

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADO CON LA DIVISIÓN ASIMÉTRICA EN DIFERENTES MODELOS TUMORALES.

Pablo Caruana Santiago

Grado En biotecnología, 2011-2015

Facultad de ciencias Experimentales

Tutores

Miguel Saceda Sánchez

María del Pilar García Morales

Índice

Abreviaturas y Acrónimos

Resumen.....	Pág. 1
1. Introducción.....	Pág. 2
2. Antecedentes.....	Pág. 4
-Objetivos.....	Pág. 6
3. Materiales y métodos.....	Pág. 7
3.1 Líneas celulares.....	Pág. 7
3.2 Tratamiento con TSA.....	Pág. 7
3.3 Aislamiento del ARN.....	Pág. 7
3.4 Retrotranscripción.....	Pág. 8
3.5 PCR cuantitativa a tiempo real.....	Pág. 8
4. Resultados.....	Pág. 9
5. Discusión.....	Pág. 21
6. Conclusiones.....	Pág. 24
7. Proyecciones futuras.....	Pág. 25
8. Bibliografía.....	Pág. 26

Abreviaturas y acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Acido desoxirribonucleico complementario

ALL-1: Acute lymphocytic leukemia susceptibility gene 1

BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

CSIC: Consejo superior de investigaciones científicas

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Dr: Doctor

Dra.: Doctora

ERESA: Exploraciones Radiológicas Especiales S.L.

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GB: Glioblastoma

GPSM2: G-protein signaling modulator 2

Gy: Grays

TMZ: Temozolamida

TRIM2: Tripartite motif containing 2

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATCC: American Type Culture Collection

HGUE: Hospital General Universitario de Elche

IMIM: Instituto Municipal de Investigaciones Médicas

INSC: Inscuteable homolog

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MLLT4 (AF-6): myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 4

NTC: Non Template Control

PBS: Tampón fosfato salino

RAP2A: Member of ras oncogene family.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SBF: Suero fetal bovino

sd: desviación estándar

TSA: Tricostatina A

Resumen

Este trabajo se centra, en colaboración con la Dra. Ana Carmena del CSIC, en la caracterización de un panel de genes relacionados con la división asimétrica en *Drosophila melanogaster*, en diferentes cultivos primarios y líneas celulares tumorales humanas, como un primer paso para determinar su posible participación en los procesos carcinogénicos y en la sensibilidad o resistencia a los tratamientos antineoplásicos y su posible utilización como marcadores.

En el estudio nos hemos centrado inicialmente en los genes MLLT4, INSC y GPSM2 demostrando su expresión en diferentes modelos celulares, especialmente en glioblastoma multiforme. Durante el transcurso del trabajo se incluyeron también los genes RAP2A y TRIM2.

Nuestros resultados muestran que RAP2A podría ser un gen supresor en glioblastoma multiforme, además hemos demostrado que algunos de estos genes son regulados en su expresión por el inhibidor de deacetilasas de histonas TSA, sugiriendo un control epigenético de su expresión.

Los tratamientos utilizados en clínica para el glioblastoma multiforme (temozolamida y radioterapia) también afectan la expresión de algunos de estos genes, por lo que alguno de ellos podría constituirse en biomarcador de sensibilidad y/o resistencia a los mismos.

Summary

This paper focuses, in collaboration with Dr. Ana Carmena from CSIC, in the characterization of a panel of genes related to the asymmetric division in *Drosophila melanogaster*, in primary cultures and different human tumour cell lines, as a first step to determine their possible participation in the carcinogenic process and the sensitivity or resistance to anticancer treatments and their possible use as markers.

In this study we have initially focused on MLLT4, INSC and GPSM2 genes showing their expression in different cell models, especially in glioblastoma multiforme. Throughout the work Rap2a and TRIM2 genes were also included.

Our results show that Rap2a could be a suppressor gene in glioblastoma multiforme; we have also shown that some of these genes have got their expression regulated by histone deacetylase inhibitors such as TSA, suggesting an epigenetic control of their expression.

Treatments used in clinical for glioblastoma multiforme (temozolomide and radiotherapy) also affect the expression of some of these genes, so any of them might be a biomarker of sensitivity and / or resistance to these treatments.

1. INTRODUCCIÓN

El término cáncer engloba a diversas patologías caracterizadas por la presencia de una división celular descontrolada. El cáncer es un proceso patológico multifactorial en el que participan factores genéticos, epigenéticos y ambientales que actúan de forma simultánea y secuencial. Generalmente el cáncer se da en un marco de mutaciones en el ADN relacionadas con la división celular y la apoptosis, favoreciendo así la división descontrolada y la imposibilidad del sistema inmune de eliminar este tipo de células, lo que provoca en la mayoría de los casos la formación de un tumor. Los mecanismos de reparación de daño en el ADN están igualmente alterados en muchos tipos de tumores, por lo que dicho daño se puede perpetuar durante las diferentes divisiones celulares.

Durante la última década, la conexión emergente entre el proceso de división celular asimétrica, propia de las células madre y la oncogénesis, se ha convertido en uno de los temas de investigación más apasionantes en el ámbito de la oncología molecular¹⁻⁴. Desentrañar los mecanismos que subyacen a los vínculos entre estos procesos constituye un importante desafío, con una implicación importante en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer.

La hipótesis de las células madre tumorales.

Las células madre poseen dos características principales: (1) la capacidad de "auto-renovarse", generando más células madre y (2) la capacidad de producir las células que están destinadas a iniciar un proceso de diferenciación. La división celular asimétrica es el mecanismo por el cual las células madre generan estos dos tipos de células, y esto puede proporcionar nuevos conocimientos sobre la oncogénesis a la luz de la llamada hipótesis de las células madre cancerosas. Esta hipótesis sostiene que los tumores humanos pueden proceder de la transformación de las células madre normales en células madre cancerosas o alternativamente que el tumor podría originarse por la transformación de células normales que adquirirían durante esa transformación características de célula madre. Estas células madre tumorales representarían una población muy pequeña dentro del tumor y sin embargo en base a sus propiedades desempeñarían un papel clave tanto en la diseminación de las células tumorales para generar metástasis, como en la adquisición de resistencia a los tratamientos antitumorales³ (figura 1).

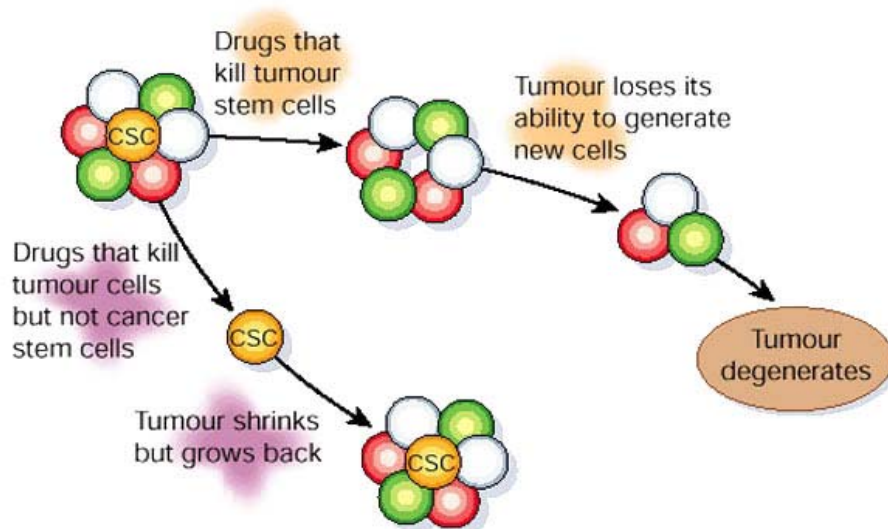


Figura 1. Terapias dirigidas a células madre cancerosas en comparación a las terapias convencionales. Únicamente los fármacos capaces de matar a las células madre cancerosas podrán contribuir a la erradicación del tumor. (Reya et al., 2001)³.

Desde que se formuló la hipótesis de las células madre tumorales, éstas se han identificado en varios tipos de cánceres humanos, incluyendo tumores sólidos⁵, aunque su relevancia en los procesos tumorales no ha sido totalmente demostrada. Dada la gran variedad de terapias contra el cáncer, la comprensión en profundidad de la biología de las células madre tumorales es crucial. Mutaciones del ADN en las células madre normales podrían ser la fuerza motriz que las transforma en las células madre tumorales^{6,7}. Por otra parte, como las células madre se dividen asimétricamente, fallos en este proceso podrían conducir a esta transformación (Fig. 2).

Actualmente, existen bastantes controversias con respecto al papel de estas células madre tumorales^{8,9}. Varios trabajos publicados en los últimos años, utilizando células madre neurales de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como sistema modelo, han demostrado que las mutaciones en genes clave para la regulación del proceso de la división celular asimétrica son responsables de la formación de tumores e incluso para el crecimiento metastásico¹⁰⁻¹³.

ASYMMETRIC CELL DIVISION Stem cell proliferation /Cancer

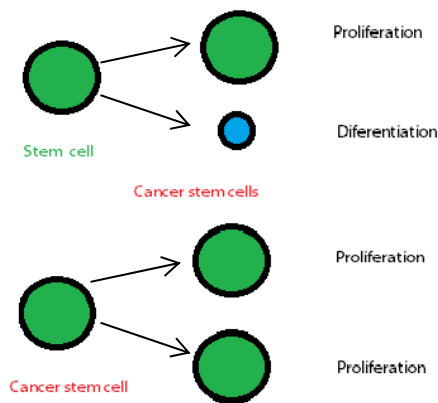


Figura 2. División asimétrica de las células madre normales en comparación con las células madre cancerosas.

La Doctora Ana Carmena, investigadora del CSIC con la que nuestro grupo colabora, ha identificado numerosos genes que regulan la división asimétrica de las células madre en *Drosophila melanogaster*, observando además que para muchos de ellos existen genes humanos homólogos que son candidatos a oncogenes o a genes supresores de tumores.

