

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

Nuevos marcadores y dianas terapéuticas en cáncer colorrectal metastásico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Escudero Paniagua

Director

José Ignacio Casal Álvarez

**Madrid, 2018**

© Beatriz Escudero Paniagua, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**

**NUEVOS BIOMARCADORES Y DIANAS TERAPÉUTICAS EN  
CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**Beatriz Escudero Paniagua**

Director:

**José Ignacio Casal Álvarez**

Madrid, 2017



El Dr. José Ignacio Casal Álvarez, Investigador Científico del grupo de Proteómica Funcional del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB – CSIC) de Madrid.

#### CERTIFICA

Que el trabajo titulado: **“NUEVOS BIOMARCADORES Y DIANAS TERAPÉUTICAS EN CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO”**, que presenta Beatriz Escudero Paniagua para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo mi dirección en el grupo de Proteómica Funcional del CIB de Madrid y reúne la calidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid 5 de junio de 2017.

Dr. José Ignacio Casal Álvarez



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Economía con los proyectos BIO2015-66489-R y MINECO. RTC-2014-1518-1.

Beatriz Escudero Paniagua ha disfrutado de una beca FPI del Ministerio de Economía y Competitividad y una beca de la Sociedad Española de Proteómica (Seprot) para una estancia breve de 3 meses en la Universidad Libre de Ámsterdam (Países Bajos).



## **ABREVIATURAS**



ACN	Acetonitrilo
AP-MS/MS	Purificación por afinidad- espectrometría de masas tándem
ATT	Antígenos asociados a tumor
BioID	Biotinilación por proximidad
BirA*	Ligasa mutada de biotina
BSA	Albúmina sérica bovina
CAFs	Fibroblastos asociados a cáncer
CCR	Cáncer colorrectal
cDNA	DNA complementario
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CGH	Hibridación genómica comparada
CID	Disociación inducida por colisión
CIN	Inestabilidad cromosómica
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DEPC	Diethylpyrocarbonato
DMEM	Medio esencial Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMT	Transición epitelio-mesénquima
FBS	Suero fetal bovino
gRNA	guide RNA
IF	Inmunofluorescencia
Ig	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Inmunoprecipitación
iTRAQ	Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Cromatografía líquida - espectrometría de masas tándem

MCX	Mixed-Mode Cation-Exchange
MMR	Mismatch repair
mRNA	RNA mensajero
MTT	3-[4,5- dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida con Dodecil sulfato sódico
shRNA	Short harpin RNA
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
siRNA	RNA de interferencia
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SRM	Monitorización de antígenos seleccionados
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMT	Tandem mass tag
TNM	Tumor, Nódulos, Metástasis
WB	Western Blot
CNA	Copy number alteration
FSC	Forward Scatter
SSC	Side Scatter
MIF	Media de intensidad de fluorescencia

## ÍNDICE



ABREVIATURAS .....	7
ÍNDICE.....	11
RESUMEN .....	21
SUMMARY .....	27
INTRODUCCIÓN .....	33
1. El cáncer colorrectal .....	35
1.1.    Estadíos del CCR .....	35
1.1.1.    Metástasis del CCR .....	37
1.2.    Desarrollo y etiología del CCR.....	40
1.2.1.    CCR esporádico .....	40
1.3.    Mecanismos de inestabilidad genómica en CCR .....	42
1.3.1.    Inestabilidad de microsatélites.....	42
1.3.2.    Fenotipo hipermetilador de islas CpG .....	42
1.3.3.    Inestabilidad cromosómica.....	43
1.4.    APC y p53 en CCR esporádico .....	44
1.5.    Taxanos y otras drogas en CCR .....	47
1.6.    Biomarcadores en cáncer .....	48
1.6.1.    Biomarcadores en CCR .....	48
1.6.2.    Principales fuentes de biomarcadores en cáncer .....	50
1.6.3.    Técnicas “ómicas” para la detección de biomarcadores .....	51
1.7.    Proteómica cuantitativa .....	51
1.7.1.    Marcaje isobárico iTRAQ .....	53
1.7.2. <i>Label-free</i> .....	54
1.8.    Estudio del interactoma mediante espectrometría de masas.....	55
1.9.    Modelo celular KM12 para el estudio de la metástasis del CCR.....	56
2.    PAUF .....	57
2.1.    PAUF en cáncer.....	57
2.2.    Mecanismo molecular de la acción de PAUF.....	58
3.    LOXL1.....	58
OBJETIVOS .....	61
MATERIALES Y MÉTODOS .....	65
4.    Datos clínicos de los pacientes y de las muestras de tejidos normales, tumorales y metastásicos.....	67

