF1 y HAE6 se encontraba sobre-representada alguna vía de señalización o función molecular o biológica, se realizó un análisis más



RESULTADOS

Figura 24. Heat map representando los genes que se expresan diferencialmente ($p\text{-value} \leq 0.001$) en HAE6 y HAF1 comparándolos con la línea parental HCT116. El símbolo de cada gen se indica a la derecha, mientras que la vía de señalización o metabólica en la que están implicados se muestra a la izquierda. El aumento o disminución de cada gen se expresa mediante gradiente de colores (ver leyenda en la parte superior izquierda).

Además, para validar los datos obtenidos, se llevó a cabo una qPCR de una selección de genes que aparecía sobre-expresados en las células HAE6 frente a las HAF1. Entre ellos se seleccionaron la catepsina L, la catepsina C y Adam 19 por su destacado papel en la invasividad tumoral, la liberación y/o activación de factores de crecimiento, así como en el desarrollo de resistencias a tratamientos diana en el cáncer colorectal. [92, 94]



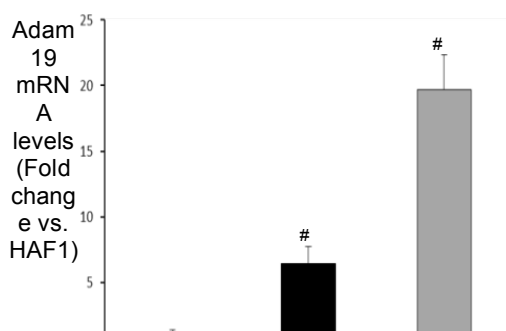


Figura 25. Validación de genes expresados diferencialmente por microarray. Los niveles de expresión de catepsina C, catepsina L y Adam19 se analizaron mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron respecto al 18S. Los datos se representan como veces frente a HAF1. Media \pm SEM (n=3). # $p < 0.05$ vs HAF1

La expresión de los tres genes se induce de forma muy llamativa en las células con un alelo mutado en KRAS^{G13D} (Figura 25), con independencia de la presencia o ausencia de un segundo alelo, confirmándose con ello los datos obtenidos en el microarray.

Por otro lado, entre los genes cuya expresión era marcadamente inferior en HAE6 vs HAF1, la vía de señalización más destacada era la del EGFR1, con 43 genes de los 156 que componen la vía canónica cuya expresión se encontraba inhibida.

RESULTADOS

No obstante, también se observó una reducción de expresión de genes incluidos en otras vías de señalización de respuesta a citoquinas y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento derivado de la insulina tipo 1 (IGF1), el factor transformante de crecimiento β (TGF β), el factor de necrosis tumoral α y varias citoquinas. Este resultado no es sorprendente, dado que la mayoría de estas vías comparte algunos de sus pasos con la vía de señalización de KRAS.

Finalmente, es interesante destacar que entre los genes cuya expresión no variaba de forma significativa entre las líneas celulares, se encontraban aquellos que previamente habían sido identificados en el análisis del acetiloma (Tabla VII y anexo CD). Este resultado confirma que las diferencias en el patrón de acetilación que se había encontrado no están causadas por un cambio en los niveles de expresión de las proteínas correspondientes.

IV. La acetilación de la familia de las hnRNP en las células de CCR

De todo el grupo de proteínas sometidas a acetilación potencialmente dependiente de *KRAS*, se seleccionaron las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas o hnRNPs. [95, 96]. Se eligió a esta familia de proteínas debido a su implicación en una gran variedad de funciones moleculares desde el procesamiento del mRNA, a su transporte, estabilización o incluso traducción.

IV.1. Análisis de la posible acetilación basal de hnRNPs dependiente del estado mutacional de KRAS.

Se analizaron en las líneas celulares HAF1 y HAE6 si los niveles basales de acetilación de las hnRNPs era dependiente de la presencia de la mutación en *KRAS^{G13D}* o *KRAS^{A146T}*. Para ello, se cultivaron las células en condiciones de crecimiento continuo (10% FBS). Los niveles de acetilación se determinaron mediante inmunoprecipitación de proteínas con anticuerpos dirigidos contra acetil-Lys seguidos de un western blot con

RESULTADOS

anticuerpos que reconocen específicamente los distintos miembros de la familia hnRNP.

Como muestra la figura 26, la hnRNPA1 y hnRNPA2/B1 se encontraban hiperacetiladas en HAE6 en comparación con HAF1. Sin embargo este patrón no resultó tan claro cuando se analizaron otros miembros de la familia como hnRNPA3 o L. Es posible que la hiperacetilación de hnRNPA1 y A/B, o incluso la acetilación de hnRNPL y A3 que se ha encontrado en este análisis esté causada por una expresión diferencial de los miembros de esta familia en HAE6 frente HAF1.

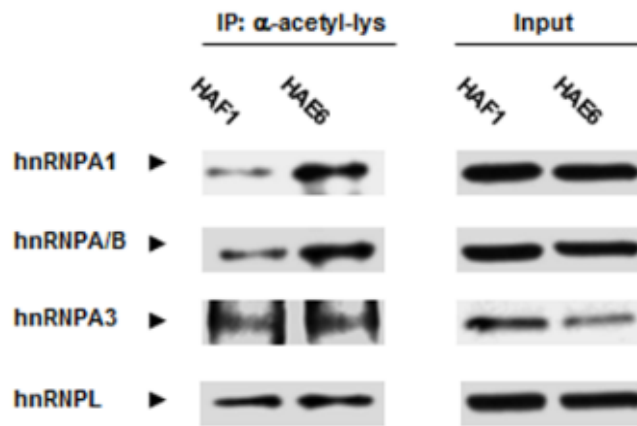


Figura 26. Acetilación de hnRNPs en células de CCR $KRAS^{G13D}$ y $KRAS^{A146T}$. Los extractos totales de ambas líneas celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-acetil(Lys) y se analizaron por western blot con los anticuerpos anti-hnRNP correspondiente. El panel derecho muestra los inputs para cada hnRNP. Experimento representativo de (n=3).

Aunque en nuestros microarrays de expresión no encontramos diferencias de expresión de estos genes, para descartar esta posibilidad, se analizaron los niveles de expresión de los cuatro miembros de la familia hnRNP mediante qPCR o western blot a partir de muestras de células HAE6 y HAF1 en condiciones de crecimiento continuo (10% FBS) (Figura 27).

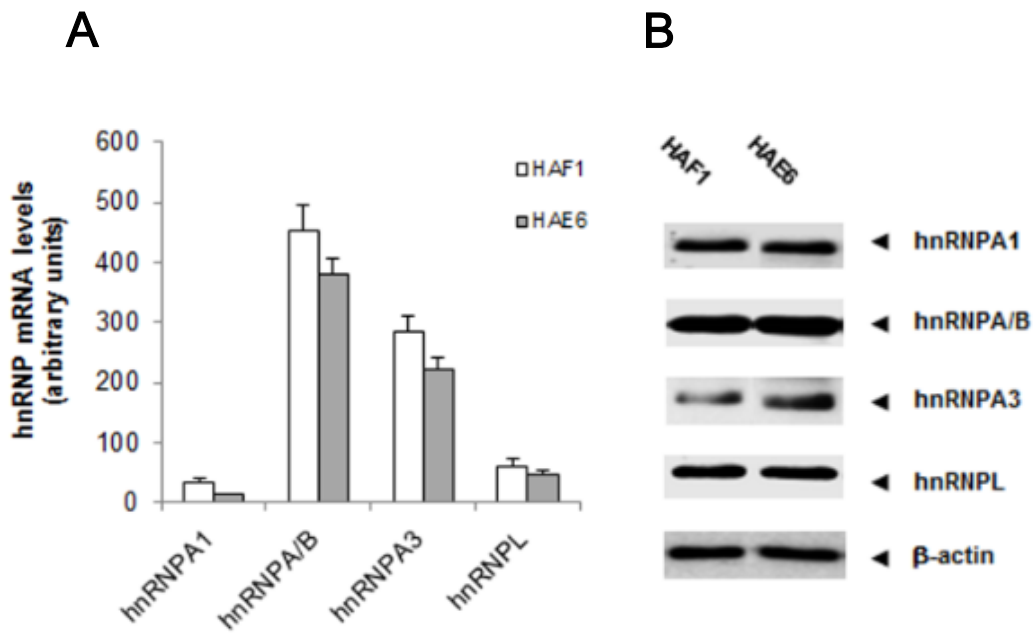


Figura 27. Niveles de expresión de hnRNPs en en células de CCR KRAS^{G13D} y KRAS^{A146T}. A. Los niveles de mRNA de cada hnRNP se analizaron mediante RT-qPCR (n=3). Los datos se normalizaron por los valores de GAPDH. B. Niveles proteicos de cada hnRNP medidos por western blot. La expresión de β-actina se utilizó como control de carga.

----- de q. ... y ... que los niveles de expresión no eran significativamente diferentes entre las líneas celulares. Por tanto podemos concluir que la hiperacetilación observada en las hnRNPs de las células HAE6 respecto a las HAF1, no era el resultado de una mayor expresión génica o estalización proteica en esta línea celular.

En resumen, estos datos no sólo validan nuestros resultados anteriores sino que destacan de nuevo una posible correlación entre tumoración, acetilación y presencia de mutación en *KRAS^{G13D}* en la línea celular HAE6.

IV.2 Acetilación de la hnRNPA1 y L en respuesta a EGF

Aunque la acetilación de las hnRNPs ha sido descrita previamente en otros tipos celulares, hasta la fecha se desconoce si esta acetilación es parte de la respuesta a EGF en células de CCR. Si este fuera el caso, sería importante determinar si el estado mutacional de KRAS puede condicionar la inducción de una acetilación diferencial de hnRNPs en respuesta a EGF.

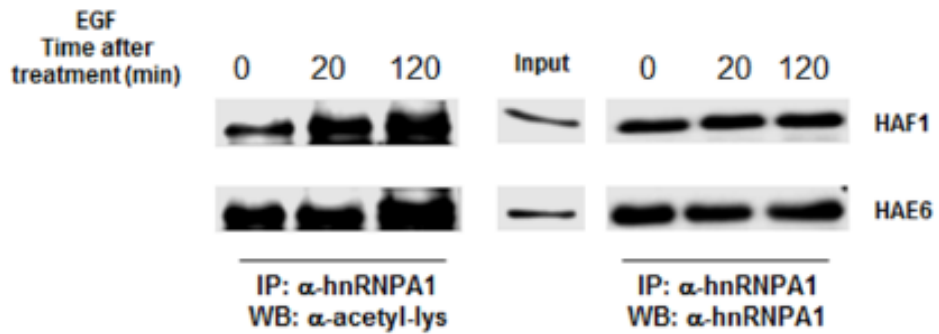
Ambos tipos celulares, HAF1 y HAE6 se cultivaron por tanto en ausencia de suero y se estimularon con EGF durante dos periodos de tiempo, corto (20 min) y largo (2h). Las muestras procedentes de cada condición experimental se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-hnRNPA1 o anti-hnRNPL. Se seleccionaron estas dos hnRNPs dado que

RESULTADOS

representan aquellas isoformas de la familia de hnRNPs que habían mostrado en los experimentos anteriores (Figura 26) las mayores diferencias de acetilación cuando se compararon las líneas HAF1 y HAE6.

Para establecer con exactitud el ratio de acetilación (acetil-hnRNP/total hnRNP), las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a un posterior análisis mediante western blot con anticuerpos anti-acetil(Lys) o la anti-hnRNP correspondiente.

A



B

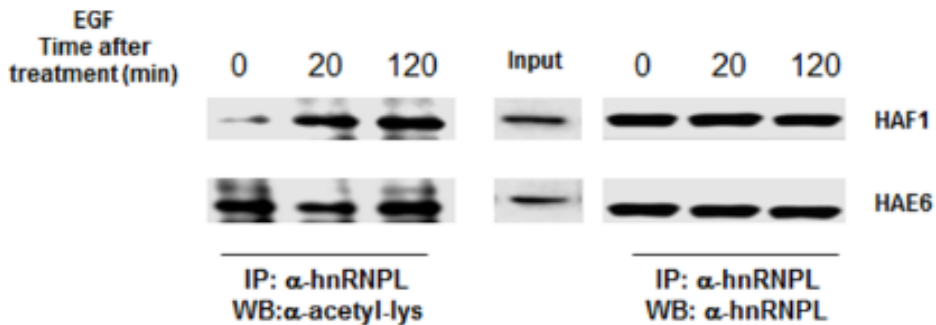


Figura 28. Acetilación de la hnRNPA1 y L en respuesta a EGF. Las líneas celulares HAF1 y HAE6 se cultivaron en un medio libre de suero y se estimularon con EGF (20ng/ml) durante 20 y 120 min. Las proteínas se inmunoprecipitaron contra hnRNPA1 (A) y hnRNPL (B). Los inmunoprecipitados (n=3) se analizaron mediante western blot contra anti-acetil(Lys) o la hnRNP correspondiente (panel izquierdo y derecho respectivamente). Los inputs de cada inmunoprecipitación se muestran en el centro.

células HAE6 que en HAF1 (Figura 28, carril 0). Sin embargo, no se pudieron observar diferencias significativas en la acetilación final de estas hnRNPs en respuesta a EGF. En cualquier caso, es interesante destacar que la acetilación de hnRNPs, basalmente alta en las células HAE6, no cambia sustancialmente durante la curva de tratamiento con EGF (Figura 28). Por el contrario, el tratamiento de las células HAF1 con EGF induce una potente acetilación de ambas hnRNPs.