Partiendo de un panel de genes identificados por el grupo de la Dra. Carmena como participantes directos o asociados al proceso de división asimétrica en células madre de *Drosophila*, mi trabajo de fin de grado se basa en testar los homólogos humanos de estos genes y realizar un primer cribado en diferentes tipos de tumores comparando el nivel de expresión de estos genes en tejido normal con el del tejido tumoral mediante el uso de la q RT-PCR para determinar la importancia de los mismos en los procesos carcinogénicos y en la resistencia a los tratamientos quimio y radioterápicos.

2. Antecedentes

En estudios previos realizados por el grupo de la Dra. Ana Carmena, en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, se ha caracterizado en *Drosophila melanogaster*, el gen *Canoe*, relacionado con la división asimétrica de las células madre.

Canoe y sus ortólogos en vertebrados AF-6/Afadin son proteínas citoplasmáticas que están localizadas normalmente en las uniones intercelulares (Cell junctions) y comparten una estructura común, un dominio PDZ (este dominio participa en el anclaje de proteínas transmembrana al citoesqueleto y es importante para la estabilidad de los complejos de señalización celular), un dominio Forkhead (común en diferentes factores de transcripción relacionados con la diferenciación celular), y un dominio Dilute así como dos dominios asociados a Ras^{14,15}. El ortólogo de *Canoe*, AF-6, fue originalmente identificado como una proteína de fusión del oncogén ALL-1 (MLL), que está involucrado en leucemias humanas¹⁶.

Además, AF- 6 tiene un impacto en el pronóstico en cáncer de mama, niveles bajos de expresión de AF- 6 se han asociado con un peor pronóstico en el cáncer de mama¹⁷. Recientemente, se ha demostrado que la pérdida de AF-6 induce la invasión y el crecimiento tumoral¹⁸. Resultados similares se han observado en cáncer de colon¹⁹ y en cáncer de páncreas²⁰.

Canoe/AF-6 está involucrado por tanto, en gran medida en la regulación de la división asimétrica y también se comporta como un gen supresor de tumores. Un estudio de doble híbrido en el laboratorio de la Dra. Carmena, reveló nuevos patrones de asociación de canoe con funciones en la división asimétrica y con capacidad de supresión de tumores en *Drosophila melanogaster*²¹ y comunicación personal de la Dra. Carmena .

<i>Drosophila</i> "asymmetric cell division genes"	Mammalian homologs	
<i>DPar6</i>	→ <i>PAR-6</i>	Oncogene (breast cancer)
<i>Baz</i>	→ <i>PAR-3</i>	Tumor suppressor (breast cancer)
<i>DaPKC</i>	→ <i>aPKCζ</i>	Oncogene (lung cancer)
<i>insc</i>	→ <i>INSC</i>	?
<i>pins</i>	→ <i>mPins/LGN/AGS3</i>	Oncogene (breast cancer)
<i>canoe</i>	→ <i>AF-6/Afadin</i>	Tumor suppressor (breast cancer)
<i>scrib</i>	→ <i>VARTUL</i>	Tumor suppressor/Oncogene (breast cancer)
<i>dlg</i>	→ <i>DLG1-4</i>	Oncogene/tumor suppressor (cervical & colon cancer)
<i>lgl</i>	→ <i>LLGL/HUGL/MLGL</i>	Tumor suppressor (melanoma, colorectal cancer)
<i>brat</i>	→ <i>TRIM2/3/32</i>	?
<i>pros</i>	→ <i>PROX-1</i>	Oncogene (colon cancer)
<i>numb</i>	→ <i>NUMB/NUMB-LIKE</i>	Tumor suppressor (Notch-mediated breast cancer)

Tabla 1. Genes involucrados en la regulación de la división celular asimétrica y sus equivalentes en vertebrados.

La diferenciación posterior a la división asimétrica se realiza fundamentalmente por mecanismos epigenéticos que permiten a las células cambios (entre generaciones del individuo, pero transmitidas de célula a célula en las divisiones celulares) no incluidos en la secuencia de ADN, es decir, no se altera la secuencia de ADN aunque influye en su expresión. Los mecanismos epigenéticos pueden integrar señales genómicas y ambientales para controlar

el desarrollo de un fenotipo particular, por lo que están íntimamente ligados con la plasticidad fenotípica.

Desde este punto de vista resulta especialmente atrayente el desarrollo de terapias epigenéticas basadas en la inhibición de procesos tales como las modificaciones postraduccionales de las histonas. La terapia epigenética es especialmente interesante dado que los fenómenos epigenéticos asociados al cáncer son reversibles a diferencia de los cambios genéticos. Dentro de las terapias epigenéticas tienen especial relevancia los inhibidores de las deacetilasas de histonas como la Tricostatina A (TSA). El grupo en el que he realizado mi trabajo de fin de grado posee una dilatada experiencia en el estudio de los efectos de TSA en diferentes modelos experimentales, obteniendo mediante arrays de ADN, una amplia información de expresión génica diferencial en respuesta al tratamiento con TSA. Parte de la información de estos arrays se ha utilizado en la realización de este trabajo de fin de grado.

Objetivos

Este trabajo se centra en la caracterización de un panel de genes relacionados con la división asimétrica en *Drosophila melanogaster*, en diferentes cultivos primarios y líneas celulares tumorales humanas, como un primer paso para determinar su participación en los procesos carcinogénicos y en la sensibilidad o resistencia a los tratamientos antineoplásicos y su posible utilización como marcadores. Igualmente, trataremos de determinar si el tratamiento con TSA juega un papel en la regulación de la expresión de dichos genes.

Los objetivos específicos son:

OBJETIVO 1: Analizar la expresión de los homólogos humanos de los genes MLLT4, INSC y GPSM2 relacionados con la división asimétrica de células madre en microarrays de ADN de líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino, tratadas o no con TSA.

OBJETIVO 2: Extender los estudios de expresión de los genes del objetivo 1 a modelos celulares de diferentes tipos de tumores y a cultivos primarios obtenidos de lavados quirúrgicos de pacientes con glioblastoma multiforme.

OBJETIVO 3: Comparar los resultados de expresión de estos genes obtenidos en los cultivos primarios de glioblastoma con los datos obtenidos en un microarray de ADN que incluye muestras de pacientes con glioblastoma y su comparación con el nivel de expresión en cerebro normal.

OBJETIVO 4: Determinar si los niveles de expresión de estos genes se ven modificados por la irradiación (uno de los tratamientos habituales en los pacientes con glioblastoma) y el TSA (un fármaco epigenético)

3. Materiales y métodos:

3.1 Líneas celulares

El trabajo se ha realizado en líneas celulares de distintos tipos de tumores. Las líneas celulares utilizadas han sido: M220 (IMIM-PC-2), RWP1 y HS766T de adenocarcinoma de páncreas exocrino humano, SW480, HGUE-C-1 y HT-29 de adenocarcinoma humano de colon, U87 de glioblastoma multiforme humano. También se han utilizado los cultivos primarios de glioblastoma, HGUE-GB-16, HGUE-GB-17, HGUE-GB-18, HGUE-GB-30, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, HGUE-GB-40, HGUE-GB-41 y HGUE-GB-42.

Las líneas M220, RWP1, HS766T, SW480 y HT-29 fueron proporcionadas por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM) en Barcelona. Los cultivos primarios y la línea celular HGUE-C-1 fueron obtenidos en el Hospital General Universitario de Elche (HGUE). La línea celular U87 fue comprada a la ATCC

Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C y con un 5% de CO₂ en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con L-Glutamina a una concentración final de 2 mM, Penicilina/Estreptomicina (BioWhittaker) a una concentración final de 50 U/ml y suero fetal bovino (SBF) en una proporción del 10%. Los cultivos primarios se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo pero en esta ocasión, el medio utilizado fue DMEM/F12.

3.2 Tratamiento con TSA

Cuando los cultivos han alcanzado una confluencia del 70-80%, las células son tripsinizadas y sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos. Se añaden 2 ml de medio con 200.000 células por pocillo. Tras 24 horas de cultivo, las células se tratan con TSA 1 µM durante 6 horas.

3.3 Aislamiento del ARN

El ARN es aislado a partir del lisado celular empleando el kit RNAeasy plus de QIAGEN. Este kit incluye un paso destinado a la eliminación de ADN genómico tras la lisis de las células,

y se basa en la utilización de columnas de elución que contienen membranas de sílica-gel en las que el ARN queda adsorbido. La pureza y concentración del ARN purificado se determinaron mediante medidas espectrofotométricas a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NANODROP 1000 (Thermo Scientific).

3.4 Retrotranscripción

El ARN fue retrotranscrito a ADN complementario utilizando el kit “High capacity cDNA Archive Kit” de Applied Biosystems, siguiendo el protocolo de la casa comercial

3.5 PCR cuantitativa en tiempo real

La tecnología de la PCR cuantitativa está basada en la reacción de PCR y en la utilización de sondas marcadas con fluorescencia que permiten obtener información en tiempo real (ciclo a ciclo) de la cantidad de producto generado. La sonda fluorescente consiste en un oligonucleótido marcado en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un atenuador de fluorescencia. El espectro de emisión del fluoróforo y el espectro de absorción del atenuador de la fluorescencia están solapados, de modo que el atenuador absorbe la fluorescencia del fluoróforo mediante un proceso denominado FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) que exige proximidad espacial entre ambas moléculas. Esta sonda hibrida específicamente en una secuencia ubicada entre los dos cebadores específicos de nuestro gen de estudio, y a medida que se escinda por la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa, el fluoróforo es liberado y emite una señal fluorescente ya que no se encuentra bajo el efecto del atenuador. Conforme avanzan los ciclos las moléculas de fluoróforo van siendo escindidas de sus respectivas sondas, y ello permite monitorizar la intensidad de la fluorescencia a lo largo de todos los ciclos de la reacción de PCR y analizar el producto generado en la fase exponencial de la misma, el cual guarda relación directa con la cantidad de material de partida.