5.	Líneas celulares.....	68
5.1.	Líneas celulares de CCR .....	69
5.2.	Líneas celulares de cáncer de páncreas.....	70
5.3.	Otras líneas celulares.....	70
6.	Extracción de proteínas .....	71
6.1.	Extracción de proteínas a partir de tejidos.....	71
6.1.1.	Obtención de extractos proteicos tisulares totales para el análisis de la expresión de PAUF.....	71
6.1.2.	Obtención de secretomas de tejidos normales y tumorales .....	71
6.2.	Extracción de proteínas a partir de líneas celulares .....	71
6.2.1.	Obtención de extractos proteicos celulares totales .....	71
6.2.2.	Fraccionamiento celular proteico.....	72
6.2.3.	Obtención de secretomas a partir de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4 .....	73
7.	Extracción de RNA de líneas celulares.....	73
8.	Síntesis de DNA complementario .....	73
9.	Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa .....	74
9.1.	PCR cuantitativa en tiempo real .....	74
9.2.	PCR genómica .....	75
9.2.1.	PCR genómica para la amplificación de los genes LOXL1 y GFP en las células HEK293 editadas con el sistema CRISPR/Cas9.....	75
10.	Clonaje de PAUF en el sistema Flp- In™ 293 T-REx™ .....	76
10.1.	PCR genómica para la generación de la secuencia attB1-PAUF-attB2 .....	76
10.2.	Clonación por recombinación mediante el sistema Gateway® .....	76
11.	Silenciamiento y sobre-expresión de los genes de interés en células de mamífero ..	78
11.1.	Transfección transitoria en células de mamífero .....	78
11.1.1.	Transfección transitoria con RNAs de interferencia .....	78
11.1.2.	Transfección transitoria con DNA plasmídicos .....	79
11.2.	Transfección estable en células de mamífero .....	79
11.2.1.	Transfección estable para la obtención de células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF.....	79
11.2.2.	Transfección estable para el silenciamiento de LOXL1 mediante el sistema CRISPR/Cas9 .....	80
11.2.3.	Transfección estable para la generación del sistema Flp- In™ 293 T-REx™ de inducción de la expresión de distintas construcciones de PAUF.....	81
11.3.	Inducción de la expresión de PAUF en células Flp- In™ 293 T-REx™ .....	83

12.	Biotinilación por proximidad acoplada a espectrometría de masas .....	84
13.	Purificación por afinidad acoplada a espectrometría de masas .....	85
13.1.	Purificación por afinidad de la proteína de fusión PAUF-FLAG acoplada a espectrometría de masas .....	85
13.2.	Purificación por afinidad de la proteína LOXL1 acoplada a espectrometría de masas .....	85
14.	Inmunodetección de proteínas .....	86
14.1.	Anticuerpos.....	86
14.1.1.	Anticuerpos primarios .....	86
14.1.2.	Anticuerpos secundarios .....	88
14.2.	<i>Western blot</i> .....	88
14.3.	Microscopia confocal.....	89
15.	Microscopía de campo claro.....	89
16.	Análisis del área y diámetro nuclear y celular, y contaje celular.....	89
17.	Ensayos funcionales <i>in vitro</i> en las líneas celulares.....	90
17.1.	Análisis del ciclo celular y de la expresión celular de GFP .....	90
17.2.	Adhesión celular .....	90
17.3.	Invasión celular .....	91
17.4.	Apoptosis celular .....	91
17.5.	Viabilidad celular .....	92
17.6.	Ensayos de citotoxicidad.....	92
17.6.1.	Ensayo de citotoxicidad del paclitaxel .....	92
17.6.2.	Ensayo de citotoxicidad del peróxido de hidrógeno.....	93
17.6.3.	Ensayo de citotoxicidad del bortezomib.....	93
18.	Ensayos funcionales <i>in vivo</i> en ratones desnudos.....	94
18.1.	Inyección intravenosa de células tumorales.....	94
18.2.	Xenotransplantes tumorales .....	94
19.	<i>Array</i> de hibridación genómica comparada .....	94
20.	Proteómica cuantitativa .....	95
20.1.	Obtención y marcaje isobárico por iTRAQ de los péptidos tripticos de las proteínas nucleares de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF ..	95
20.2.	Cuantificación por <i>label free</i> de las proteínas secretadas y de membrana de las células SW620, KM12SM y KM12L4 .....	97
20.3.	Cuantificación por <i>label free</i> de las proteínas del secretoma soluble de los tejidos de pacientes con CCR.....	98