Finalmente, para descartar la posibilidad de que el efecto observado sobre la acetilación de hnRNPs estuviera causado por cambios en el patrón de expresión o de síntesis de estas proteínas, se realizó un análisis de mRNA y proteínas mediante qPCR (Figura 29) y western blot respectivamente (Figura 30).

RESULTADOS

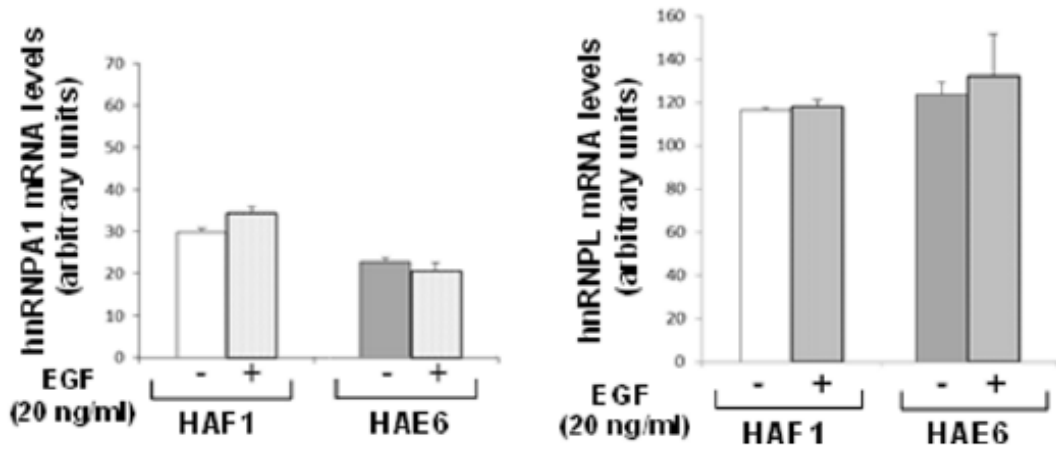
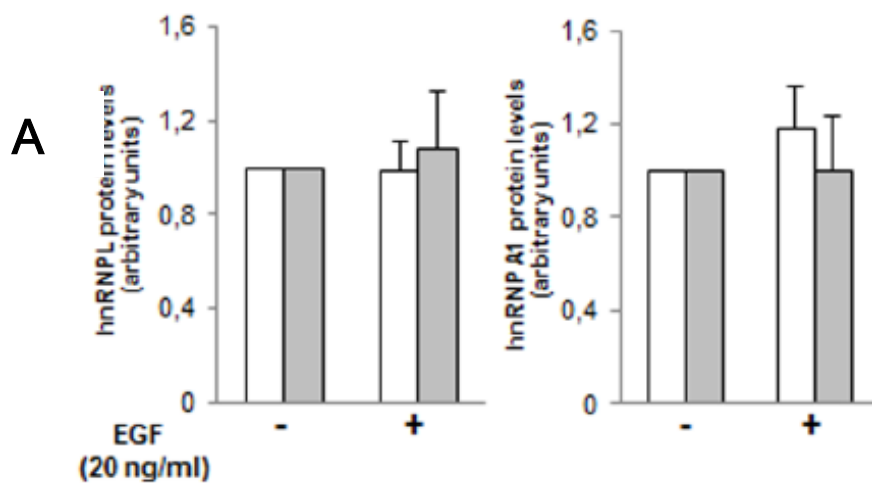
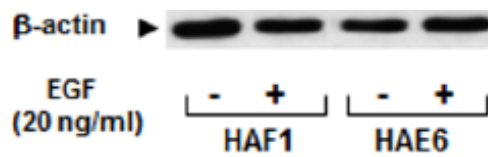


Figura 29. Niveles de mRNA de hnRNPA1 y -L en respuesta a EGF. Los niveles de expresión de hnRNPA1 (izquierda) y hnRNPL (derecha) se cuantificaron mediante RT-qPCR en células HAF1 y HAE6 en presencia o ausencia de EGF (2h). Los valores obtenidos se normalizaron por los niveles de GAPDH (n=3). No se encontraron diferencias significativas.



B

Figura 30. Niveles proteicos de hnRNPA1 y -L en respuesta a EGF. **A.** El análisis por western blot muestra los niveles de hnRNPA1 y -L en células HAF1 y HAE6 tras el tratamiento con EGF durante 2h. **B.** La intensidad de las bandas obtenidas por western blot se densitómetró y normalizó frente a β -actina. Los datos se representaron como veces sobre el control no tratado (barras blancas HAF1 y barras grises HAE6).

niveles de mRNA de ambas hnRNPs como los niveles de proteínas permanecen invariables tras el tratamiento con EGF tanto en células HAE6 como en las HAF1. Consecuentemente, se puede concluir que la acetilación de hnRNPs inducida por EGF en las células HAF1 no es una consecuencia de la modulación de la transcripción, traducción o estabilidad de estas proteínas.

De los experimentos anteriores podríamos deducir que la mutación en KRAS^{G13D} favorece una elevada acetilación de ambas hnRNPs que permanece constante e insensible al

tratamiento con EGF. Por otra parte, estos datos sugieren que la presencia de una mutación $KRAS^{A146T}$ permitiría mantener la capacidad de respuesta de las células al tratamiento con EGF.

IV.3 Papel de la mutación $KRAS^{A146T}$ en la acetilación de las hnRNPs.

Con el objetivo de estudiar el papel de la mutación de $KRAS^{A146T}$ sobre la acetilación de las hnRNPs, se inhibió de manera específica la vía celular de $KRAS$ en la línea celular HAF1.

Independientemente de la mutación de $KRAS$, esta línea celular también es portadora de una mutación en $PI3KCA$. Para analizar el efecto de la acetilación de hnRNPs dependiente de EGF, se trataron por tanto ambas líneas celulares con inhibidores de las dos vías, MEK1/2 (U0126) y PI3K (LYS294002).

La inhibición efectiva de una sola de las vías, ya fuera mediante la inhibición específica de MEK1/2 o de PI3K (Figura 31B), no tuvo ningún efecto sobre los niveles de acetilación de las hnRNPs inducida por EGF (Figura 31A).

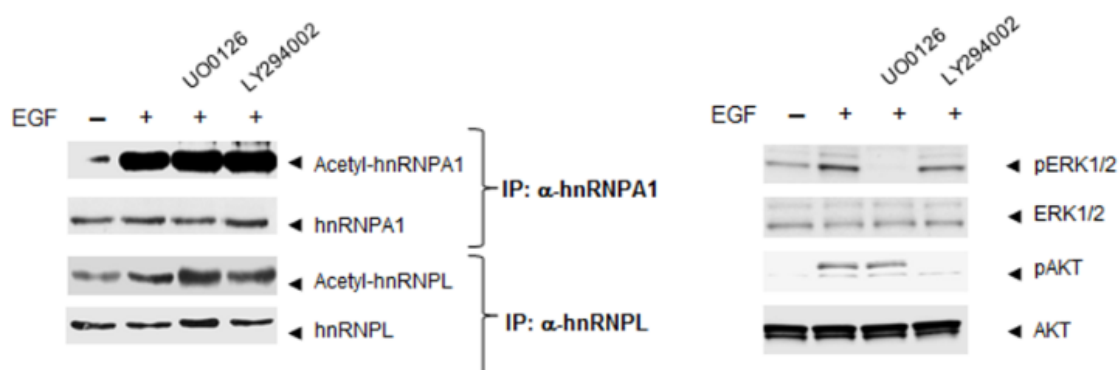


Figura 31. Papel de la mutación KRAS^{A146T} sobre sus dianas moleculares y la acetilación de hnRNPs. La línea celular HAF1 se trató con EGF(1h) en presencia o ausencia de inhibidores de MAPquinasas (UO0126 inhibidor de MEK y LY294002 inhibidor de PI3K, 1h de pretratamiento). Los extractos proteicos de HAF1 se inmunoprecipitaron con anti-hnRNPA1 y hnRNPL y se analizaron mediante western blot con anti-acetil(Lys). Los niveles de fosforilación de ERK 1/2 y AKT se analizaron (panel derecho) para confirmar la eficacia del tratamiento con los inhibidores.

La capacidad de RAS para influir sobre la actividad de la PI3K y viceversa ha sido documentada ampliamente [97, 98]. Efectivamente, se ha podido demostrar que el bloqueo de la actividad quinasa de MEK1/2 induce la fosforilación de AKT en líneas celulares de CCR [99].

Por otra parte, existen referencias en la literatura en las que se muestra que el bloqueo de la actividad de la PI3K aumenta los niveles de pERK1/2 en respuesta a una variedad de estímulos. En consonancia con estos datos, cuando ambos inhibidores se utilizaron de forma simultánea en nuestras condiciones experimentales, la inhibición de la

RESULTADOS

señalización a través de las vías RAS/PI3K bloqueó completamente la acetilación de ambas hnRNPs inducida por EGF (Figura 32).

Sin embargo, curiosamente los niveles basales de acetilación de ambas hnRNPs en las células control en ausencia de suero, no se vieron afectados por el tratamiento con ambos inhibidores.

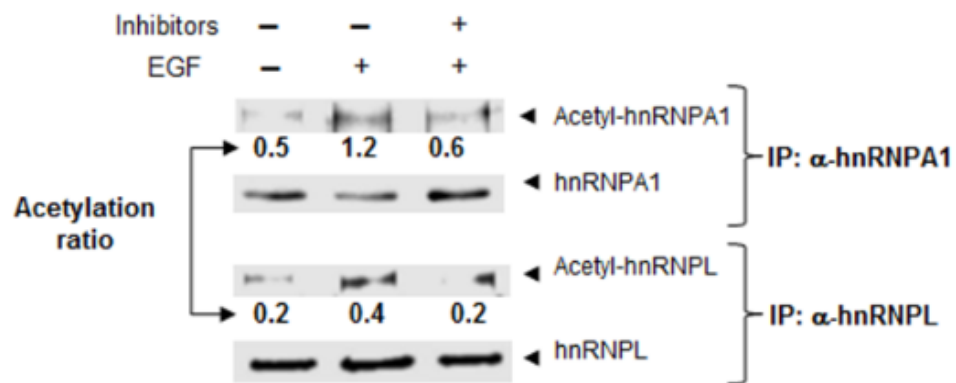


Figura 32. Efecto de la inhibición simultánea de MEK/PI3K sobre la acetilación de hnRNPs. La línea celular HAF1 recibió el tratamiento con ambos inhibidores simultáneamente. Se analizó el efecto del tratamiento con EGF sobre la acetilación de hnRNPA1 y -L mediante inmunoprecipitación con anti-hnRNPs y posterior western blot con anti-acetil(Lys). El ratio de acetilación se calculó como niveles de acetyl-hnRNP/hnRNP total.

En este sentido, sería razonable pensar que los niveles basales de acetilación de hnRNPs dependieran de la vida

media de las acetilaciones. Como hemos explicado previamente en la introducción, los niveles de acetilación dependen de un equilibrio delicado entre acetilación y deacetilación, marcado por la actividad de las acetiltransferasas y deacetilasas.

Por tanto, la acetilación de hnRNPs en células HAF1, no necesariamente tendría que depender de la inducción de la actividad una acetiltransferasa, sino que podría ser el resultado de una menor actividad desacetilasa.

Para estudiar el papel de las desacetilasas sobre la acetilación basal de las hnRNPs, se examinó si el inhibidor de desacetilasas, trichostatina A (TSA) era capaz de mimetizar el efecto del EGF en las células HAF1.

Efectivamente, tras el tratamiento de la línea celular con TSA los niveles de acetilación de ambas hnRNPs se incrementaron hasta niveles similares a los obtenidos tras la estimulación con EGF, aunque no se detectó un efecto sinérgico de ambos tratamientos conjuntos. (Figura 33).