Las reacciones se llevaron a cabo empleando sondas TaqMan (TaqMan Gene Expression Assays) prediseñadas por Applied Biosystems. Para el estudio de MLLT4 se usaron las sondas Hs00984486_m1 y Hs00984472_m1, para GPSM2 la sonda Hs00203271_m1, para INSC la sonda Hs00416938_m1, para TRIM2 la sonda Hs 00991875_m1, y para RAP2A la sonda Hs00702699_s1. Como control interno se utilizó la sonda GAPDH (FAM) Hs 99999905_m1 para el mensajero del gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ya que este gen se expresa en las células de forma constitutiva y su expresión no varía en respuesta a los tratamientos empleados. Como medio de la reacción se empleó TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) que contiene todos los componentes necesarios para realizar

la PCR. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y se realizaron controles negativos NTC (*Non Template Control*) que contenían H²O en lugar de ADNc. El equipo empleado fue el termociclador 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems.

4. Resultados

El primer objetivo del trabajo fue analizar arrays pre-existentes en cáncer de páncreas observando la expresión de los genes MLLT4 (AF-6), GPSM2, e INSC y comparándolos con su expresión en dichas células tratadas con TSA, con el fin de determinar si la expresión de estos genes se ve alterada y por tanto pueden ser regulados por TSA.

El array de ADN del disponible en nuestro laboratorio, había sido diseñado para determinar el efecto del TSA sobre la expresión génica de 22.000 sondas en seis líneas de carcinoma de páncreas exocrino, M220, M186, RWP-1, PANC-1, HS766T y BXPC-3. Todas estas líneas celulares, con la excepción de la línea HS766T, eran inducidas a muerte celular programada por TSA. El primer resultado que obtuvimos al estudiar la expresión de los tres genes de interés es que uno de ellos, INSC, no estaba incluido entre las sondas estudiadas en el array. Otros resultados interesantes obtenidos fueron:

1. Los niveles de expresión de los genes MLLT4 y GPSM2 muestran bastante disparidad entre las distintas líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino analizadas en el array.
2. Los genes MLLT4 y GPSM2 están regulados por TSA en prácticamente todas las líneas celulares. Es interesante señalar que TSA regula negativamente la expresión de estos genes en algunas de las líneas celulares, mientras que en otras, ejerce una regulación positiva.

El siguiente paso, fue comprobar mediante qRT-PCR los resultados de expresión de MLLT4s previamente observados en los microarrays, en diferentes líneas tumorales. Para ello, se analizó la expresión de MLLT4 en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino, HS766T (resistentes a la muerte celular inducida por TSA) y M220 (sensibles a TSA) incluimos en el análisis por qRT-PCR tres líneas celulares de adenocarcinoma de colon control o tratadas con TSA con el fin de evaluar si MLLT4 se expresa en carcinoma de colon y si, en ese caso, es también regulado por TSA.

Efecto del TSA sobre MLLT4 mRNA

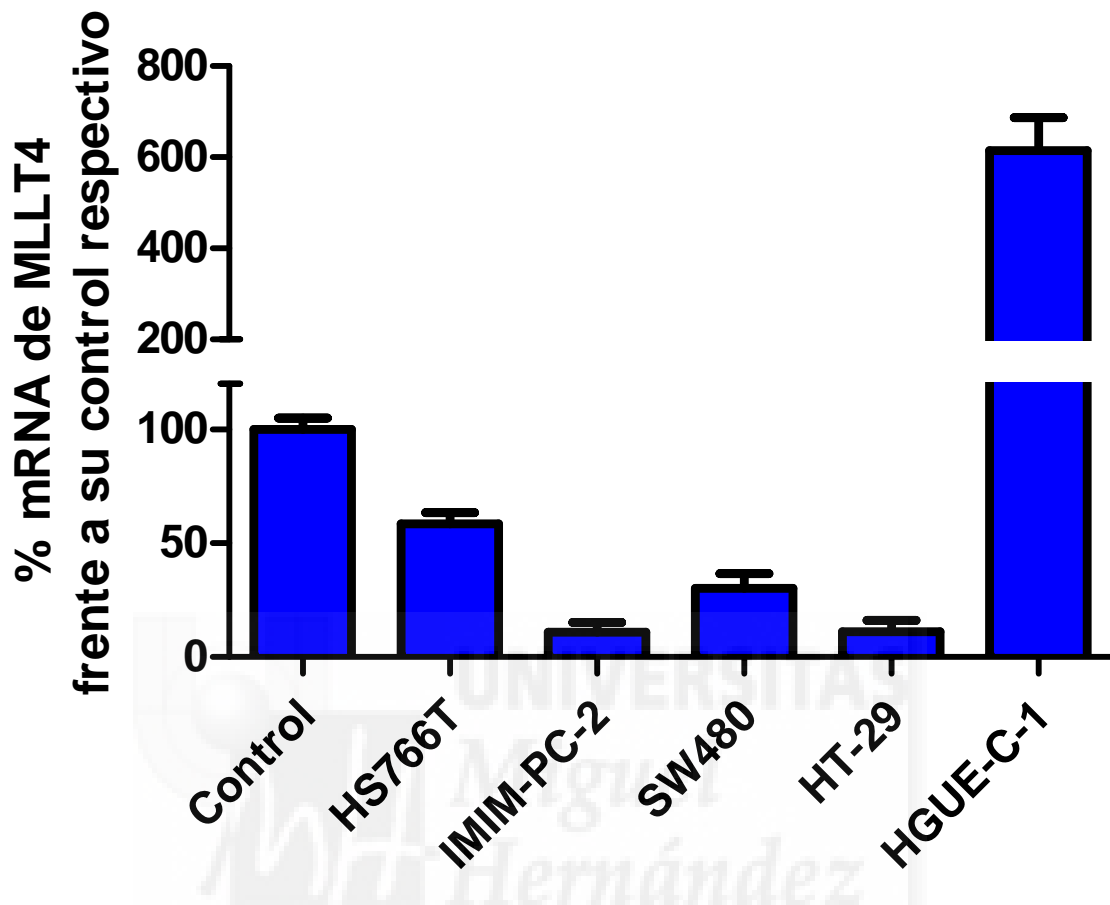


Figura 3. Efecto de TSA sobre la expresión MLLT4 en diferentes líneas celulares frente al control de cada una de ellas (%). Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$.

Los resultados observados en la figura 3 muestran una regulación significativa de los niveles de expresión de MLLT4 por TSA en las distintas líneas celulares analizadas. En la mayoría de los casos, se observa una disminución de la expresión, que en el caso de las líneas IMIM-PC-2 y HT-29, llega a ser de más del 90%. En la línea celular de carcinoma de colon HGUE-C-1, se observa un aumento del 600% en la expresión de MLLT4 tras el tratamiento con TSA.

Una vez demostrada la existencia de una regulación de la expresión de MLLT4 por TSA en distintos modelos celulares de cáncer, decidimos ampliar nuestros estudios analizando la expresión de dicho gen en dos cultivos primarios de glioblastoma multiforme obtenidos en el Hospital General Universitario de Elche para el efecto del TSA en la figura anterior y además incluimos dos cultivos primarios de glioblastoma multiforme obtenidos en el HGUE.

MLLT4 (sonda 86)

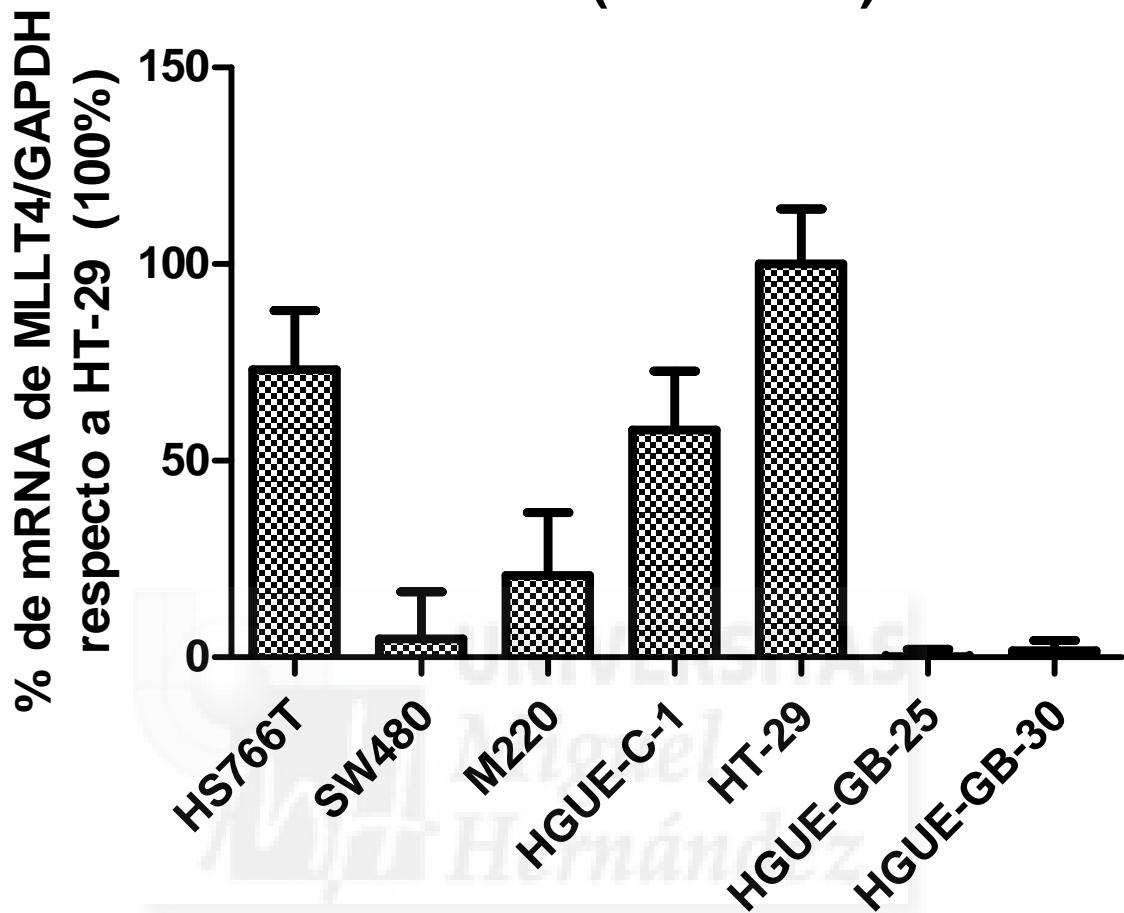


Figura 4. Expresión del gen MLLT4 (normalizado con los niveles de expresión constitutivo GAPDH) en diferentes líneas celulares tomando como referencia (100%) la expresión en HT-29 (que presenta la mayor expresión del gen). Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$.