20.4.	Análisis LC-MS/MS en el LTQ-Orbitrap Velos.....	100
20.5.	Análisis LC-MS/MS en el Q-Exactive .....	100
20.6.	Análisis de los datos obtenidos mediante <i>label-free</i> .....	101
20.6.1.	Análisis de los datos obtenidos mediante iTRAQ .....	102
20.6.2.	Análisis de los datos obtenidos en los experimentos de purificación de PAUF-FLAG y LOXL1 por afinidad y de BioID .....	102
21.	Herramientas bioinformáticas.....	103
22.	Análisis de supervivencia.....	104
23.	Análisis estadístico.....	105
<b>RESULTADOS .....</b>		<b>107</b>
24.	Nuevos biomarcadores de pronóstico o diagnóstico y nuevas dianas terapéuticas de la metástasis del CCR.....	109
24.1.	Proteómica cuantitativa <i>label free</i> de las fracciones de membrana y secretoma de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4 .....	109
24.1.1.	Comparación de la capacidad metastática de las células KM12SM y KM12L4 a pulmón de ratones atímicos desnudos .....	110
24.1.2.	Resultados del análisis mediante espectrometría de masas .....	111
24.1.2.1.	Análisis de la calidad de los triplicados.....	112
24.1.2.2.	Validación ortogonal mediante WB de los datos cuantitativos obtenidos... ..	116
24.1.2.3.	Análisis <i>in silico</i> de la localización celular de las proteínas identificadas .....	118
24.1.2.4.	Proteínas desreguladas en las líneas celulares KM12SM y KM12L4 altamente metastásicas en comparación con la línea celular poco metastásica SW620 .....	120
24.1.2.4.1.	Procesos biológicos alterados en la metástasis del CCR.....	121
24.1.3.5.	Determinación de potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas de la metástasis de CCR para distintas aplicaciones clínicas.....	123
24.1.3.5.1.	Validación de los candidatos seleccionados como biomarcadores de pronóstico del CCR, mediante la base de datos GSE17538 .....	124
24.2.	Proteómica cuantitativa <i>label free</i> de 42 muestras pareadas de secretoma soluble de tejido de colon humano normal y tumoral .....	127
24.2.1.	Flujo de trabajo.....	127
24.2.2.	Resultados del análisis mediante espectrometría de masas .....	128
24.2.3.	Proteínas desreguladas entre cada grupo de comparación .....	129
24.3.	Validación de los biomarcadores candidatos seleccionados en el experimento de proteómica cuantitativa <i>label free</i> de la fracción de secretoma de las células SW620, KM12SM y KM12L4 con los datos obtenidos en el experimento de proteómica cuantitativa <i>label free</i> del secretoma soluble de 42 muestras de tejidos normales y tumorales de CCR .....	130