RESULTADOS

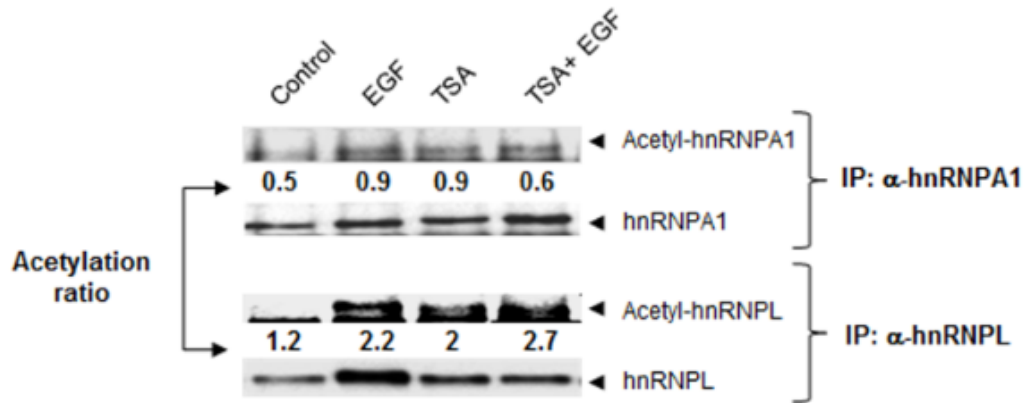


Figura 33. Efecto de la inhibición de desacetilasas sobre la acetilación de hnRNPs en células de CCR. El papel de las deacetilasas en la acetilación basal de ambas hnRNPs se estudió en la línea celular HAF1 tras 1h de tratamiento con tricostatina A (TSA), EGF o ambos. Para ello los extractos se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-hnRNPs y se realizó western blot contra acetil(Lys). El ratio de acetilación se calculó como niveles de acetil-hnRNP/hnRNP total.

DISCUSIÓN

... tienen gran parte de los aspectos
estudiados.

A lo largo de esta tesis se han estudiado y tratado de
elucidar varios de los aspectos moleculares que sostienen

la carcinogénesis de colon y que podrían estar relacionados con la resistencia al tratamiento con antitumorales específicamente dirigidos al EGFR.

Hasta la fecha se desconocen las causas moleculares que subyacen a esta respuesta tan heterogénea de los pacientes con mutaciones en KRAS^{G13D}. Recientemente se ha sugerido que la resistencia a terapias anti-EGFR podría estar mediada por desacetilasas en pacientes con cáncer de pulmón y mutaciones en KRAS [93]. Nuestro objetivo global era identificar esas hipotéticas dianas moleculares de desacetilasas/ acetiltransferasas dependientes del estado mutacional de KRAS, como posibles factores de resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR. Para ello, utilizamos tres líneas isogénicas de CCR portadoras de una misma mutación PI3KCA y distinto estado mutacional para KRAS.

Como resultado de nuestros experimentos hemos encontrado que en células de CCR al menos 36 proteínas sufren una acetilación que parece dependiente del estado mutacional de KRAS. Es de destacar, que de entre el total de proteínas acetiladas, había un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas hnRNP. Más importante aún, nuestros datos indican que la

hiperacetilación de hnRNPs forma parte de la respuesta a EGF en células de CCR.

Además, de nuestros experimentos se pueden derivar también otras importantes observaciones que podrían ser de gran relevancia en el contexto de la clínica y de la investigación oncológica experimental:

En esta tesis mostramos las consecuencias moleculares del desequilibrio alélico, bien por la pérdida del alelo salvaje o bien por la del mutado en células de CCR *KRAS^{G13D/WT}*. La delección del alelo salvaje en HAE6 lleva, no sólo a la hiperacetilación de hnRNPs, sino a un perfil mucho más tumorigénico e insensible a EGF. Por el contrario, la delección del alelo mutado en HAF1 induce una mutación espontánea *KRAS^{A146T}* en el alelo salvaje.

Estos y otros aspectos serán discutidos punto por punto en los siguientes apartados, intentando examinar las posibles implicaciones de nuestros resultados, no sólo desde un punto de vista biológico y molecular, sino también desde su posible relevancia clínica.

II. Consecuencias moleculares y biológicas del desequilibrio alélico en KRAS.

En conjunto nuestros resultados parecen reproducir las observaciones clínicas respecto al desequilibrio alélico, que indican que la eliminación de un alelo de KRAS es un factor de peor pronóstico en el CCR [100].

II.1 Eliminación del alelo mutado KRAS^{G13D} y presencia de un único alelo salvaje.

Para nuestra sorpresa, se encontró que en las células HAF1, la delección del alelo KRAS^{G13D} provocaba la aparición de una mutación puntual espontánea KRAS^{A146T} en el alelo salvaje.

De acuerdo con estos resultados, las publicaciones más recientes sobre el CCR muestran que el genotipo de KRAS no es algo constante que se mantenga invariable a lo largo de las distintas etapas de la enfermedad. Por el contrario, se ha podido demostrar que el genotipo de KRAS puede estar sometido a importantes cambios cuya dinámica está directamente relacionada con la progresión de la metástasis [101].

Esta mutación puntual también genera una activación constitutiva de KRAS [84]. Esto explica por qué la respuesta biológica y molecular de las células HCT116 y HAF1 resultaba tan similar (Figuras 11,12 y 14). Ambas líneas eran portadoras de mutaciones activadoras de KRAS.

Durante años se ha recomendado el análisis de los codones 12 y 13 de KRAS en pacientes con CCR como factor de predicción de respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR o inhibidores de este receptor. Sin embargo este tipo de análisis ha provocado la clasificación errónea de hasta un tercio de los pacientes considerados equivocadamente como KRAS salvaje y que presentaban resistencia al tratamiento con anti-EGFR [102, 103]. De hecho, en pacientes de CCR tratados con una combinación de cetuximab y quimioterapia, las mutaciones en KRAS en los codones 61 y 146 se han asociado a una supervivencia libre de progresión significativamente más corta que la de aquellos pacientes sin mutaciones en KRAS [104].

Aunque para descubrir el impacto de la mutación KRAS^{A146T} en la resistencia al tratamiento de pacientes con CCR, habría que contestar todavía a muchas cuestiones, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, esta sería la

DISCUSIÓN

primera descripción del efecto de esta mutación en las vías de señalización por debajo de KRAS^{A146T}, así como en la proliferación, la migración o la adhesión de estas células en respuesta a EGF. El comportamiento de las células KRAS^{A146T} resulta ser muy similar al que presentan las células HCT116, aunque algo menos tumorigénico (datos resumidos en Figura 34).

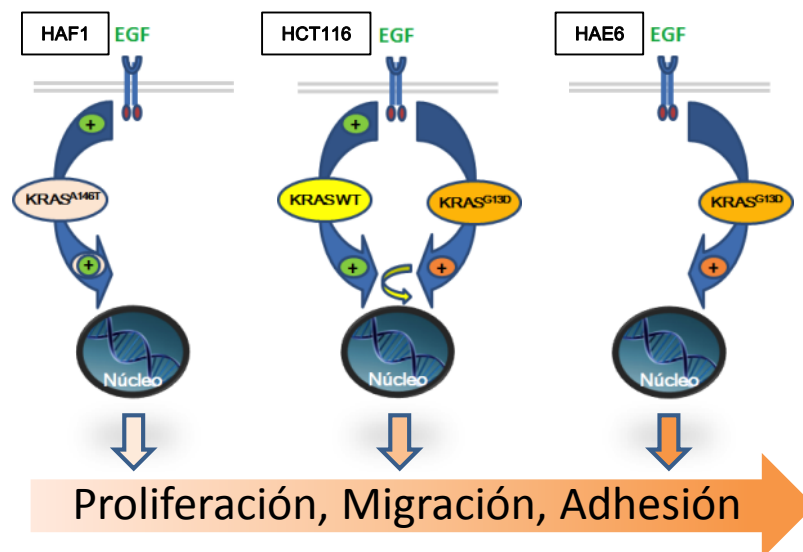


Figura 34. Comportamiento tumoral de las líneas celulares de CCR: HAF1, portadoras de un único alelo de KRAS con mutación activadora A146T, mantienen la capacidad de respuesta a EGF. HCT116, portadoras de un alelo mutado KRASG13D y un alelo WT. KRAS sobreactivada es insensible a EGF. El alelo WT es sensible a EGF y restringe la sobreactivación de KRAS. HAE6, portadoras de un único alelo de KRAS con mutación activadora G13D, son insensibles a EGF. La flecha horizontal muestra el gradiente tumorigénico que se observa en las tres líneas de menor a mayor de HAF1 a HAE6. Activación de la vía por EGF (verde), por G13D (naranja fuerte) y por A146T (naranja claro).

a codones menos frecuentes, tales como los codones 146 y 61 [36, 105], que podrían ser determinantes para la respuesta a EGF, pudiendo afectar tanto a sus vías de señalización como al acetiloma global de las células tumorales.

Además de la relevancia clínica, nuestras observaciones ponen de manifiesto la necesidad de analizar posibles mutaciones espontáneas en modelos experimentales. En este sentido, en la primera descripción de las células HCT116 y sus líneas celulares isogénicas, utilizadas para estudiar el significado funcional de las mutaciones en KRAS [106] los autores encontraron que uno de los clones KRAS^{WT/-}, las células HK2-8, por razones que afirmaban no comprender, mostraba el mismo patrón de comportamiento oncogénico *in vitro* que las células HCT116.

Las células HK2-8 eran similares a lo que pretendían ser las células HAF1. Aunque desconocemos si las células HK2-8 también habían desarrollado una mutación espontánea en KRAS^{A146T}, es interesante destacar que la única diferencia que los autores encontraban entre las células HCT116 y las HK2-8 era que las últimas no formaban tumores *in vivo*, “despite their rapid growth *in vitro*” (sic). Nuestros datos también muestran una única

diferencia significativa entre las células HAF1 y HCT116; La migración celular en condiciones basales, era superior en las células HCT116 que en las HAF1 (figura 4). Esta observación podría sugerir que aunque ambas mutaciones en KRAS, la G13D y la A146T, son mutaciones activadoras, los efectos finales de dichas mutaciones no necesariamente han de ser los mismos.

Por todo ello, los datos presentados en esta tesis ponen también de manifiesto la urgente necesidad de analizar la presencia de posibles mutaciones espontáneas en líneas celulares de CCR frecuentemente utilizadas como modelo experimental para estudiar mecanismos de resistencia a fármacos o para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas.

II.2 Eliminación del alelo salvaje KRAS^{WT} y presencia de un único alelo mutado (KRAS^{G13D/-}).

La caracterización molecular y biológica de las líneas celulares KRAS^{G13D}, en presencia de un segundo alelo salvaje (KRAS^{G13D/WT}, HCT116) o con dicho alelo deletado (KRAS^{G13D/-}, HAE6), confirma que las células que conservan un único alelo mutado tienen un mayor

comportamiento oncogénico (Figura 34). Efectivamente, las células HAE6 tienen una mayor capacidad proliferativa y de migración, menor adhesión, y una peor respuesta a EGF, o en otras palabras, mayor insensibilidad a factores de crecimiento, características todas ellas conocidas como factores clave del cáncer [11].

De acuerdo con nuestros resultados, se ha sugerido que un alelo salvaje podría restringir la actividad oncogénica de KRAS mutado, actuando como si fuera un supresor tumoral [107]. La pérdida del alelo salvaje por una delección o el aumento de número de copias del alelo mutado, conduce a lo que se conoce como desequilibrio específico de alelo o MASI (*mutant allele-specific imbalance*) [108]. Recientemente se ha publicado que el MASI para KRAS mutado en el codón 13 es un factor de pronóstico adverso independiente cuando se compara con el codón mutado sin MASI [100].

III. Dianas moleculares de KDAC/ KATs dependientes del estado mutacional de KRAS.

Aunque los procesos moleculares que subyacen a la resistencia frente a terapias anti-EGFR no han podido ser elucidados todavía, en estudios experimentales y clínicos de CCR se ha demostrado que la acetilación/desacetilación de proteínas está implicada en la modulación de la respuesta a EGF [109]. En cualquier caso, se desconocía si el estado mutacional de KRAS podría afectar al acetiloma de las células de CCR como indican nuestros resultados (Figura 11). Efectivamente, de forma global a juzgar por el número de spots encontrados, nuestros resultados sugieren que existe una hiperacetilación diferencial dependiente del estado mutacional de KRAS y directamente proporcional al comportamiento tumorigénico de las células de CCR. El número de spots de proteínas hiperacetiladas era mayor en HAE6 que en HCT116 y en estas mayor que en HAF1. De acuerdo con estos datos, cuando se realizó un análisis informático del interactoma de cada una de las 36 proteínas acetiladas que se habían identificado (tabla V) se encontró

que la gran mayoría de ellas habían sido ya identificadas como proteínas diana de diferentes KDACs.