Los resultados, en la figura 4, muestran que la línea celular HT-29 de adenocarcinoma de colon, presenta mayores niveles basales de MLLT4 que las otras líneas celulares analizadas. Es interesante resaltar que los dos cultivos primarios de glioblastoma multiforme analizados en este estudio, muestran niveles muy bajos de expresión de MLLT4. La casi ausencia de expresión de dicho gen, podría indicar un papel del mismo como gen supresor de tumores en glioblastoma multiforme, similar al descrito para MLLT4 en carcinoma de mama.

El Hospital General Universitario de Elche nos proporcionó ARNm obtenido a partir de un pool de cerebro normal de 5 personas que nos sirvió como control de expresión frente a la expresión en varios cultivos primarios de glioblastoma, tres de ellos (GB-16, GB- 17 Y GB-18) bien caracterizados en nuestro laboratorio

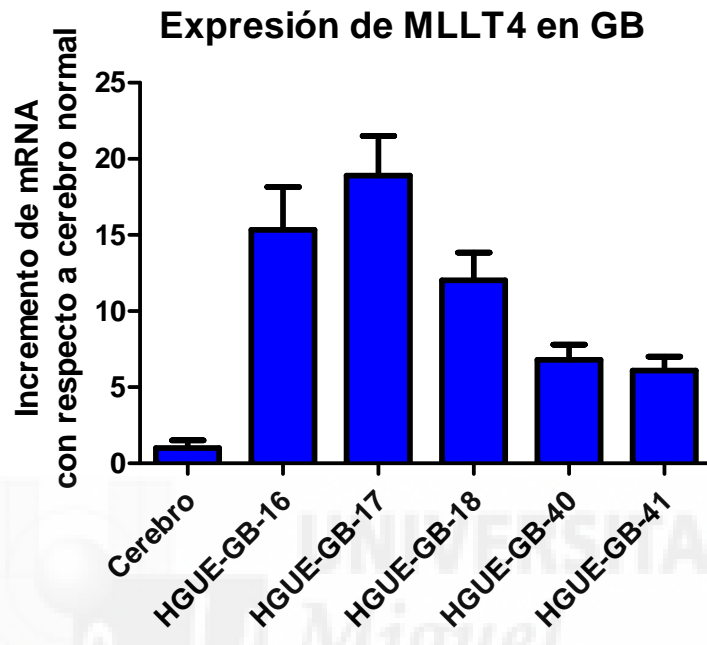


Figura 5. Expresión del gen MLLT4 en diferentes cultivos primarios de glioblastoma en comparación con la expresión en cerebro normal. La gráfica representa el incremento de ARNm de MLLT4 con respecto al control. Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$.

En la Figura 5 se observa un aumento significativo en la expresión del gen MLLT en glioblastoma, alcanzando hasta 20 veces la expresión de este gen en el GB 17 con respecto al control sano.

Expresión de INSC en GB

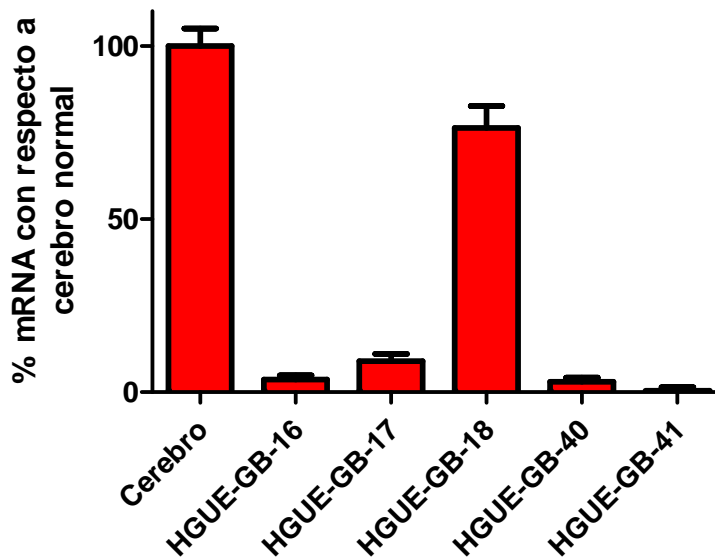


Figura 6. Expresión del gen INSC en diferentes cultivos primarios de glioblastoma en comparación con la expresión en cerebro normal. La gráfica representa el porcentaje de ARNm de INSC con respecto al control. Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$.

Con respecto a la expresión del gen INSC, los resultados en la figura 6, indican que dicha expresión se ve reducida en la totalidad de los cultivos primarios analizados. Cabe destacar que el cultivo primario HGUE-GB18 no muestra una disminución de la expresión de INSC tan significativa como el resto. Estos resultados podrían indicar un posible papel de INSC como supresor de tumores o como candidato a participar en fenómenos de resistencia

Expresión de GPSM2 en GB

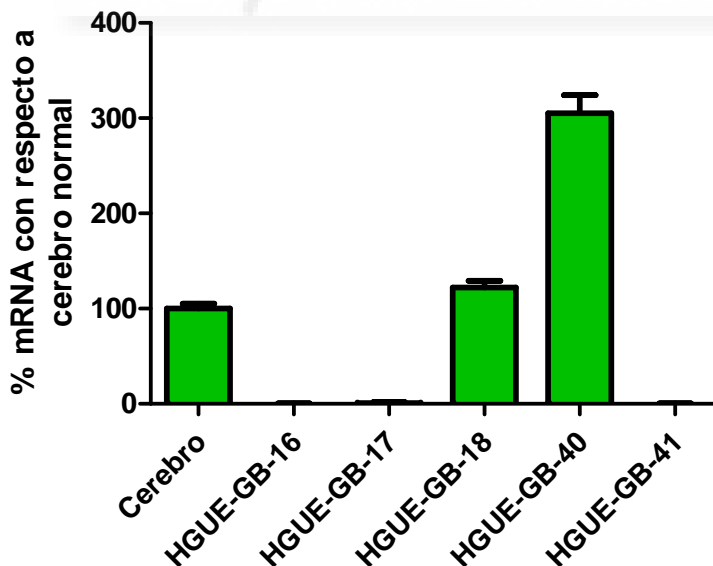


Figura 7. Expresión del gen GPSM2 en diferentes cultivos primarios de glioblastoma en comparación con la expresión en cerebro normal. La gráfica representa el porcentaje de ARNm de GPSM2 con respecto al control. Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$.

En la figura 7, podemos observar que la expresión de GPSM2 sigue un patrón totalmente variable. No detectamos expresión de este gen en los cultivos primarios 16, 17 y 41, aumentando con respecto al control en el cultivo primario 40 y no variando significativamente en el cultivo primario 18 con respecto al control.

En colaboración con el Dr. Víctor Barbera del Hospital General Universitario de Elche, que disponía de un array de expresión en el que se comparaba la expresión de 13.000 sondas en siete pacientes con glioblastoma multiforme con la expresión en cerebro normal, decidimos comprobar la expresión de 27 genes relacionados con la división asimétrica que nos había proporcionado la doctora Ana Carmen. Los resultados de expresión de estos genes en el array se muestran en la figura 8.