25.	Análisis funcional de las proteínas LOXL1 y PAUF identificadas en los experimentos de proteómica cuantitativa <i>label free</i> .....	133
25.1.	LOXL1 .....	133
25.1.1.	Análisis <i>in silico</i> del estado de LOXL1 en diferentes tipos de cáncer .....	133
25.1.2.	Análisis de la expresión y secreción de LOXL1 en las células SW620, KM12SM y KM12L4 .....	136
25.1.3.	Localización celular de LOXL1 .....	137
25.1.4.	Estudio del papel de LOXL1 en la metástasis del CCR.....	138
25.1.4.1.	Generación de la línea celular HEK293 establemente silenciada en LOXL1 mediante el sistema CRISPR/Cas9 .....	138
25.1.4.2.	Silenciamiento transitorio de LOXL1 en la línea celular KM12L4 .....	140
25.1.4.3.	El silenciamiento de LOXL1 en las células HEK293 y KM12L4 disminuye la capacidad de adhesión en invasión celular, pero no altera la viabilidad celular.....	141
25.1.4.4.	Análisis del interactoma de LOXL1 mediante inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas .....	142
25.1.4.4.1.	Proteínas que forman parte del interactoma de LOXL1 .....	143
25.1.4.4.2.	Análisis <i>in silico</i> del proceso biológico en el que están implicadas las proteínas del interactoma de LOXL1 .....	144
25.2.	PAUF .....	146
25.2.1.	Estudio de la expresión de PAUF en CCR.....	146
25.2.1.1.	El nivel de expresión de PAUF es mayor en el extracto celular total y en el medio condicionado de las líneas celulares de CCR altamente metastásicas en comparación con las líneas parentales pobremente metastásicas .....	146
25.2.1.2.	La expresión de PAUF disminuye en el tejido tumoral primario para luego aumentar en la metástasis hepática del CCR .....	147
25.2.1.3.	Expresión del mRNA de PAUF en CCR.....	149
25.2.2.	Silenciamiento de PAUF en distintas líneas celulares de CCR .....	149
25.2.2.1.	Silenciamiento estable de PAUF en las líneas celulares SW620 y KM12L4 ..	150
25.2.3.	Silenciamiento transitorio de PAUF en las líneas celulares KM12SM, RKO y HCT116 mediante shRNAs.....	152
25.2.2.3.	Silenciamiento transitorio de PAUF en las líneas celulares HT29 y Colo320 mediante siRNAs.....	153
25.2.3.	El silenciamiento estable de PAUF provoca un descenso en la adhesión e invasión de las células SW620 y KM12L4 .....	154
25.2.4.	El silenciamiento estable de PAUF aumenta el tamaño y la complejidad de las células SW620 y KM12L4.....	155
25.2.5.	El silenciamiento estable de PAUF aumenta el tamaño nuclear de las células SW620 y KM12L4.....	157

25.2.6.	Análisis de la localización celular de PAUF .....	159
25.2.7.	Análisis del perfil de ciclo celular de las células de CCR silenciadas en PAUF...	163
25.2.7.1.	El silenciamiento estable de PAUF modifica el perfil de ciclo celular de las células SW620 y KM12L4.....	163
25.2.7.2.	Análisis del efecto del silenciamiento transitorio de PAUF sobre el perfil de ciclo celular de las líneas celulares KM12SM, RKO y HCT116.....	166
25.2.8.	Análisis del estatus de APC Y P53 en líneas celulares de CCR.....	167
25.2.9.	El silenciamiento de PAUF provoca arresto mitótico y errores en las mitosis de las células SW620 y KM12L4.....	168
25.2.10.	El silenciamiento de PAUF provoca un aumento de la apoptosis celular.....	170
25.2.11.	El silenciamiento de PAUF provoca una menor proliferación de las células SW620 y KM12L4 tanto en experimentos <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .....	171
25.2.12.	El silenciamiento estable de PAUF desencadena inestabilidad genómica en las células SW620 y KM12L4.....	173
25.2.13.	Análisis del interactoma de PAUF mediante las técnicas de biotilación por proximidad y purificación por afinidad, acopladas a espectrometría de masas .....	175
25.2.13.1.	Expresión de PAUF mediante tetraciclina o doxiciclina en Flp-In™ 293 T-REx™ .....	176
25.2.13.2.	Análisis de las proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF .....	179
25.2.13.3.	Análisis funcional de las proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF identificadas mediante el sistema BioID .....	180
25.2.13.4.	Análisis funcional de las proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF identificadas mediante el sistema de purificación por afinidad.....	182
25.2.13.5.	Estudio de las proteínas del interactoma de PAUF comúnmente identificadas por los métodos BioID y purificación por afinidad.....	184
25.2.14.	Análisis de la regulación de la expresión de algunas de las proteínas con las que interacciona PAUF .....	185
25.2.14.1.	Análisis mediante qPCR del interactoma de PAUF en las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF.....	186
25.2.15.	El silenciamiento de PAUF provoca una disminución de los niveles de expresión de APC y E-cadherina, así como un aumento en los niveles de expresión de $\beta$ -catenina en células de CCR control y silenciadas en PAUF.....	187
25.2.16.	Caracterización proteómica de la aneuploidía inducida por el silenciamiento de PAUF en las células SW620.....	190
25.2.16.1.	Marcaje isotópico de los extractos nucleares de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF para su caracterización proteómica .....	190
25.2.16.2.	Resultados de proteómica cuantitativa de la fracción nuclear de las células SW620 establemente silenciadas en PAUF y control .....	191