Es de destacar que las proteínas acetiladas se podían agrupar en tres grandes grupos funcionales que incluían el metabolismo energético, el metabolismo proteico y el procesamiento de RNA (Figura 35):

- El metabolismo energético está alterado de forma muy significativa en las células neoplásicas. Durante más de un siglo se debatió sobre cuáles de las alteraciones, las genéticas o las metabólicas eran las bases prevalentes de la carcinogénesis. Sin embargo, los famosos hallazgos de Otto Warburg en los que demuestra que las células tumorales tienen tasas muy elevadas de glucólisis y de producción de lactato quedan marginados con los descubrimientos de oncogenes y supresores tumorales. Actualmente sabemos que virtualmente todas las enzimas del metabolismo se regulan por acetilación y desacetilación [110]. La elevada concentración de acetyl-CoA en la mitocondria, hace pensar que en este compartimento subcelular la regulación por acetilación debe ser especialmente relevante. Entre las proteínas que encontramos hiperacetiladas en las células HAE6,

DISCUSIÓN

encontramos enzimas mitocondriales como la subunidad 1 del complejo citocromo b-c1, la malato deshidrogenasa o la aspartato aminotransferasa (tabla VIII). De acuerdo con un papel regulador de estas acetilaciones, se sabe que la expresión de proteínas mitocondriales cambia de una forma muy modesta en respuesta a la restricción calórica, mientras que el perfil de acetilación de estas proteínas cambia de forma considerable, indicando que la acetilación juega un importante papel en el ajuste del metabolismo a la disponibilidad de nutrientes [111] .

En un futuro será importante determinar el papel de estas acetilaciones en la regulación del metabolismo energético de las células neoplásicas y su dependencia del estado mutacional de KRAS.

- Dentro del grupo de proteínas relacionadas con el metabolismo proteico se han encontrado varias enzimas con actividad chaperona, como la HSP70. En este sentido, recientemente se ha sugerido que los inhibidores de KDACs ejercen su actividad antitumoral a través de la hiperacetilación de histonas, pero también de proteínas no histónicas como HSP90. El bloqueo de esta chaperona a través de la acetilación, resulta en una desestabilización de

las proteínas que modula y que son críticas para la supervivencia de las células tumorales. Por otra parte, se ha observado una inducción de las chaperonas de la familia de las Hsp70 cuando se bloquea Hsp90. Las Hsp70 se han relacionado con la resistencia a apoptosis en células tumorales [112].

- Finalmente, el análisis funcional del acetiloma mostró un grupo de proteínas relacionadas con el metabolismo del RNA. En concreto se identificaron varios miembros de una familia de proteínas de unión al RNA, las hnRNPs. Las hnRNPs, como ya se ha mencionado, están relacionadas con una gran variedad de funciones como el procesamiento del mRNA, su transporte, estabilidad o incluso traducción. [97]. Es interesante destacar que la acetilación de proteínas puede estar implicada en la regulación de la expresión de una proteína a través de la modulación de su transcripción, pero también a través de cualquiera de los pasos posteriores que llevan hasta la traducción del mRNA maduro [113, 114]. En este sentido, y de acuerdo con nuestras observaciones sobre la acetilación de hnRNPs, uno de los estudios más extensos del acetiloma celular, muestra que la principal red funcional modulada por las

acetilaciones está relacionada con la maduración del mRNA [73]. Aunque en nuestro estudio, encontramos cuatro miembros de la familia de hnRNPs, no descartamos la posibilidad de que en nuestro análisis proteómico no se hayan encontrado otros miembros que aunque acetilados, pudieran encontrarse en concentraciones tan bajas que estuvieran fuera del límite de detección en nuestras condiciones experimentales.

Aún con todo, aunque ya se había descrito el prominente papel de las hnRNPs en la progresión tumoral [115-117], y que estas proteínas son susceptibles de ser acetiladas, esta es la primera vez en la que se describe una relación entre el estado mutacional de KRAS y la acetilación de hnRNPs. Es más, esta es la primera vez en la que se demuestra que la acetilación de hnRNPs es parte de la respuesta de las células de CCR al EGF.

III.1 Funciones de las hnRNPs.

De todo el grupo de proteínas sometidas a acetilación potencialmente dependiente de *KRAS*, se seleccionó las hnRNPs para completar su estudio. Se eligió a esta familia de proteínas debido a su implicación en una gran variedad

de funciones moleculares sobre el procesamiento, transporte, estabilidad y traducción del mRNA.[96, 118, 119]

Las hnRNPs además, regulan el mantenimiento de telómeros, la remodelación de la cromatina y la reparación del DNA.

Las hnRNPs tienen un papel general en el empaquetamiento y organización de las diferentes proteínas y funciones especializadas que dependen de las uniones específicas ARN-proteína o proteína-proteína (Funciones resumidas en figura 35)

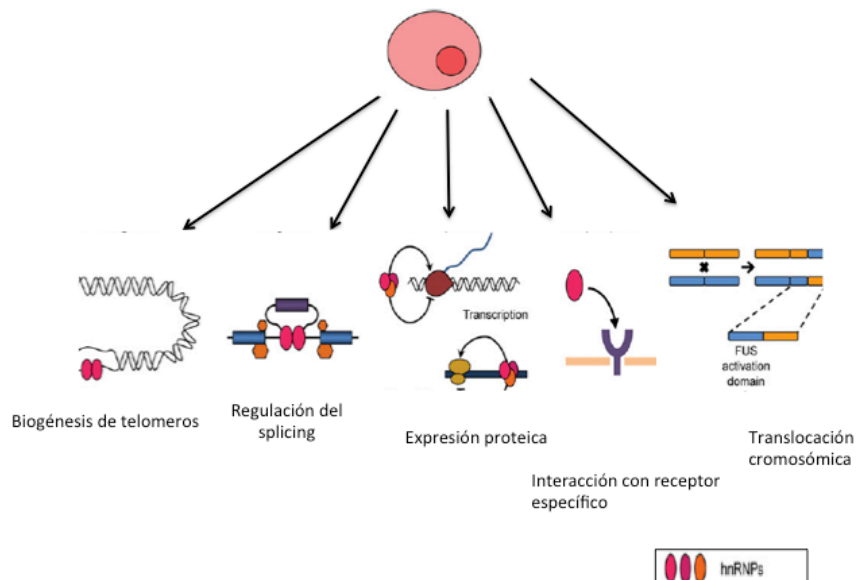


Figura 35. Principales funciones celulares de las hnRNPs.

Diferentes hnRNPs se han vinculado directa o indirectamente con el desarrollo de cáncer y de hecho la expresión alterada de estas proteínas puede contribuir a la carcinogénesis de diferentes formas. Por ejemplo diversas hnRNPs afectan a la biogénesis y longitud de los telómeros.[117, 120, 121]. Además, defectos en el splicing de mRNAs son también comunes en el desarrollo de cáncer, y de hecho, se ha descrito cambios en la actividad de estos factores de splicing como hnRNPs A1 y F/H en diferentes tumores.[117, 122]

III.2 Expresión de las hnRNPs.

La expresión elevada de algunos miembros de la familia de hnRNPs se ha considerado un factor de mal pronóstico para diferentes tipos de cáncer [123-125] . Por ejemplo, la

sobreexpresión de la hnRNPK o hnRNPA2/B1 se ha utilizado como biomarcador de hepatocarcinoma en pacientes con cirrosis [122, 126]. Se ha sugerido que la sensibilidad y especificidad de estas hnRNPs como biomarcadores podría ser incluso superior a la alfa-fetoproteína. Además, la sobreexpresión de hnRNP A2/B1 también se ha relacionado con el cáncer de páncreas [127] encontrándose una correlación entre los niveles elevados de esta hnRNP y la pérdida de E-caderina en los tumores pancreáticos.

En cualquier caso, la sobreexpresión de una hnRNP concreta no siempre se ha relacionado con un peor pronóstico o una mayor progresión tumoral. En este sentido [121], relacionaron la disminución en la expresión y mutación de la hnRNPG con el desarrollo del cáncer oral en humanos. Dichos autores observaron que la expresión de hnRNPG estaba notablemente disminuida o completamente inhibida en un 80% de las lesiones displásicas premalignas y malignas en los tejidos epiteliales orales.

Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, aunque las células HAE6 mostraron siempre un perfil significativamente más tumorigénico que las células HAF1,

no se pudieron encontrar diferencias en los niveles de expresión, mRNA o proteínas, de hnRNPs (Figura 27), Aunque los datos existentes en la literatura convierten a las hnRNPs en buenas candidatas como posibles biomarcadores de progresión tumoral, hasta la fecha, los niveles de expresión de estas proteínas resultan insuficientes como factor de predicción.

III.3 Acetilación diferencial de hnRNPs en respuesta a EGF dependiente del estado mutacional de KRAS

Los niveles de acetilación de hnRNPs más elevados, y también el mayor número de proteínas hiperacetiladas, se encontraron cuando se delecionó el alelo salvaje de KRAS en las células HAE6 (Figuras 19, 20 y 26).

Efectivamente, en condiciones basales, la proliferación, adhesión y migración celular (Figuras 11, 12, 13 y 34) eran considerablemente mayores en las células HAE6 (*KRAS*^{G13D/-}) que en las HCT116 (*KRAS*^{G13D/WT}). Se ha propuesto que KRAS oncogénico podría promover la progresión tumoral limitando la eficacia de la señalización por la vía RAS/RAF/MEK/ERK1/2. Por el contrario, los tejidos con una respuesta completa a través de KRAS desencadenan

potentes respuestas antitumorales que previenen de forma efectiva una mayor progresión tumoral (41). De acuerdo con esta idea (Figura 34), las células HAE6 mostraron una vía de señalización de las MAPKs basalmente hiperactivada y por tanto insensible a una mayor estimulación con EGF (Figuras 14 y 18). Consecuentemente, los niveles de acetilación de la hnRNPL y A1 permanecieron invariables en respuesta a EGF en las células HAE6. Es más, de acuerdo con una hiperestimulación basal de las células *KRAS^{G13D/-}*, el tratamiento con EGF no fue tampoco capaz de inducir en estas células ninguna de las respuestas biológicas descritas para este factor de crecimiento, tales como la proliferación, adhesión o migración celulares (Figuras 16, 17 y 34).

En cuanto a la forma en que está regulada la acetilación de hnRNPs, aunque serían necesarios más experimentos, los resultados presentados en esta tesis parecen sugerir que la vía de KRAS, por sí sola o junto con la de PI3K, modulan el equilibrio KDAC/KAT (Figura 36).

En los tres modelos celulares estudiados hemos visto que, las mutaciones activadoras G13D o A146T, aunque con

DISCUSIÓN

distinto grado de intensidad, desequilibran la balanza a favor de un incremento en las acetilaciones.

Dado que la inhibición de KDACs mimetizaba el efecto del EGF sobre la acetilación de hnRNPs (Figura 24), muy probablemente, estas mutaciones activadoras desequilibren la balanza por inhibición de la actividad de las KDACs.

No obstante, la vía de KRAS está regulada por mecanismos de feedback negativos que controlan la duración, magnitud y amplitud de respuesta a un estímulo.