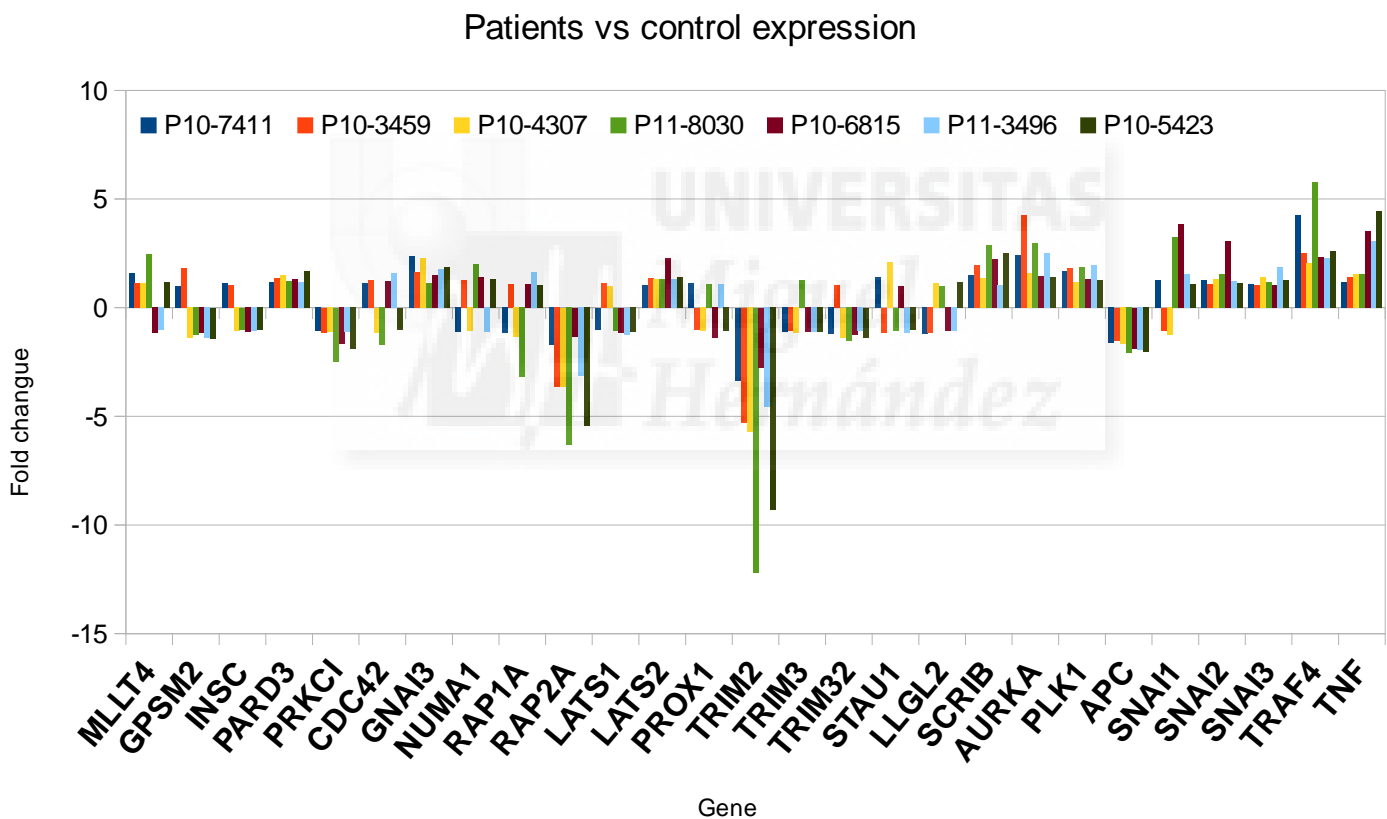


Figura 8. Expresión en los diferentes pacientes versus el control. Valores en tanto por 1 con respecto al valor de referencia.

Los valores que en la figura 8 se muestran por encima de 0, indican un aumento de la expresión del gen, mientras que los valores por debajo de 0, nos están indicando una disminución de la expresión. Los resultados obtenidos corroboran que los genes MLLT4, INSC y GPSM2 presentan en los pacientes un patrón de expresión variable con respecto al cerebro

normal. Se observa además, que los genes TRIM2 y RAP2A disminuyen su expresión en los siete pacientes analizados, lo que podría sugerir un papel importante de estos dos genes en el glioblastoma multiforme.

En el array de expresión también se disponía de información relativa a los cambios de expresión asociados al tratamiento con temozolamida (TMZ) en alguno de los pacientes incluidos en el estudio. En la figura 9 se muestran los cambios en la expresión de los genes seleccionados por la Dra. Ana Carmena en respuesta al tratamiento con TMZ.

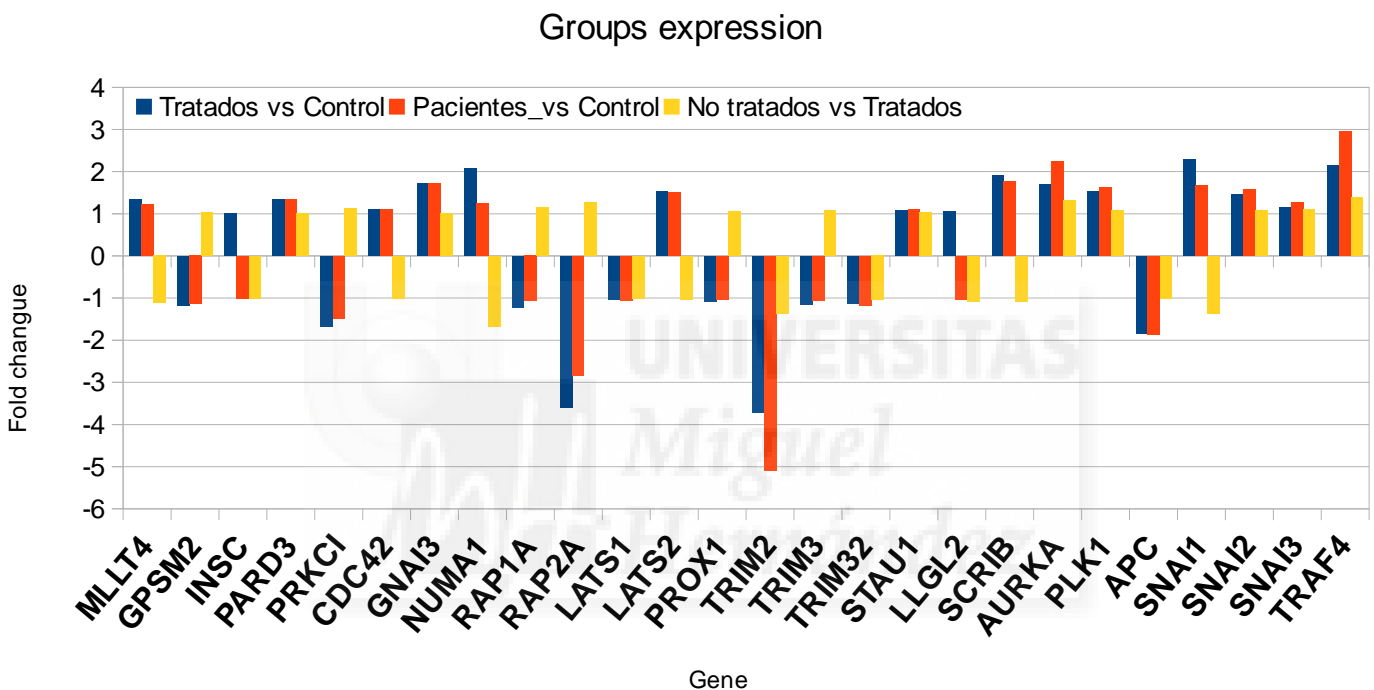


Figura 9. Patrón de expresión de la comparación de los pacientes no tratados (agrupados) frente al control, la comparación de los dos pacientes tratados frente al control y los valores de los pacientes no tratados frente a los tratados. Valores en tanto por 1 con respecto al valor de referencia.

En el array de la figura 9 están representadas las diferencias de expresión de cada gen en el conjunto de los pacientes tratados frente al control, de los no tratados frente al control y de los tratados vs no tratados.

Un resultado interesante es el hecho de que el gen MLLT4 aumenta su expresión tras el tratamiento con temozolamida. En el caso de RAP2A y TRIM2 también se observaban

cambios muy significativos con el tratamiento por lo que decidimos analizar su expresión más a fondo en diferentes cultivos primarios de glioblastoma mediante RT-PCR q a tiempo real

Analizamos la expresión de RAP2A y de TRIM2 en cinco cultivos primarios de glioblastoma multiforme comparándolos con los niveles de expresión obtenidos en cerebro normal (figura 10).

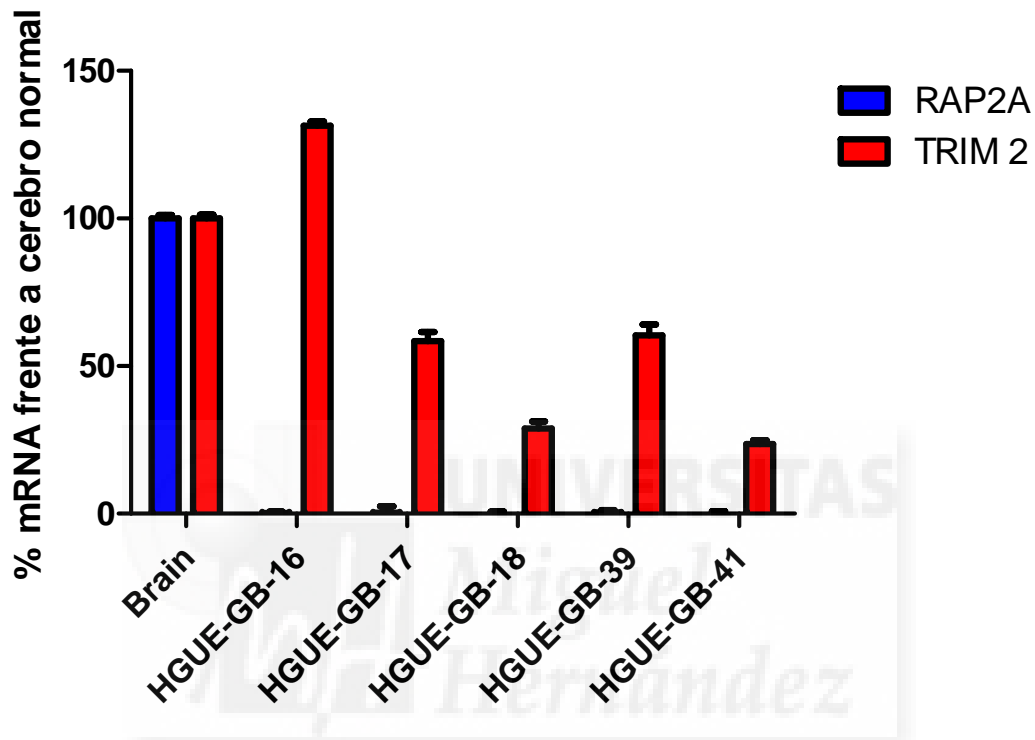


Figura 10. Expresión en % de cada gen frente al cerebro normal de diferentes cultivos primarios de glioblastoma. Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$

Se observa un ligero aumento de expresión del gen TRIM2 en el cultivo primario HGUE-GB16 con respecto a la expresión en cerebro normal, así como una disminución de la expresión de dicho gen en el resto de cultivos primarios.

Un resultado a priori potencialmente interesante, es que RAP2A se expresa en cerebro normal y sin embargo, no se observa expresión en ninguno de los cultivos primarios estudiados. Decidimos ampliar el estudio de la expresión de RAP2A a dos nuevos cultivos

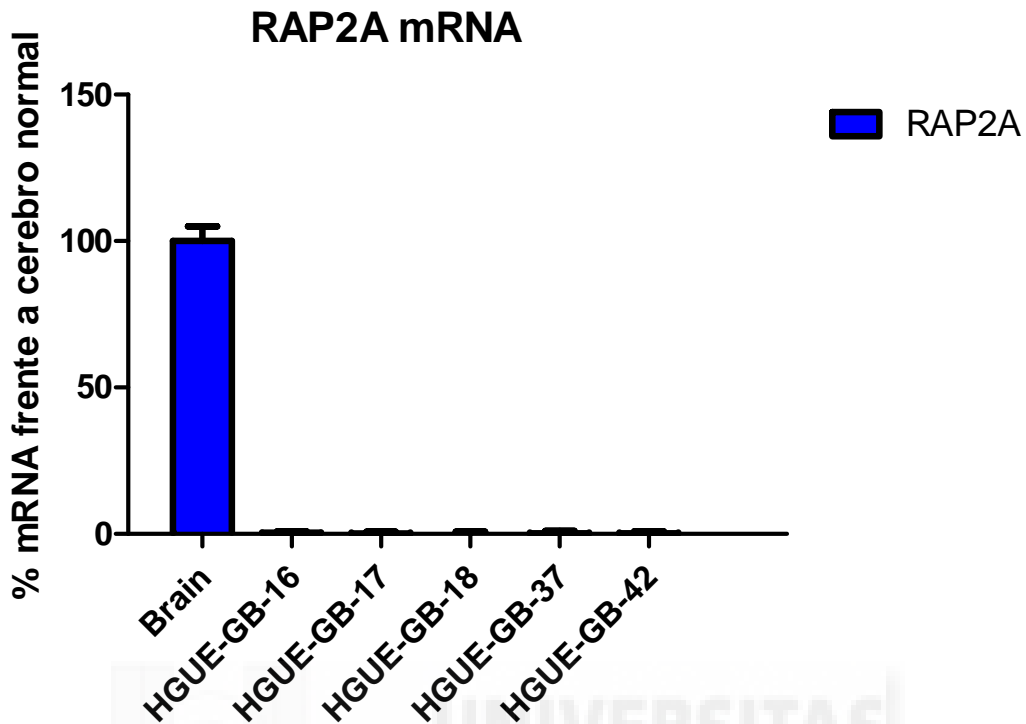


Figura 11. Expresión de RAP2A (%) en diferentes cultivos primarios de glioblastoma frente a la expresión en cerebro normal. Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$

Los resultados evidencian una casi completa falta de expresión de RAP2A en todos los cultivos primarios de glioblastoma multiforme analizados.

Dado que los resultados obtenidos en los estudios de array, indicaban que la expresión de los genes MLLT4, RAP2A y TRIM2 podía ser regulada por el tratamiento con TMZ, nos preguntamos si la radiación utilizada para tratar este tipo de tumores, podría modificar también la expresión de estos genes. En colaboración con el servicio de radioterapia-ERESA del Hospital General Universitario de Elche, decidimos abordar el estudio del efecto de la radiación en la expresión de los genes MLLT4, RAP2A y TRIM2. La línea celular U87 de glioblastoma multiforme humano se irradia con 15 grays (Gy) y aislamos el ARN a los 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas posteriores a la irradiación. Como control se utilizó ARN aislado de células U87 que no fueron irradiadas (figura 12)

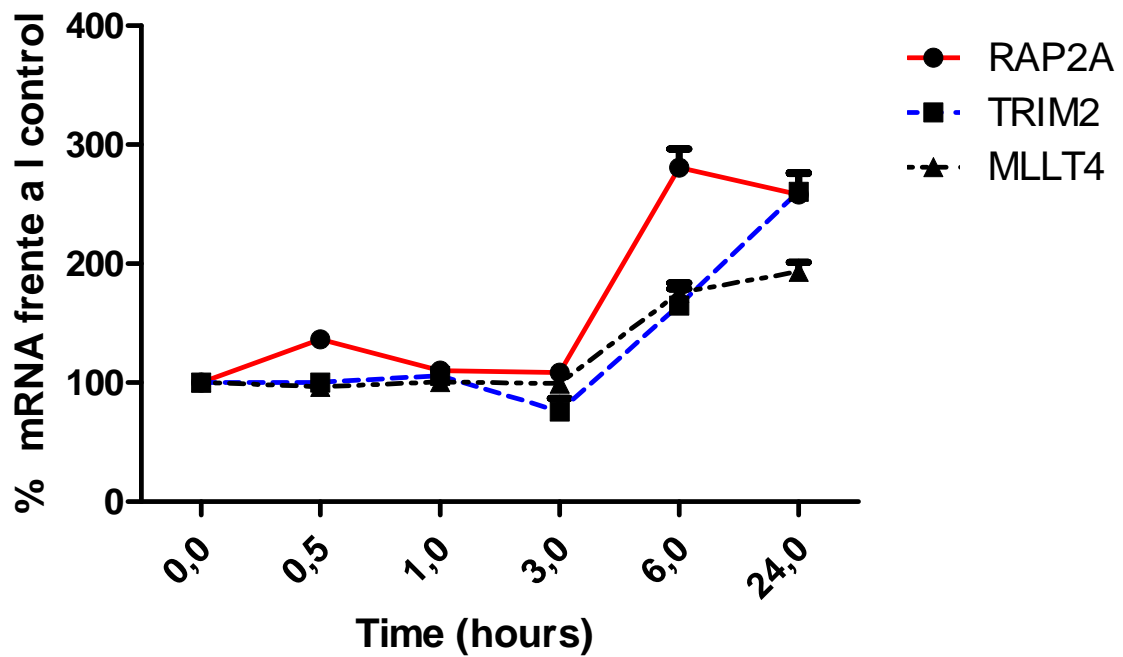


Figura 12. Niveles de expresión de los genes RAP2A, TRIM2 y MLLT4 a diferentes tiempos tras la exposición a radiación. Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$

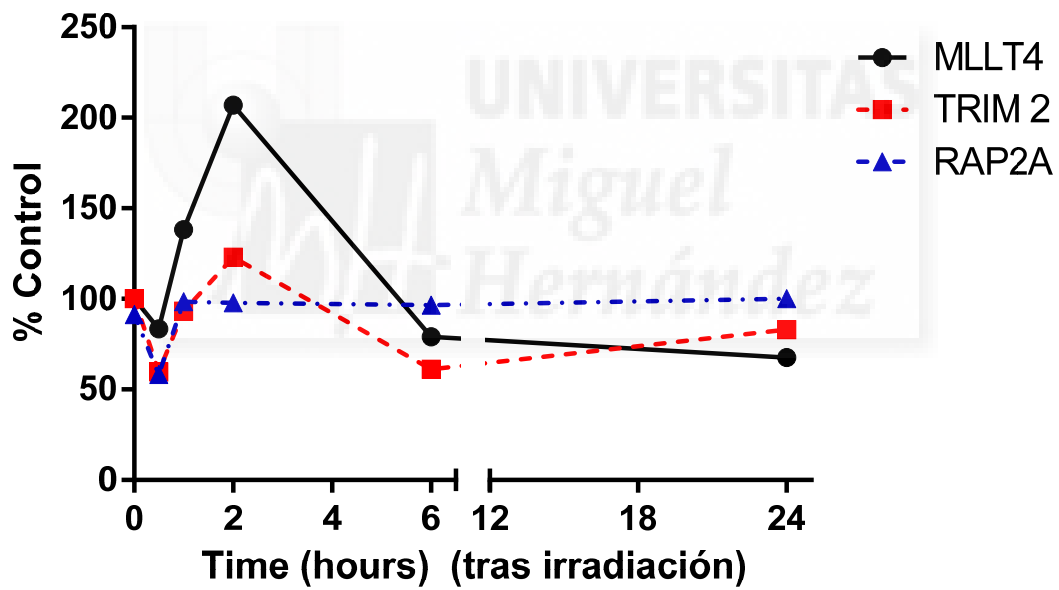
Los resultados muestran un aumento de la expresión de los tres genes tras la irradiación, observándose los mayores niveles de expresión entre las 6 y las 24 horas posteriores.

Con el fin de determinar si los resultados obtenidos en la línea celular U-87 representan un patrón general de expresión, realizamos el mismo experimento en tres cultivos primarios de glioblastoma previamente caracterizados en cuanto a su sensibilidad y/o resistencia a la irradiación y al tratamiento con TMZ (tabla 2).