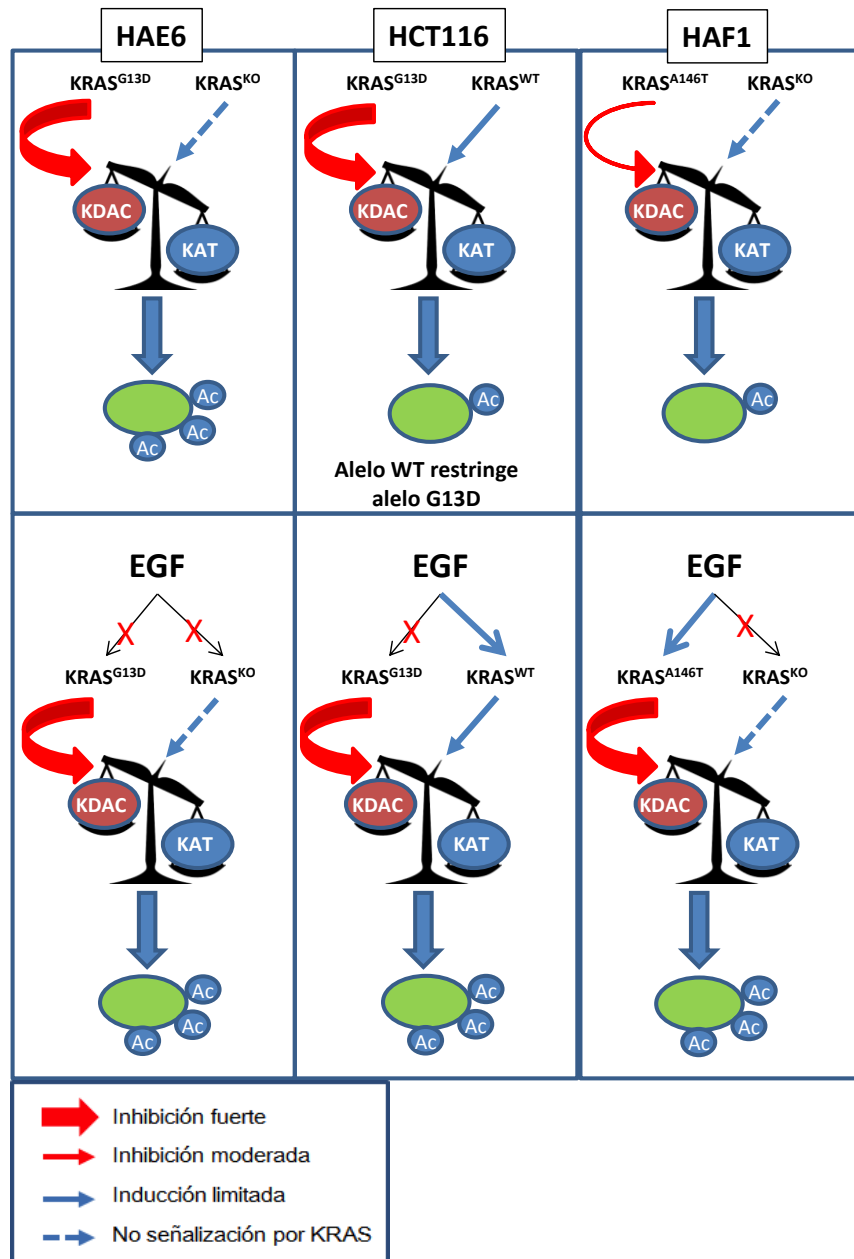


Figura 36. Efecto del estado mutacional de KRAS y equilibrio alélico sobre la acetilación de hnRNPs en células de CCR.
 Consecuentemente, la presencia de un alelo salvaje, sería suficiente como para restringir o limitar la eficacia de la vía

sobreactivada por una mutación en KRAS G13D, como ocurre en la línea celular HCT116.

La respuesta a EGF se vería condicionada por tanto, no sólo por el estado mutacional de KRAS, sino también por el desequilibrio alélico. Así pues, en la línea HAE6, en ausencia de un alelo salvaje, EGF no puede estimular más una vía basalmente sobreestimada. Sin embargo, apoyando la idea de que no todas las mutaciones activadoras de KRAS tienen el mismo efecto, el EGF sí que es capaz de inducir la hiperacetilación de hnRNPs que basalmente era moderada, como ocurría en la línea celular HAF1, que cuenta con un único alelo de KRAS^{A146T}.

III.4 Futuras perspectivas: Función de la acetilación de hnRNPs

Aunque todavía no conocemos las consecuencias funcionales de la hiperacetilación de hnRNPs, podemos especular con una posible función de acuerdo con una modulación de la acetilación de hnRNPs dependiente de KRAS. Se sabe que varios miembros de la familia de hnRNPs están modulados por la vía de las MAPKs (42,43).

La fosforilación de residuos específicos de las hnRNPs puede condicionar su distribución subcelular y con ello su función (37). Hasta la fecha no se ha descrito nunca una interacción entre la fosforilación y la acetilación de una hnRNP, pero en el futuro sería importante estudiar si esta hipotética interacción podría condicionar el splicing, estabilidad, transporte o traducción de unos mRNAs concretos relacionados con la tumorigénesis o la resistencia a terapias anti-tumorales.

Por otra parte, las células de CCR utilizadas en este estudio también son portadoras de otras mutaciones independientes de KRAS. De hecho, tan sólo se consigue inhibir la hiperacetilación de hnRNPs en respuesta a EGF cuando se bloquean simultáneamente las vías de KRAS y PI3K. No podemos descartar por tanto, la sugerente idea de una acetilación de hnRNP como punto de convergencia de diferentes vías

de señalización que han sido activadas por un estímulo o por una mutación. De confirmarse esta hipótesis la relevancia de nuestros datos, tanto desde el punto de vista molecular como clínico, se vería extendida considerablemente.

CONCLUSIONES

En el presente proyecto de tesis se han concluido y
elucidado el importante papel de las mutaciones en KRAS y
el desequilibrio alélico en el comportamiento tumoral de
células de CCR, así como sobre las dianas moleculares de

CONCLUSIONES

esta importante vía de señalización. Las conclusiones específicas de esta tesis son las siguientes:

1. El estado mutacional de KRAS puede cambiar a lo largo del tiempo bajo la presión de un desequilibrio alélico, desarrollando mutaciones espontáneas como KRAS^{A146T} en células monoalélicas KRAS^{WT}.
2. El potencial tumoral de un alelo mutado KRAS^{G13D} parece depender de la presencia o ausencia de un alelo salvaje que restringiría la actividad tumoral del alelo KRAS^{G13D}.
3. No todas las mutaciones activadoras en KRAS tienen el mismo efecto sobre las propiedades tumorales de células de CCR. Las células KRAS^{G13D} presentan un mayor potencial tumorigénico que las KRAS^{A146T}. Siendo el comportamiento de estas últimas muy similar al que presentan las células KRAS^{G13D/WT}, aunque algo menos tumorigénico.
4. Al contrario que las células KRAS^{A146T}, las mutaciones KRAS^{G13D}, en ausencia del alelo KRAS^{WT}, conducen a

una hiperestimulación de la vía y a la insensibilidad de las células al tratamiento con EGF.

5. El estado mutacional de KRAS no parece afectar de forma significativa al perfil global de transcripción génico de células de CCR.
6. Existe una hiperacetilación diferencial de proteínas no histónicas dependiente del estado mutacional de KRAS y directamente proporcional al comportamiento tumorigénico de las células de CCR. Además, esta hiperacetilación afecta de forma significativa a proteínas relacionadas con el procesamiento y transporte de RNA.
7. La acetilación de hnRNPs, pero no su expresión, forma parte de la respuesta a EGF en células de CCR y podría estar modulada por desacetilasas.

SUMMARY

I. Introduction.

Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent tumors worldwide [128] and despite many advances in therapy, long-term survival for patients with metastatic disease is still poor [23]. Antibodies against the Epidermal

SUMMARY

Growth Factor Receptor (EGFR) have been successfully used in CRC patients with advanced disease. However, less than half of them are responsive to such therapy [129]. *KRAS* or *NRAS* mutations are the main negative predictive markers to EGFR-response [130]. Therefore, treatment with anti-EGFR antibodies is only to be considered in patients with a full *RAS* wild-type phenotype [36, 131]. *RAS* proteins ensure signal transduction between membrane receptors, such as EGFR, and intra-cytoplasmic serine/threonine-kinases; thus contributing to the regulation of a number of essential cellular functions. Mutated *RAS* renders the protein into a constitutively active form, which in turn deregulates downstream signaling pathways [132]. However, several clinical and experimental data indicate that not all *RAS* mutations are equal in their biological properties and therefore, they could confer variable effects [63, 133]. The most frequent *KRAS* mutations found in CRC patients are in codon 12 and 13. However, activating *KRAS* mutations in codons 61 and 146 have been recently associated with shorter progression-free survival compared with wild-type *KRAS* in CRC-treated patients [104]. In addition, tumor cells under the pressure of inhibiting their oncogenic pathways develop spontaneous mutations.

Indeed, metastatic CRC patients ongoing anti-tumoral treatment experience *KRAS* genotypic changes

[101]. We also observed this effect in cultured cells; deletion of a mutated *KRAS*^{G13D} allele in HCT116 cells (*KRAS*^{G13D/WT}) induced a spontaneous *KRAS*^{A146T} mutation in the remaining wild type allele. To uncover the molecular mechanisms behind the differential response observed in tumor cells with different mutations in *KRAS* seems a major issue for development of new anti-tumoral therapies and personalized medicine.

Recently, a novel deacetylase-dependent mechanism has been proposed to explain resistance to anti-EGFR therapies in mutant *KRAS* lung adenocarcinoma cells [93]. Acetylation is a post-translational reversible modification regulated by two types of enzymes: lysine deacetylases (KDACs) and lysine acetyltransferases (KATs). Indeed, deacetylase inhibitors have emerged as potential anti-tumor agents by increasing hyperacetylation of both histones and nonhistone proteins [134]. Furthermore, some reports describe the interplay between KDAC inhibitors and the RAS-ERK signaling cascade in cell lines exhibiting different mutational status in *KRAS*, *BRAF* or *PI3KCA* [109, 135-137].

The downstream effects of the less frequent, but not less important *KRAS*^{A146T} mutation is currently unclear. In this thesis we evaluated the impact of *KRAS*^{A146T} mutation versus *KRAS*^{G13D} on cellular proliferation, adhesion and migration of HCT116-derived CRC cell lines. Given the recently described interplay between acetylations and RAS-ERK signaling cascades, we also studied the effect of *KRAS* mutational status on protein acetylation pattern in order to gain insight into the potential molecular mechanisms behind the differential effect of *KRAS* mutations.

II. Aims.

As previously discussed in the introduction, CRC is the third most common cancer type in Western countries, and remains as one of the most frequent causes of death by cancer in the world.

During the last 20 years of drug development, median overall survival of CRC patients has considerably increased and reached an historical maximum of 24 months.

This can be attributed not only to improvements in classic chemotherapy treatments, but also to the introduction of

new-targeted agents. Moreover, extensive investigations and advances in sequencing techniques have allowed the appearance of an individualized treatment.

Unfortunately, only 10% of patients with chemotherapy refractory metastatic CRC achieve objective responses to anti-EGFR therapies.

Recently, postraslational modifications were proposed to be involved in anti-EGFR resistance. Moreover acetylation changes of histones and non-histone proteins were described a key determination factor of targeted drugs resistance.

Previous publications proposed that RAS/RAF/MEK/ERK pathway had a role modulating activity from p300 HAT. In addition KAT expression was shown to be increased in CCR tumors.

The role of histones acetylation as a regulator of genetic expression has been extensively studied in different tumor types including CCR. However the potential relevance of acetylation of non-histone proteins in CCR tumors was never explored before.

We hypothesize that KDACs/ KATs activity could be KRAS mutational status dependent and that KATs and KDACs

SUMMARY

molecular targets could be relevant as mechanisms of resistance to anti-EGFR therapies in *KRAS* mutant tumors.

We will use for this purpose, three CCR cell lines, one parental line HCT116 and two derivate cell lines with different *KRAS* mutational status HAF1 and HAE6. Three lines commercially available were bought from GRCF Biorepository and Cell Center de la Universidad Johns Hopkins.

Our main objectives in this research project were:

1. Characterization of tumoral behaviour (proliferation, adhesion, migration) and main signalling pathways MAPK/AKT in cultured cells according to their *KRAS* status.
2. To study the differential gene expression and acetylome profiles of each human CRC cell line according to their *KRAS* mutational status.
3. To identify acetylated proteins which are molecular targets of KATs and KDACs, and to study their relationship with *KRAS* status in CCR cells and their specific response to EGF stimuli.

III. Results.

III.1. Differential effect of $KRAS^{A146T}$ and $KRAS^{G13D}$ in EGF-treated CRC cells.

HCT116 CRC cell line, harboring an endogenous activating $KRAS^{G13D/wt}$ mutation, and two isogenic HAF1 ($KRAS^{wt/-}$) and HAE6 ($KRAS^{G13D/-}$) clones were used for this study. All those genes recommended to predict a clinical outcome for cancer therapy were sequenced in the three cell lines [105] (Tabla V). Interestingly, while all mutations found in HCT116 were also observed in HAE6 cells, we found that in HAF1 cells a $KRAS^{A146T}$ hotspot mutation had spontaneously arisen in what so far was intended to be a wild-type allele. Given this result, we characterized $KRAS^{A146T}$ cells and compared them with HCT116 or HAE6 cell lines. HAE6 cells showed the highest proliferation rate and the lowest levels of cell adhesion (Figures 11 & 12). A wound healing analysis of cell migration revealed differences among the three cell lines, with HCT116 showing a higher rate than HAF1 but lower than HAE6 cells (Figure 13). In contrast to the previous results, $KRAS$ mutational status had no apparent effect on ERK and AKT phosphorylation, under basal conditions (Figure 14). This is not surprising, since the three cell lines harbor a PIK3CA activating mutation.

$KRAS^{A146T}$ seemed to be the less tumorigenic mutation. Nevertheless, unsynchronized cell culture under basal conditions could mask the effect of $KRAS$ mutation in

SUMMARY

response to a specific stimulus. Therefore, to further explore the downstream effect of *KRAS*^{A146T} versus the well-characterized *KRAS*^{G13D} mutation, HAF1 and HAE6 cells were grown in serum-deprived media and then stimulated with EGF. To rule out the possibility that the mutation could affect *KRAS* expression, qPCR was performed and *KRAS* mRNA levels found in both cell lines were similar (Figure 15).

Although EGF-treatment induced the rapid phosphorylation of ERK1/2 and AKT in HAF1, this response was poor in HAE6 cells (Figure 18). Noticeable, pERK levels were already high in untreated HAE6 controls. In addition, as already described in other cell lines with an hyperactivated ERK pathway [99], EGF decreased pAKT levels in this HAE6 cell line.

Cell adhesion experiments could not be performed in serum-free media because HAF1 cells were sensitive to trypsinization after 24h-serum deprivation. A higher talin-cleavage has been associated with lower cell adhesion [92]. Therefore, we analyzed cleaved-talin as an indirect method to measure cell adhesion. In unstimulated cells, talin-cleavage was already higher in HAE6 than in HAF1 cells. Moreover, while talin-cleavage was induced in response to

EGF in HAF1 cells, this proteolytic cleavage was EGF-independent in HAE6 cells. We next analyzed cell migration and found that HAE6 cells were also unresponsive to EGF, in contrast to the cell migration induced by EGF in HAF1 cell line (Figure 17). Finally, cell proliferation, although induced by EGF in both cell lines, was increased to a lesser extent in HAE6 than in HAF1 cells (Figure 16). We reasoned that hyperactivation of ERK1/2 induced by $KRAS^{G13D}$ could reach a plateau beyond which cells cannot be further stimulated by EGF.

III.2. Differential mRNA levels in $KRAS^{G13D}$ vs $KRASA^{146T}$ CRC cell lines

We examined those possible KRAS-dependent transcriptional effects in both cell lines using Affymetrix DNA microarrays (microarray data on the CD). Under the presence of $KRAS^{G13D}$ mutation, most differentially expressed genes were down-regulated (Figures 23, 24). when compared to $KRASA^{146T}$ mutation (HAF1). However, the expression of the majority of genes did not substantially change, and only few of them were up-regulated. In order to validate these data, the expression of a selection of up-

regulated genes was analyzed by qPCR. These genes were selected for their prominent role in tumor metastasis, growth factor shedding or CRC drug-resistance [94, 138]. The expression of these genes was dramatically up-regulated in cells with a mutated *KRAS*^{G13D} allele, thus confirming the microarray data (Figure 25). Among the genes down-regulated in HAE6 vs. HAF1 cells, the most representative pathway affected was EGFR1 signaling; 43 genes were down-regulated out of the 156 described for the EGFR1 canonical pathway. However, other pathways triggered by cytokines and growth factors, such as VEGF, PDGF, HGF, IGF1, TGF β , TNF α and several interleukins, were also down-regulated. This is not surprising since most of them share several steps within the RAS signaling pathway.

III.3. Effect of KRAS mutations on the global acetylome of CRC.

One of the potential pathways affected by KRAS mutational status which may regulate several biological processes is protein acetylation. We sought to study whether the global acetylation profile in CRC was differentially affected by activated *KRAS*^{G13D} and activated *KRAS*^{A146T}. Isolated proteins from both cell lines grown in

10%FBS, were immunoprecipitated and analyzed by western blot with anti-acetyl-Lys antibodies (Figure 19). A 2D western blot proteomic approach was used to deeply analyze acetylated-proteins from the two cell lines. Global protein Lys-acetylation was increased in HAE6 compared to HAF1 cells, according to increased number of detected spots (Figure 20).

Positive spots from the HAE6 acetylome were excised and identified by mass spectrometry. 67 spots were detected but only those with a confident Mascot ion score and a high peptide matching were selected. The (GO) biological function analysis of our 36 acetylated proteins revealed that target proteins were enriched in four main categories related to cell growth, energy metabolism, RNA metabolic process and protein metabolism (Figure 21). Many of these proteins were already described to be targets of putative acetyltransferases or deacetylases and to become acetylated under different experimental conditions (reviewed in Table VI). Our microarray results confirmed that differences in the acetylation pattern were not due to increased mRNA expression. Indeed, those genes whose products were identified in our acetylome analysis remained unchanged in HAE6 when compared to HAF1 cells (Microarray data files on the CD).

III.4. Acetylation of hnRNP family members

Among the acetylated-targets there was an interesting group of RNA binding proteins, all of them members of the family of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), involved in a variety of molecular functions going from mRNA processing, transport, stability or even translation [96]. We analyzed in the two cell lines whether the basal acetylation of hnRNPs was dependent on *KRAS* mutational status. Acetylation was measured by immunoprecipitation experiments with acetyl(Lys) antibodies followed by western blot with antibodies recognizing the specific hnRNP member (Figure 26). As shown in the figure, hnRNPA1 and A2/B1 were found to be hyperacetylated under growing conditions (10% FBS) in HAE6 when compared to HAF1; however, this pattern was not so clear in other family members tested such as hnRNPA3 or L. The mRNA and protein levels of hnRNPs were analyzed by qPCR and western blot respectively (Figure 27); the expression of none of the hnRNPs showed a significant change when compared among the different cell lines. Therefore, the different levels of acetylation observed are not the result of a higher rate of gene expression or protein stabilization.

III.5. Acetylation of hnRNPA1 and L in response to EGF

Although acetylation of hnRNPs has been already described in other cell systems, at present it is not known whether this acetylation is part of the EGF response in CRC cells. Should it be the case, it would be important to establish whether the *KRAS* mutational status could condition a differentially induced-acetylation of hnRNPs upon EGF stimuli. Both cell lines were grown in serum-free medium and then stimulated with EGF for a short (20min.) and a long (2h) period of time (Figure 28). Samples from each condition were immunoprecipitated with either anti-hnRNPA1 or anti-hnRNPL antibodies. These hnRNPs were selected since they represent those isoform showing the highest and the lowest acetylation differences when comparing HAF1 and HAE6 cells. To establish the acetylation ratio (acetyl-hnRNP/total hnRNP), pull-down proteins were further analyzed by western blot with specific antibodies against acetyl-Lys or the corresponding hnRNP.

Under serum deprivation, basal acetylation levels of both hnRNPs were higher in HAE6 than in HAF1 cells (Figure 28, lane 0). However, the acetylation of both, hnRNPA1 and hnRNPL at the end point of EGF-treatment was the same in

SUMMARY

the two cell lines. Interestingly, when the acetylation of EGF-treated samples was compared to untreated controls, acetylated-hnRNP levels did not significantly change throughout the time course of EGF-treatment in HAE6 cells (Figure 28). Conversely, EGF induced a dramatic acetylation of both hnRNPs in HAF1 cells. Finally, mRNA and protein levels from hnRNPA1 or -L were not induced in any EGF-treated cell line at the tested time points (Figures 29 & 30). Consequently, EGF-induced acetylation observed in HAF1 cannot be attributed to the transcriptional or translational modulation of hnRNPs.

III.6. Role of *KRAS*^{A146T} mutation on hnRNP acetylation

To study whether *KRAS*^{A146T} mutation may account for EGF-induced acetylation of hnRNPs, we specifically inhibited the KRAS signaling pathway in the HAF1 cell line. Independently of *KRAS*^{A146T} mutation, HAF1 cells also encompass a *PI3KCA* mutation. Therefore we analyzed the acetylation of hnRNPs induced by EGF in cells pretreated with inhibitors of both, MEK1/2 (U0126) and PI3K (LY294002). Inhibition of one single pathway either MEK1/2

or PI3K, by using the specific inhibitor alone, had no effect on protein acetylation (Figure 31). The ability of RAS to influence PI3K activity and vice versa has been well documented [97, 98]. Indeed, blocking MEK1/2 activity has been shown to induce AKT phosphorylation in CRC cell lines [99]. On the other hand, blocking PI3K activity has been shown to increase pERK1/2 levels in response to a variety of stimulus [28]. In agreement with this, when both inhibitors were used simultaneously, the inhibition of RAS/PI3K signaling pathways completely blocked the EGF-induced acetylation of both hnRNPA1 and hnRNPL (Figure 32). Interestingly, basal levels of acetylated hnRNPs in serum-starved controls were not affected by the kinases inhibitors.

Basal levels of acetyl-hnRNPs could be dependent on the half-life of acetylations. Actually, acetylation of proteins is not only the result of acetyltransferase-induced activity, but also of deacetylases. To examine the role of deacetylases on basal acetylation, we investigated whether the deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) could mimic the effect of EGF in HAF1 cells. Indeed, TSA increased the acetylation of both hnRNPs to the same levels as those

reached by the EGF-treatment, although no synergistic effect was observed (Figure 33).

IV. Discussion.

Herein we uncover several aspects of the molecular events underlying colon carcinogenesis that will be further discussed. We provided the first report indicating that the acetylation of 36 specific proteins is dependent on *KRAS* mutational status; among them, several members of the hnRNP family. Moreover, our data indicated that hnRNP acetylation is part of the EGF-inducible response. Secondly, we showed the molecular consequences of allele imbalance by deletion of either, a wild-type or a mutant allele in *KRAS*^{G13D/WT} CRC cells. Deletion of the wild type allele (HAE6) leads, not only to hnRNP acetylation, but also to the more tumorigenic and EGF-unresponsive profile of these cells. Conversely, deletion of the mutant allele (HAF1) induces a spontaneous *KRAS*^{A146T} mutation in the wild-type allele.

Collectively our observations seem to parallel the clinical findings indicating that disruption of the *KRAS* wild-type allele is an adverse prognostic factor for CRC [100]. Surprisingly, in HAF1 cells, a spontaneous *KRAS*^{A146T} point

mutation was found. In agreement with this, the most recent reports show dynamic *KRAS* genotypic changes throughout the progression of metastatic CRC [101]. This point mutation also renders a constitutive activation of KRAS [84]. In the near future, it would be important to analyze possible spontaneous mutations in any other CRC cell line used as experimental model to study the molecular mechanisms of therapy-resistance or new drug development.

Mutation screening tests based on the hotspot *KRAS* codons 12 and 13 have resulted in the mis-classification of up to one-third of patients that were erroneously considered as *KRAS* wild-type and were resistant to anti-EGFR treatments [102, 103]. *KRAS* mutations in codons 61 and 146 are significantly associated with shorter progression-free survival compared with wild-type *KRAS* in CRC patients treated with a combination of cetuximab and chemotherapy [104]. Although many questions remain to be answered to uncover the impact of *KRAS*^{A146T} mutation in CRC drug resistance, to our knowledge this is the first description of the effect of this recently discovered mutation on downstream signaling pathways, proliferation, migration and cell adhesion in EGF-stimulated CRC cells. Thus, our results further reinforce the importance of extending the

SUMMARY

mutation screening tests to the less frequent hotspot mutations such as codon 146 or 61 [36, 105], which could determine the EGF-response going from signal transduction to the global acetylome of tumor cells.

Indeed, the acetylation/deacetylation process is involved in the modulation of the EGF-response in experimental and clinical CRC studies [109]. However, how the mutational status of *KRAS* can affect the acetylome of CRC is so far not known. In agreement with our observations about hnRNPs acetylation, one of the largest acetylome studies showed that the main functional networks modulated by acetylation were related to RNA maturation [73]. All in all, although the prominent role of hnRNPs in tumor progression has been already described [115-117], this is the first report showing a relation between *KRAS* mutational status and hnRNP acetylation. The highest level of acetyl-hnRNPs, and also the largest number of acetylated proteins, was found in cells harboring one single allele of *KRAS*^{G13D}. Accordingly, our molecular and biological characterization of *KRAS*^{G13D} cell line confirmed the more oncogenic behavior of these cells (HAE6).

In fact, under basal conditions, while proliferation and migration rates were dramatically higher, cell adhesion was

lower in HAE6 (*KRAS*^{G13D/-}) than in HAF1 (*KRAS*^{A146T/-}) cells. It has been proposed that oncogenic *KRAS* might promote tumor progression by limiting the efficacy of RAS/RAF/MEK/ERK1/2 signaling, whereas *KRAS*-responsive tissues exhibit a full activated signaling pathway, and trigger potent antitumor responses [100]. In agreement with this, HAE6 cells showed an EGF-unresponsive MAPK signaling pathway. Consistently, the acetylation of hnRNPL and A1 remained unchanged after EGF-treatment. Furthermore, EGF could not further induce in these cells, any of the biological responses described for this growth factor, i.e. cell proliferation, adhesion or migration.

The functional consequences of hnRNP acetylation are still unknown; however, in agreement with a *KRAS*-dependent modulation of hnRNP acetylation, several hnRNP family members are modulated by the MAPK pathway [139, 140]. This phosphorylation may condition hnRNP subcellular distribution and function [97]. The possible interplay between acetylation and phosphorylation of specific hnRNPs remains elusive. In the near future, it would be important to study whether this putative interplay could determine mRNA splicing, stability, transport or translation of specific genes involved in tumorigenesis or

resistance to anti-tumor therapies. On the other hand, since CRC cells also harbor KRAS-independent mutations, we cannot rule out the suggestive idea of hnRNPs acetylation as the point where different signaling pathways converge. The mutation-induced activation of one or more of these pathways might result in hnRNPs hyperacetylation. Should this hypothesis be confirmed, the relevance and extension of our data would be increased from both, the molecular and clinical point of view.