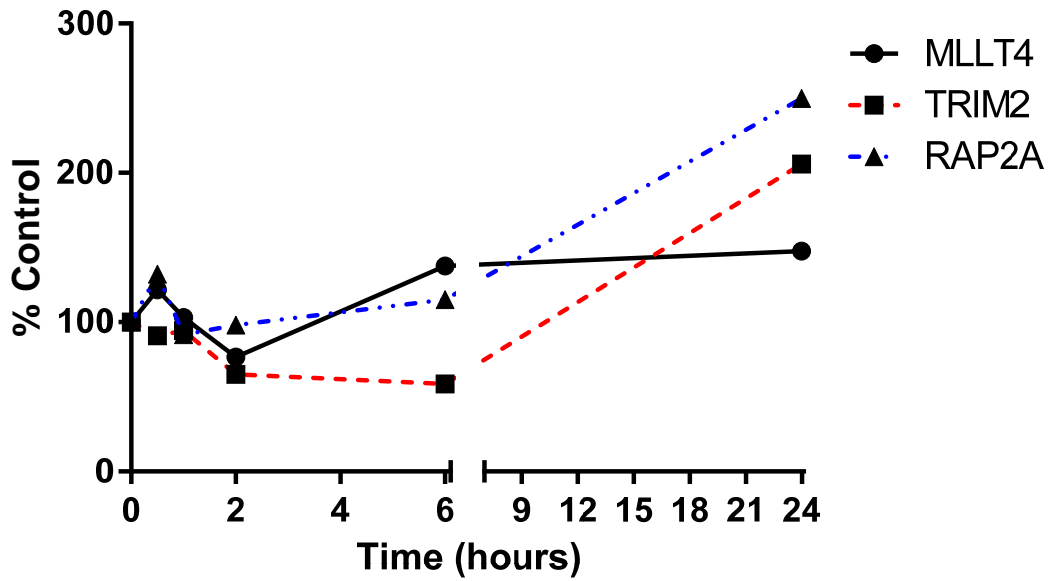
	Temozolamida	Radiación (7Gy)
U-87	Resistente	Respuesta parcial
HGUE-GB-16	Sensible	Sensible
HGUE-GB-17	Resistente	Resistente
HGUE-GB-18	Sensible	Sensible

Tabla 2. Sensibilidad o resistencia de la línea celular U87 y de los cultivos primarios HGUE-GB 16, 17 y 18 a la Temozolamida y a la Radiación.

HGUE-GB-16



HGUE-GB-17



HGUE-GB-18

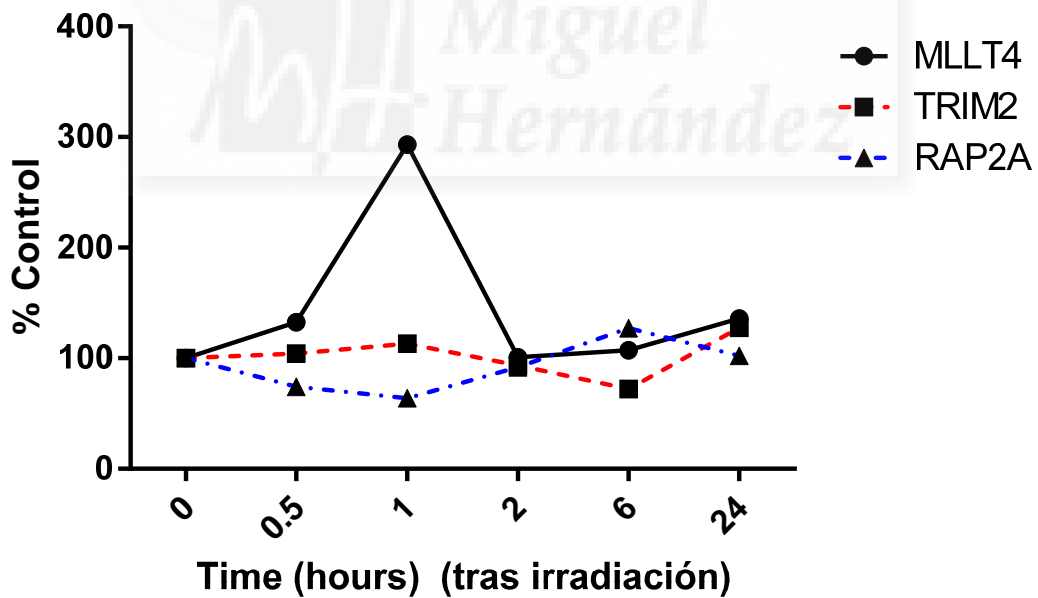


Figura 13. Niveles de expresión de los genes RAP2A, TRIM2 y MLLT4 en tres cultivos primarios de glioblastoma a diferentes tiempos tras la exposición a radiación. Los datos representan la media \pm sd con un $n \geq 3$.

Los resultados mostrados en la figura 13, indican que en el cultivo primario HGUE-GB17 observamos un aumento significativo de la expresión de los tres genes a tiempos largos tras la radiación, al igual que sucedía en la línea celular U-87. Por el contrario, en los cultivos primarios HGUE-GB16 y HGUE-GB18, se observa un aumento únicamente de MLLT4 a tiempos cortos tras la radiación, recuperando a tiempos más largos los niveles basales de expresión. En estos dos cultivos primarios no se observan diferencias en la expresión de los genes RAP2A y TRIM2 en respuesta a la radiación. Sería necesario aumentar el panel de cultivos primarios y de líneas celulares con el fin de poder concluir la existencia de dos patrones diferencial de respuesta a la radioterapia.

5. Discusión

Uno de los objetivos principales de este trabajo era servir de puente entre la investigación realizada por la Dra. Ana Carmena en *Drosophila Melanogaster* sobre la división asimétrica de células madre y la investigación sobre la posible implicación de los genes homólogos humanos en carcinogénesis. El objetivo inicial de mi trabajo fin de grado era determinar en líneas celulares de diferentes tipos de tumores, si había o no expresión de estos genes para en fases posteriores y se procediera en colaboración con el Biobanco de tumores del HGUE, a realizar estudios piloto sobre muestras en las que se pudiera comparar la expresión de dichos genes en el mismo paciente, comparando el tejido subyacente no tumoral con el tumor, tratando de identificar aquellos genes con características de gen supresor de tumores (expresado en tejido normal pero no expresado o muy poco expresado en el tejido tumoral) y/o con posibilidades de comportarse como oncogenes (normalmente expresados en tejido no tumoral pero sobreexpresados o hiperactivados en el tejido tumoral). Los genes así seleccionados serían estudiados en profundidad en su relación con la carcinogénesis de este tipo de tumores, la resistencia o sensibilidad a los tratamientos y su participación en procesos importantes tales como la invasividad y la capacidad metastásica.

El paso inicial de este trabajo fue realizar un primer cribado de los genes MLLT4, INSC y GPSM2 en los modelos celulares en los que se trabaja habitualmente en el laboratorio (carcinoma de páncreas, carcinoma de colon y glioblastoma multiforme). MLLT4 se expresa en los 3 tipos tumorales, INSC por el contrario no se expresa en carcinoma de páncreas. Los niveles de expresión de los genes y en particular de MLLT4 eran muy diferentes entre los distintos tipos celulares, así la expresión mayor se observó en líneas celulares de carcinoma de colon, en tanto que la expresión en glioblastomas multiformes era muy baja.

No se encuentra en la literatura que ningunos de estos genes (MLLT4, INSC, y GPSM2) esté regulado por el inhibidor de deacetilasas de histonas TSA, pero gracias al análisis del array del que disponíamos (tabla 2) pudimos observar algunas diferencias en cuanto a la expresión en los controles frente a los tratados con TSA. Pudimos observar incluso mayores diferencias cuando se comparaba la expresión entre los distintos tumores en presencia de TSA. Estos resultados implican que la expresión de estos genes está regulada a nivel epigenético, específicamente a nivel de la modificación postraduccional de las histonas.

Al analizar el porcentaje de expresión en diferentes líneas celulares tumorales tratadas con TSA frente al control (fig.3), se hace evidente que existe regulación por TSA, pero varía según cada línea celular. Es interesante resaltar en este punto que todas las líneas celulares utilizadas de páncreas y colon tienen mutaciones en KRAS excepto HT-29 y HGUE-C-1, pero HT-29 tiene mutación en BRAF (corriente abajo en la vía de las MAP quinatas) mientras que HGUE-C-1 presenta genotipo silvestre. La respuesta a TSA podría por tanto estar relacionada con la vía de las MAPK (Mitogen-activated protein kinase)^{19,22}.

El Hospital General Universitario de Elche nos proporcionó un *pool* de cerebro normal lo que nos permitió realizar experimentos en los que mediamos la expresión de distintos glioblastomas frente a la expresión en cerebro normal (fig.5). Observamos que la expresión de MLLT4 aumentaba en glioblastoma, resultado algo contradictorio ya que como se ha mencionado anteriormente, este gen parece estar implicado en diferentes tipos de cáncer puesto que está ausente en determinados tumores²². Podría suceder que el gen MLLT4 tenga características de gen supresor en diferentes tumores, y sin embargo en glioblastoma actuaría a la inversa, es decir, comportándose como oncogén. La utilización de un ARNi específico para MLLT4 en experimentos de transfección, nos permitirá evaluar si la eliminación de la expresión de este gen en cultivos primarios de glioblastoma tiene alguna incidencia sobre el comportamiento de las células transfectadas. Se ha visto que en cerebro sano, MLLT4 participa en la elongación de las dendritas, y que haya una mayor expresión en líneas cerebrales tumorales que en cerebro sano podría estar relacionado con la propagación del tumor²³.

La expresión de INSC se ve reducida en la totalidad de los glioblastomas, dando a entender que su papel podría ser de gen supresor. Cabe destacar que su expresión no se ve tan reducida en el glioblastoma HGUE-GB-18, esto podría ser debido a diferencias genéticas. Es importante señalar el papel del gen INSC en *Drosophila* donde se ha visto que los neuroblastos se dividen asimétricamente en otro neuroblasto por la parte apical y en una célula madre de los ganglios más pequeña por el lado basal. La polarización celular se regula precisamente por

dos complejos proteicos de señalización localizados en la parte apical y están regulados por INSC²⁴.

La expresión de GPSM2 varía entre los diferentes cultivos primarios de glioblastoma, lo que hace difícil identificar su función. En experimentos anteriores se ha observado que su función tiene que ver con la división celular en neuroblastos, y su expresión se ve reprimida al usar el fármaco citotóxico (XI-006), que es un agente anticancerígeno inhibidor de MDMX²⁵.

En cuanto a los estudios llevados a cabo por el Hospital General Universitario de Elche, observamos que hay un gran número de genes importantes en los que centrar futuros estudios; para la realización de este trabajo fueron seleccionados TRIM2 y RAP2A.

La expresión de TRIM2 disminuye en la mayoría de glioblastomas (fig. 10), a excepción de HGUE-GB-16 en la que se observa una mayor expresión. En experimentos anteriores se ha observado que dicho gen guarda relación con el grado de agresividad carcinomas foliculares²⁶. En modelos animales se ha visto que TRIM2 se expresa menos en carcinoma de células escamosas²⁷. Quedan pendientes por tanto estudios que definan su función en el proceso de oncogénesis.

Un resultado interesante es que RAP2A se expresa en cerebro normal y se podría decir que no hay expresión en ninguno de los glioblastomas estudiados lo que sugiere que RAP2A es potencialmente, a expensas de futuros estudios, un gen supresor de tumores en glioblastoma. Estos datos a primera vista pueden parecer contradictorios, ya que, según la literatura, RAP2A tenía carácter de oncogén en carcinoma nasofaríngeo así como en otros tipos tumorales regulando la invasividad y la migración celular^{28,29}. Sin embargo, datos en la literatura referentes al papel de este gen en glioblastoma, indican que en experimentos de “*knock out*” para RAP2A aumentaba la migración e invasividad celular^{30,31}.

Además de la regulación de MLLT4 y GPSM2 por TSA que habíamos encontrado, resultaban especialmente interesantes los resultados del array en glioblastoma que sugerían que la temozolamida podía regular la expresión de algunos de los genes en los que estábamos interesados. Dado que la radioterapia es utilizada habitualmente en los pacientes con glioblastoma, era importante saber si la expresión de algunos de estos genes se regulaba como consecuencia del tratamiento por radiación, por lo que realizamos experimentos de curso temporal de radiación, determinando la expresión de estos genes. En los primeros experimentos realizados en la línea celular U-87 de glioblastoma multiforme se observó que tanto RAP2A, TRIM2 y MLLT4 ven aumentada su expresión a las 6 horas, siendo un aumento

de hasta 3 veces en el caso del gen RAP2A. Por lo tanto se hace evidente que existe una regulación de estos genes tras irradiar las células con 15 grays.

En experimentos posteriores realizados en los cultivos primarios HGUE-GB-16, 17 y 18 se observó que en el cultivo primario HGUE-GB-17 los tres genes estudiados tenían un comportamiento equiparable al observado en las células U-87 tras la irradiación, sin embargo en los cultivos primarios HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18 la expresión de estos tres genes aparecía regulada de diferente forma tras la irradiación. Estos dos patrones de expresión observados tras la irradiación son especialmente interesantes cuando se analizan en relación a la sensibilidad y/o resistencia tanto a la TMZ como a la radiación de los mismos (tabla 2). El patrón de expresión presente en las células U-87 y en el cultivo HGUE-GB-17 parece asociarse a una mayor resistencia a los tratamientos en tanto que el patrón de expresión presente en los cultivos HGUE-GB-16 y HGUE-GB18 parece asociarse a una mayor sensibilidad a estos tratamientos. Todos estos resultados deben ser corroborados en un panel más amplio de cultivos primarios.

6. Conclusiones

1-Los genes MLLT4, INSC y GPSM2 son expresados en diferente grado en carcinomas de páncreas (excepto el INSC), de colon y en glioblastomas.

2- Se ha demostrado que fármacos epigenéticos como TSA son capaces de regular la expresión de MLLT4 y GPSM2 en las diferentes líneas celulares tumorales analizadas.

3- Se ha demostrado que la radioterapia es capaz de inducir cambios en la expresión de los genes MLLT4, RAP2A y TRIM2.

4- RAP2A ve disminuida su expresión en los glioblastomas con respecto al cerebro normal y, confirmando lo publicado en artículos anteriores, parece tener carácter de gen supresor en este tipo tumoral³⁰⁻³¹.

5- MLLT4 tiene carácter de gen supresor, sin embargo en glioblastoma aumenta su expresión con respecto al cerebro normal.

7. Proyecciones Futuras

Una vez determinado que existe expresión de los genes estudiados en carcinoma de páncreas (con la excepción de INSC), de colon y en glioblastoma el siguiente paso del grupo de investigación será realizar un estudio piloto en un número limitado de muestras de estos tipos de tumores procedentes del banco de tumores del Hospital General Universitario de Elche, comparando la expresión de cada uno de los genes en el tumor versus la expresión en el tejido no tumoral del mismo paciente. Los resultados de este estudio piloto revelarán hasta qué punto es general la pérdida de expresión en el tejido tumoral respecto del tejido normal en los genes que presuponemos genes supresores de tumores , y el aumento de expresión en el tejido tumoral en el caso de los genes que presuponemos oncogenes.

En base a los resultados obtenidos del estudio piloto se procederá en dos direcciones:

1. Aumentando el número de muestras del estudio piloto en los tipos de tumores más interesantes y centrándonos en los genes más relevantes. La idea es por un lado corroborar los datos de expresión del estudio piloto y por otro lado relacionar la expresión de estos genes con los datos clínicos y de respuesta a los tratamientos de los pacientes, con el objetivo de determinar si alguno de estos genes pudiera tener el potencial de convertirse en biomarcador de la enfermedad y/o de la respuesta a los diferentes tratamientos.

2. Determinando la importancia de los genes de interés en la oncogénesis y otros parámetros de los tumores. Para ello en el caso de los supuestos oncogenes procederemos al bloqueo de su expresión mediante la utilización de ARNi específicos en líneas celulares y/o cultivos primarios determinando el impacto que su inhibición tiene en la biología de las células tumorales. Por el contrario en el caso de los supuestos genes supresores, procederemos a su reexpresión mediante vectores de expresión bajo el control promotores heterólogos.

Los cambios en la expresión de algunos de estos genes en respuesta a diferentes tratamientos, tales como tratamientos epigenéticos con iHDACs, quimioterapia con TMZ y la radioterapia también serán estudiados con más profundidad.

8. Referencias:

- 1 Clevers, H. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat Genet* 37, 1027-1028.
- 2 Morrison, S. J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.
- 3 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- 4 Knoblich, J. A. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 849-860.
- 5 Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- 6 Barker, N. et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608-611.
- 7 Kwon, C. H. et al. Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer Res* 68, 3286-3294.
- 8 Magee, J. A., Piskounova, E. & Morrison, S. J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283-296.
- 9 Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717-728.
- 10 Bello, B., Reichert, H. & Hirth, F. The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*. *Development* 133, 2639-2648.
- 11 Betschinger, J., Mechtler, K. & Knoblich, J. A. Asymmetric segregation of the tumor suppressor *brat* regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 124, 1241-1253.
- 12 Caussinus, E. & Gonzalez, C. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 37, 1125-1129.

- 13 Lee, C. Y., Wilkinson, B. D., Siegrist, S. E., Wharton, R. P. & Doe, C. Q. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell* 10, 441- 449.
- 14 Miyamoto, H. et al. canoe encodes a novel protein containing a GLGF/DHR motif and functions with Notch and scabrous in common developmental pathways in *Drosophila*. *Genes Dev* 9, 612-625 (1995).
- 15 Kuriyama, M. et al. Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. *J Biol Chem* 271, 607- 610 (1996).
- 16 Prasad, R. et al. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res* 53, 5624-5628 (1993).
- 17 Letessier, A. et al. Correlated break at PARK2/FRA6E and loss of AF-6/Afadin protein expression are associated with poor outcome in breast cancer. *Oncogene* 26, 298-307
- 18 Fournier, G. et al. Loss of AF6/afadin, a marker of poor outcome in breast cancer, induces cell migration, invasiveness and tumor growth. *Oncogene* 30, 3862-3874
- 19 Sun T.T. et al. Disrupted interaction between CFTR and AF-6/afadin aggravates malignant phenotypes of colon cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1843(3):618-28 (2014).
- 20 Xu Y. et al. Loss of polarity protein AF6 promotes pancreatic cancer metastasis by inducing Snail expression. *Nat Commun*. 6:7184 (2015)
- 21 Carmena, A., Makarova, A. & Speicher, S. The Rap1-Rgl-Ral signaling network regulates neuroblast cortical polarity and spindle orientation. *J Cell Biol* 195, 553-562.
- 22 Kenji Mandai et al. Afadin/AF-6 and Canoe: Roles in Cell Adhesion and Beyond. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Volume 116, ISSN 1877-1173.
- 23 Xie Z. et al. Coordination of synaptic adhesion with dendritic spine remodeling by AF-6 and kalirin-7. *J Neurosci*. 28(24):6079-91 (2008).

- 24 Ana Carmena et al. The PDZ Protein Canoe Regulates the Asymmetric Division of *Drosophila* Neuroblasts and Muscle Progenitors. *Current Biology* 18, 831–837 (2008).
- 25 Pishas K. et al. XI-006 induces potent p53-independent apoptosis in Ewing sarcoma. *Sci Rep.* 5:11465 (2015).
- 26 Williams M.D et al. Differential gene expression profiling of aggressive and nonaggressive follicular carcinomas. *Hum Pathol.* 42(9):1213-20 (2011)
- 27 Yang K. et al. Screening and analysis of pathogenic genes during DMBA-induced buccal mucosa carcinogenesis in golden hamsters. *Oncol Rep.* 23(6):1619-24. (2010).
- 28 Lee Y.E. et al. The prognostic impact of RAP2A expression in patients with early and locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma in an endemic area. *Am J Transl Res.* 7(5):912-21 (2015).
- 29 Wu J. X. Rap2a is a novel target gene of p53 and regulates cancer cell migration and invasion. *Cell Signal.* 27(6):1198-207 (2015)
- 30 Choudhury Y. Attenuated adenosine-to-inosine editing of microRNA-376a* promotes invasiveness of glioblastoma cells. *J Clin Invest.* 122(11):4059-76 (2012).
- 31 Jamshidi et al. Illuminating radiogenomic characteristics of glioblastoma multiforme through integration of MR imaging, messenger RNA expression, and ADN copy number variation. *Radiology.* 270(1):1-2 (2014).