V. Conclusions.

This research project has contributed to elucidate the relevant role of *KRAS* mutations and allelic imbalance in the general behaviour of CCR cells, as well as their influence over specific molecular targets within this relevant signalling pathway. Our final conclusions are:

1. *KRAS* mutational status could be modified under the pressure of an allelic imbalance. New spontaneous mutations could emerge as *KRAS*^{A146T} in mono-allelic wild type *KRAS* cells.

2. Oncogenic potential of mutant *KRAS^{G13D}* allele seems to be dependent on the presence or absence of a wild-type allele. The latter would limit the tumoral activity of mutant *KRAS^{G13D}* allele.
3. Each *KRAS* activating mutation has a different tumorigenic potential in CCR cells. *KRAS^{G13D/-}* mutant cells presented a more aggressive tumoral phenotype compared to *KRAS^{A146T}* cells. Although less tumorigenic, *KRAS^{A146T}* presented a similar phenotype as *KRAS^{G13D/WT}* cells.
4. *KRAS^{G13D}* mutation, in the absence of a wild-type allele, leads to the hyperactivation of the pathway, which becomes insensitive to further stimulation with EGF.
5. Global transcription profile of CCR cells is not significantly affected by *KRAS* mutational status.
6. There is a *KRAS*-dependent differential acetylation profile of non-histone proteins. This profile defined tumorigenic behaviour of CCR cells. Moreover, among hyperacetylated proteins, the molecular functions related to mRNA processing and transport are overrepresented.

SUMMARY

7. Acetylation of hnRNPs, but not expression, is part of the EGF-response and likely modulated by deacetylases in CCR cells.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates**

- for **40 countries in 2012**. *European journal of cancer* 2013, **49**(6):1374-1403.
2. Siegel R, Desantis C, Jemal A: **Colorectal cancer statistics, 2014**. *CA: a cancer journal for clinicians* 2014, **64**(2):104-117.
 3. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J: **Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008**. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2013, **132**(5):1133-1145.
 4. Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, Maroun J, Walde D, Weaver C, Harrison E *et al*: **Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study**. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001, **19**(8):2282-2292.
 5. Venook AP, Saltz LB: **Biologic agents in the treatment of colorectal cancer: the last decade; the lost decade?** *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting* 2013.
 6. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R *et al*: **Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer**. *The New England journal of medicine* 2014, **371**(17):1609-1618.
 7. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW: **Hereditary and familial colon cancer**. *Gastroenterology* 2010, **138**(6):2044-2058.
 8. Meyerhardt JA, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, Hu FB, Mayer RJ, Nelson H, Whittom R, Hantel A, Thomas J *et al*: **Association of dietary patterns with cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer**. *Jama* 2007, **298**(7):754-764.

9. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW: **Colorectal cancer**. *Lancet (London, England)* 2005, **365**(9454):153-165.
10. Fearon ER, Vogelstein B: **A genetic model for colorectal tumorigenesis**. *Cell* 1990, **61**(5):759-767.
11. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
12. Sugarbaker J, Gunderson L, Wittes R: **Colorectal Cancer in Cancer: Principles and Practices of Oncology**. *Devita S Hellman and SA Rosenberg* 1985:800-803.
13. Lipkin M: **Biomarkers of increased susceptibility to gastrointestinal cancer: new application to studies of cancer prevention in human subjects**. *Cancer research* 1988, **48**(2):235-245.
14. Esteller M, Herman JG: **Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours**. *The Journal of pathology* 2002, **196**(1):1-7.
15. Kinzler KW, Vogelstein B: **Lessons from hereditary colorectal cancer**. *Cell* 1996, **87**(2):159-170.
16. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N *et al*: **The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers**. *Science (New York, NY)* 2006, **314**(5797):268-274.
17. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J *et al*: **The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers**. *Science (New York, NY)* 2007, **318**(5853):1108-1113.
18. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR *et al*: **Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer**. *Science (New York, NY)* 1993, **260**(5109):812-816.
19. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: **Microsatellite instability in cancer of the proximal colon**. *Science (New York, NY)* 1993, **260**(5109):816-819.
20. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: **Ubiquitous somatic mutations in simple repeated**

- sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993, **363**(6429):558-561.
21. Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D: **Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer.** *BMJ (Clinical research ed)* 1993, **306**(6880):752-755.
 22. Lucas AS, O'Neil BH, Goldberg RM: **A decade of advances in cytotoxic chemotherapy for metastatic colorectal cancer.** *Clinical colorectal cancer* 2011, **10**(4):238-244.
 23. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D: **Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2014, **25** Suppl 3:iii1-9.
 24. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Siena S, Bardelli A: **Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution.** *Cancer discovery* 2014, **4**(11):1269-1280.
 25. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Gilberg F, Rittweger K, Schmoll HJ: **Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, **29**(11):1465-1471.
 26. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ: **Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004, **22**(7):1209-1214.
 27. Jordan K, Kellner O, Kegel T, Schmoll HJ, Grothey A: **Phase II trial of capecitabine/irinotecan and**

- capecitabine/oxaliplatin in advanced gastrointestinal cancers. *Clinical colorectal cancer* 2004, **4**(1):46-50.
28. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G *et al*: **FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study**. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004, **22**(2):229-237.
29. Baselga J: **The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab**. *European journal of cancer* 2001, **37** Suppl 4:S16-22.
30. Huang SM, Harari PM: **Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results**. *Investigational new drugs* 1999, **17**(3):259-269.
31. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N: **Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies**. *Critical reviews in oncology/hematology* 1995, **19**(3):183-232.
32. Liu D, Aguirre Ghiso J, Estrada Y, Ossowski L: **EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma**. *Cancer cell* 2002, **1**(5):445-457.
33. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J: **Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1995, **1**(11):1311-1318.
34. Giannopoulou E, Antonacopoulou A, Matsouka P, Kalofonos HP: **Autophagy: novel action of panitumumab in colon cancer**. *Anticancer research* 2009, **29**(12):5077-5082.
35. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J *et al*: **Randomized, phase III trial of panitumumab with**

- infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, **28**(31):4697-4705.
36. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J *et al*: **Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer.** *The New England journal of medicine* 2013, **369**(11):1023-1034.
37. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S *et al*: **Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, **29**(15):2011-2019.
38. Macedo LT, da Costa Lima AB, Sasse AD: **Addition of bevacizumab to first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, with emphasis on chemotherapy subgroups.** *BMC cancer* 2012, **12**:89.
39. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, Ruff P, van Hazel GA, Moiseyenko V, Ferry D *et al*: **Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012, **30**(28):3499-3506.
40. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schutz G, Thierauch KH, Zopf D: **Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic,**

- stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2011, **129**(1):245-255.
41. Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J *et al*: **Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells.** *Nature* 1984, **309**(5967):418-425.
 42. Wells A: **EGF receptor.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 1999, **31**(6):637-643.
 43. Stern DF: **Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases.** *Breast cancer research : BCR* 2000, **2**(3):176-183.
 44. Krishna M, Narang H: **The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2008, **65**(22):3525-3544.
 45. Owens DM, Keyse SM: **Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases.** *Oncogene* 2007, **26**(22):3203-3213.
 46. Vivanco I, Sawyers CL: **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(7):489-501.
 47. Sjolander A, Yamamoto K, Huber BE, Lapetina EG: **Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(18):7908-7912.
 48. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J: **Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras.** *Nature* 1994, **370**(6490):527-532.
 49. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA: **Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene.** *Nature* 1982, **297**(5866):474-478.

BIBLIOGRAFIA

50. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM: **Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982, **79**(11):3637-3640.
51. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Janne PA, Januario T, Johnson DH *et al*: **Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, **23**(25):5900-5909.
52. Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J, Menzies A, Teague JW, Futreal PA, Stratton MR: **The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC).** *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L Haines [et al]* 2008, **Chapter 10**:Unit 10.11.
53. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH: **Mechanism of activation of a human oncogene.** *Nature* 1982, **300**(5888):143-149.
54. Prior IA, Lewis PD, Mattos C: **A comprehensive survey of Ras mutations in cancer.** *Cancer research* 2012, **72**(10):2457-2467.
55. Dempke WC: **Farnesyltransferase inhibitors--a novel approach in the treatment of advanced pancreatic carcinomas.** *Anticancer research* 2003, **23**(2a):813-818.
56. Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F: **Dragging ras back in the ring.** *Cancer cell* 2014, **25**(3):272-281.
57. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A *et al*: **COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of**

- Somatic Mutations in Cancer.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Database issue):D945-950.
58. Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, Greenman C, Davies H, Dalgliesh G, Forbes S *et al*: **Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer.** *Cancer biology & therapy* 2006, **5**(8):928-932.
59. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M *et al*: **KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer.** *Cancer research* 2006, **66**(8):3992-3995.
60. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R *et al*: **Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008, **26**(10):1626-1634.
61. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, Celik I, Kohne CH: **Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials.** *European journal of cancer* 2012, **48**(10):1466-1475.
62. Imamura Y, Morikawa T, Liao X, Lochhead P, Kuchiba A, Yamauchi M, Qian ZR, Nishihara R, Meyerhardt JA, Haigis KM *et al*: **Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012, **18**(17):4753-4763.
63. Er TK, Chen CC, Bujanda L, Herreros-Villanueva M: **Clinical relevance of KRAS mutations in codon 13: Where are we?** *Cancer letters* 2014, **343**(1):1-5.
64. Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, Schilsky RL: **Extended RAS Gene Mutation**

- Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015.
65. Herreros-Villanueva M, Gomez-Manero N, Muniz P, Garcia-Giron C, Coma del Corral MJ: **PIK3CA mutations in KRAS and BRAF wild type colorectal cancer patients. A study of Spanish population.** *Molecular biology reports* 2011, **38**(2):1347-1351.
66. Carson R, Celtikci B, Fenning C, Javadi A, Crawford N, Perez-Carbonell L, Lawler M, Longley DB, Johnston PG, Van Schaeybroeck S: **HDAC Inhibition Overcomes Acute Resistance to MEK Inhibition in BRAF-Mutant Colorectal Cancer by Downregulation of c-FLIPL.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015, **21**(14):3230-3240.
67. Sebastian C, Mostoslavsky R: **Untangling the fiber yarn: butyrate feeds Warburg to suppress colorectal cancer.** *Cancer discovery* 2014, **4**(12):1368-1370.
68. Huang WC, Chen CC: **Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity.** *Molecular and cellular biology* 2005, **25**(15):6592-6602.
69. Mellert HS, Stanek TJ, Sykes SM, Rauscher FJ, 3rd, Schultz DC, McMahon SB: **Deacetylation of the DNA-binding domain regulates p53-mediated apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(6):4264-4270.
70. Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L *et al*: **An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function.** *Molecular cell* 2007, **25**(1):151-159.
71. Grozinger CM, Schreiber SL: **Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization.** *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(14):7835-7840.
72. Zhou X, Richon VM, Wang AH, Yang XJ, Rifkind RA, Marks PA: **Histone deacetylase 4 associates with extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and its cellular localization is regulated by oncogenic Ras.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(26):14329-14333.
73. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M: **Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions.** *Science (New York, NY)* 2009, **325**(5942):834-840.
74. Huang WC, Ju TK, Hung MC, Chen CC: **Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-kappaB.** *Molecular cell* 2007, **26**(1):75-87.
75. Vucic EA, Brown CJ, Lam WL: **Epigenetics of cancer progression.** *Pharmacogenomics* 2008, **9**(2):215-234.
76. Ishihama K, Yamakawa M, Semba S, Takeda H, Kawata S, Kimura S, Kimura W: **Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas.** *Journal of clinical pathology* 2007, **60**(11):1205-1210.
77. Fraga MF, Esteller M: **Epigenetics and aging: the targets and the marks.** *Trends in genetics : TIG* 2007, **23**(8):413-418.
78. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP: **HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase.** *Nature* 2002, **417**(6887):455-458.
79. Leech SH, Evans CA, Shaw L, Wong CH, Connolly J, Griffiths JR, Whetton AD, Corfe BM: **Proteomic analyses of intermediate filaments reveals cytokeratin8 is highly acetylated--implications for colorectal epithelial homeostasis.** *Proteomics* 2008, **8**(2):279-288.
80. Sun XJ, Man N, Tan Y, Nimer SD, Wang L: **The Role of Histone Acetyltransferases in Normal and Malignant Hematopoiesis.** *Frontiers in oncology* 2015, **5**:108.

81. Damaskos C, Karatzas T, Nikolidakis L, Kostakis ID, Karamaroudis S, Boutsikos G, Damaskou Z, Kostakis A, Kouraklis G: **Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Current Evidence for Therapeutic Activities in Pancreatic Cancer.** *Anticancer research* 2015, **35**(6):3129-3135.
82. Gargalionis AN, Piperi C, Adamopoulos C, Papavassiliou AG: **Histone modifications as a pathogenic mechanism of colorectal tumorigenesis.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012, **44**(8):1276-1289.
83. Smyth G: **Limma: Linear Models for Microarray Data.** *New York, Springer* 2005, **Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**(2005):397-420.
84. Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, Willis SG, Eide CA, Levine RL, Heinrich MC, Gattermann N, Gilliland DG, Druker BJ *et al*: **High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients.** *Blood* 2009, **113**(8):1749-1755.
85. Park JT, Johnson N, Liu S, Levesque M, Wang YJ, Ho H, Huso D, Maitra A, Parsons MJ, Prescott JD *et al*: **Differential in vivo tumorigenicity of diverse KRAS mutations in vertebrate pancreas: A comprehensive survey.** *Oncogene* 2015, **34**(21):2801-2806.
86. Carracedo A, Pandolfi PP: **The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks.** *Oncogene* 2008, **27**(41):5527-5541.
87. She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, Solit DB, Rosen N: **4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors.** *Cancer cell* 2010, **18**(1):39-51.
88. Grasso S, Tristante E, Saceda M, Carbonell P, Mayor-Lopez L, Carballo-Santana M, Carrasco-Garcia E, Rocamora-Reverte L, Garcia-Morales P, Carballo F *et al*: **Resistance to Selumetinib (AZD6244) in colorectal cancer cell lines is mediated by p70S6K and RPS6 activation.** *Neoplasia (New York, NY)* 2014, **16**(10):845-860.

89. Tolcher AW, Khan K, Ong M, Banerji U, Papadimitrakopoulou V, Gandara DR, Patnaik A, Baird RD, Olmos D, Garrett CR *et al*: **Antitumor activity in RAS-driven tumors by blocking AKT and MEK.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015, **21**(4):739-748.
90. Holt SV, Logie A, Davies BR, Alferez D, Runswick S, Fenton S, Chresta CM, Gu Y, Zhang J, Wu YL *et al*: **Enhanced apoptosis and tumor growth suppression elicited by combination of MEK (selumetinib) and mTOR kinase inhibitors (AZD8055).** *Cancer research* 2012, **72**(7):1804-1813.
91. Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Garrido-Laguna I, Kurzrock R: **PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers.** *PloS one* 2011, **6**(7):e22769.
92. Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce JS, Huttenlocher A: **Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(51):48382-48388.
93. Jeannot V, Busser B, Brambilla E, Wislez M, Robin B, Cadranet J, Coll JL, Hurbin A: **The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014, **134**(11):2560-2571.
94. Tan GJ, Peng ZK, Lu JP, Tang FQ: **Cathepsins mediate tumor metastasis.** *World journal of biological chemistry* 2013, **4**(4):91-101.
95. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N: **Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2002, **3**(3):195-205.
96. Han SP, Tang YH, Smith R: **Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives.** *The Biochemical journal* 2010, **430**(3):379-392.

BIBLIOGRAFIA

97. Castellano E, Downward J: **RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway.** *Genes & cancer* 2011, **2**(3):261-274.
98. Yuen HF, Abramczyk O, Montgomery G, Chan KK, Huang YH, Sasazuki T, Shirasawa S, Gopesh S, Chan KW, Fennell D *et al*: **Impact of oncogenic driver mutations on feedback between the PI3K and MEK pathways in cancer cells.** *Bioscience reports* 2012, **32**(4):413-422.
99. Hayashi H, Tsuchiya Y, Nakayama K, Satoh T, Nishida E: **Down-regulation of the PI3-kinase/Akt pathway by ERK MAP kinase in growth factor signaling.** *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2008, **13**(9):941-947.
100. Hartman DJ, Davison JM, Foxwell TJ, Nikiforova MN, Chiosea SI: **Mutant allele-specific imbalance modulates prognostic impact of KRAS mutations in colorectal adenocarcinoma and is associated with worse overall survival.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2012, **131**(8):1810-1817.
101. Kalikaki A, Politaki H, Souglakos J, Apostolaki S, Papadimitraki E, Georgoulia N, Tzardi M, Mavroudis D, Georgoulas V, Voutsina A: **KRAS genotypic changes of circulating tumor cells during treatment of patients with metastatic colorectal cancer.** *PloS one* 2014, **9**(8):e104902.
102. Wang HL, Lopategui J, Amin MB, Patterson SD: **KRAS mutation testing in human cancers: The pathologist's role in the era of personalized medicine.** *Advances in anatomic pathology* 2010, **17**(1):23-32.
103. Smith G, Bounds R, Wolf H, Steele RJ, Carey FA, Wolf CR: **Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine.** *British journal of cancer* 2010, **102**(4):693-703.
104. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E *et al*: **KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to**

- cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer.** *British journal of cancer* 2009, **101**(4):715-721.
105. Imamura Y, Lochhead P, Yamauchi M, Kuchiba A, Qian ZR, Liao X, Nishihara R, Jung S, Wu K, Nosho K *et al*: **Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review.** *Molecular cancer* 2014, **13**:135.
106. Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T: **Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras.** *Science (New York, NY)* 1993, **260**(5104):85-88.
107. Zhang Z, Wang Y, Vikis HG, Johnson L, Liu G, Li J, Anderson MW, Sills RC, Hong HL, Devereux TR *et al*: **Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice.** *Nature genetics* 2001, **29**(1):25-33.
108. Soh J, Okumura N, Lockwood WW, Yamamoto H, Shigematsu H, Zhang W, Chari R, Shames DS, Tang X, MacAulay C *et al*: **Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells.** *PLoS one* 2009, **4**(10):e7464.
109. LaBonte MJ, Wilson PM, Fazzino W, Russell J, Louie SG, El-Khoueiry A, Lenz HJ, Ladner RD: **The dual EGFR/HER2 inhibitor lapatinib synergistically enhances the antitumor activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat in colorectal cancer models.** *Cancer research* 2011, **71**(10):3635-3648.
110. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H *et al*: **Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation.** *Science (New York, NY)* 2010, **327**(5968):1000-1004.
111. Jaworski DM, Namboodiri AM, Moffett JR: **Acetate as a Metabolic and Epigenetic Modifier of Cancer Therapy.** *Journal of cellular biochemistry* 2015.

BIBLIOGRAFIA

112. Powers MV, Clarke PA, Workman P: **Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis.** *Cancer cell* 2008, **14**(3):250-262.
113. Arif M, Senapati P, Shandilya J, Kundu TK: **Protein lysine acetylation in cellular function and its role in cancer manifestation.** *Biochimica et biophysica acta* 2010, **1799**(10-12):702-716.
114. Thapar R, Denmon AP: **Signaling pathways that control mRNA turnover.** *Cellular signalling* 2013, **25**(8):1699-1710.
115. Chen LC, Liu HP, Li HP, Hsueh C, Yu JS, Liang CL, Chang YS: **Thymidine phosphorylase mRNA stability and protein levels are increased through ERK-mediated cytoplasmic accumulation of hnRNP K in nasopharyngeal carcinoma cells.** *Oncogene* 2009, **28**(17):1904-1915.
116. Ma YL, Peng JY, Zhang P, Huang L, Liu WJ, Shen TY, Chen HQ, Zhou YK, Zhang M, Chu ZX *et al*: **Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is identified as a potential biomarker for colorectal cancer based on differential proteomics technology.** *Journal of proteome research* 2009, **8**(10):4525-4535.
117. Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Takatsuka J, Nakagama H: **Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers.** *International journal of oncology* 2005, **26**(3):635-640.
118. Torvund-Jensen J, Steengaard J, Reimer L, Fihl LB, Laursen LS: **Transport and translation of MBP mRNA is regulated differently by distinct hnRNP proteins.** *Journal of cell science* 2014, **127**(Pt 7):1550-1564.
119. Shilo A, Ben Hur V, Denichenko P, Stein I, Pikarsky E, Rauch J, Kolch W, Zender L, Karni R: **Splicing factor hnRNP A2 activates the Ras-MAPK-ERK pathway by controlling A-Raf splicing in hepatocellular carcinoma development.** *Rna* 2014, **20**(4):505-515.
120. Shin KH, Kim RH, Kim RH, Kang MK, Park NH: **hnRNP G elicits tumor-suppressive activity in part by upregulating**

- the expression of Txnip. *Biochemical and biophysical research communications* 2008, **372**(4):880-885.
121. Shin KH, Kim RH, Yu B, Kang MK, Elashoff D, Christensen R, Pucar A, Park NH: **Expression and mutation analysis of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G in human oral cancer.** *Oral oncology* 2011, **47**(11):1011-1016.
122. Guo Y, Zhao J, Bi J, Wu Q, Wang X, Lai Q: **Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a tissue biomarker for detection of early hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis.** *Journal of hematology & oncology* 2012, **5**:37.
123. Barboro P, Ferrari N, Balbi C: **Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression.** *Cancer letters* 2014, **352**(2):152-159.
124. Kumar M, Matta A, Masui O, Srivastava G, Kaur J, Thakar A, Shukla NK, RoyChoudhury A, Sharma M, Walfish PG *et al*: **Nuclear heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D is associated with poor prognosis and interactome analysis reveals its novel binding partners in oral cancer.** *Journal of translational medicine* 2015, **13**:285.
125. Polisetty RV, Gautam P, Gupta MK, Sharma R, Uppin MS, Challa S, Ankathi P, Purohit AK, Renu D, Harsha HC *et al*: **Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and their interactors are a major class of deregulated proteins in anaplastic astrocytoma: a grade III malignant glioma.** *Journal of proteome research* 2013, **12**(7):3128-3138.
126. Mizuno H, Honda M, Shirasaki T, Yamashita T, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S: **Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma.** *Liver Int* 2012, **32**(7):1146-1155.
127. Gu W, Liu W, Shen X, Shi Y, Wang L, Liu H: **Emergence of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 vs loss of E-cadherin: their reciprocal immunoexpression profiles in human pancreatic cancer.** *Annals of diagnostic pathology* 2013, **17**(1):14-17.

BIBLIOGRAFIA

128. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A: **Cancer treatment and survivorship statistics, 2014**. *CA: a cancer journal for clinicians* 2014, **64**(4):252-271.
129. Bardelli A, Siena S: **Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer**. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, **28**(7):1254-1261.
130. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S *et al*: **K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer**. *The New England journal of medicine* 2008, **359**(17):1757-1765.
131. Ciardiello F, Normanno N, Maiello E, Martinelli E, Troiani T, Pisconti S, Giuliani F, Barone C, Carteni G, Rachiglio AM *et al*: **Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: findings from the CAPRI-GOIM trial**. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2014, **25**(9):1756-1761.
132. Ciardiello F, Tortora G: **EGFR antagonists in cancer treatment**. *The New England journal of medicine* 2008, **358**(11):1160-1174.
133. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H *et al*: **Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab**. *Jama* 2010, **304**(16):1812-1820.
134. Gryder BE, Sodji QH, Oyelere AK: **Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed**. *Future medicinal chemistry* 2012, **4**(4):505-524.
135. Liu L, Chen B, Qin S, Li S, He X, Qiu S, Zhao W, Zhao H: **A novel histone deacetylase inhibitor Chidamide induces apoptosis of human colon cancer cells**. *Biochemical and*

- biophysical research communications* 2010, **392**(2):190-195.
136. Emonds E, Fitzner B, Jaster R: **Molecular determinants of the antitumor effects of trichostatin A in pancreatic cancer cells.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2010, **16**(16):1970-1978.
137. Jung JW, Cho SD, Ahn NS, Yang SR, Park JS, Jo EH, Hwang JW, Jung JY, Kim SH, Kang KS *et al*: **Ras/MAP kinase pathways are involved in Ras specific apoptosis induced by sodium butyrate.** *Cancer letters* 2005, **225**(2):199-206.
138. Van Schaeybroeck S, Kyula JN, Fenton A, Fenning CS, Sasazuki T, Shirasawa S, Longley DB, Johnston PG: **Oncogenic Kras promotes chemotherapy-induced growth factor shedding via ADAM17.** *Cancer research* 2011, **71**(3):1071-1080.
139. Parikh N, Shuck RL, Nguyen TA, Herron A, Donehower LA: **Mouse tissues that undergo neoplastic progression after K-Ras activation are distinguished by nuclear translocation of phospho-Erk1/2 and robust tumor suppressor responses.** *Molecular cancer research : MCR* 2012, **10**(6):845-855.
140. Guil S, Long JC, Caceres JF: **hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response.** *Molecular and cellular biology* 2006, **26**(15):5744-5758.