25.2.16.3.	Validación del método empleado.....	192
25.2.16.4.	Comparación de los datos obtenidos por aCGH y por iTRAQ en las células SW620 establemente silenciadas en PAUF y control .....	193
25.2.16.5.	Análisis funcional de los procesos biológicos alterados por el silenciamiento estable de PAUF.....	195
25.2.16.6.	Estudio de las proteínas desreguladas en las células silenciadas en PAUF implicadas en ciclo celular .....	197
25.2.16.7.	Análisis de las proteínas desreguladas en las células silenciadas en PAUF que forman parte del interactoma de PAUF .....	198
25.2.16.8.	Caracterización de las proteínas alteradas por el silenciamiento de PAUF, implicadas en la degradación proteica proteosomal mediante la ubiquitinación y en ciclo celular .....	199
25.2.16.9.	Análisis del efecto del silenciamiento de AURKA, UBA52 y UBE2L3 sobre la apoptosis de las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF y control	202
25.2.17.	Análisis del efecto del silenciamiento de PAUF sobre el tratamiento celular con diferentes drogas.....	203
25.2.17.1.	Estudio del efecto del tratamiento de células de CCR control y silenciadas en PAUF con paclitaxel .....	204
25.2.17.2.	Estudio del efecto del tratamiento de células de CCR control y silenciadas en PAUF con bortezomib.....	207
25.2.17.3.	Estudio del efecto del tratamiento de células de CCR control y silenciadas en PAUF con peróxido de hidrógeno.....	208
<b>DISCUSIÓN</b>	.....	<b>211</b>
26.	Nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas del CCR.....	213
27.	Papel de LOXL1 y PAUF en CCR.....	221
27.1.	LOXL1 .....	221
27.2.	PAUF .....	224
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	<b>237</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	<b>243</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>267</b>



## **RESUMEN**



## Introducción:

El cáncer colorrectal (CCR) es el cuarto cáncer más mortal a nivel mundial, debido al desarrollo metastásico de la enfermedad. Por esta razón, parte de los esfuerzos se focalizan en la predicción y el tratamiento de la metástasis de CCR.

Las células tumorales metastásicas sufren una serie de alteraciones, por ejemplo en su capacidad de adhesión e invasión, que les permiten colonizar, sobrevivir y proliferar en órganos distales. Actualmente, no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares ni las proteínas responsables de la colonización hepática y pulmonar de las células tumorales de colon. Recientemente, nuestro laboratorio identificó a CDH17 e IL13R $\alpha$ 2, y los mecanismos moleculares a través de los cuales son necesarias para la colonización hepática de las células de CCR.

Para la búsqueda de biomarcadores asociados a enfermedades como el cáncer, se utilizan técnicas “ómicas”, que permiten identificar, cuantificar y caracterizar miles de genes o proteínas en muestras biológicas complejas. Nuestro laboratorio ha utilizado estas técnicas, como *microarrays* de proteínas o proteómica cuantitativa, identificando un total de 43 antígenos asociados a tumor, entre los que se encontraban FGFR4 y PIM1, que podrían funcionar como biomarcadores del CCR. Estos avances son de gran importancia, ya que pocas proteínas se han descrito como biomarcadores de CCR.

## Objetivos:

En este contexto, el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral ha pretendido avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la metástasis de CCR, con el fin último de encontrar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas de la metástasis de esta enfermedad.

## Resultados y discusión:

Mediante la utilización de herramientas de proteómica cuantitativa, hemos caracterizado los mecanismos alterados en la metástasis de CCR, observando que las alteraciones en las células metastásicas respecto de las células tumorales son más amplias de lo descrito hasta ahora, y abarcan procesos como metabolismo de lípidos y glicoproteínas, localización proteica sub-celular y organización mitocondrial, entre otros. Por otro lado, hemos identificado una serie de potenciales biomarcadores de la metástasis de CCR, cuya sobre-expresión se relaciona con peor supervivencia a la enfermedad, destacando PLOD1, una proteína nunca antes relacionada con cáncer, y QSOX1, cuya implicación en la metástasis del cáncer se ha empezado a estudiar.

Dentro de las proteínas identificadas como proteínas desreguladas en la metástasis de CCR se encontraban LOXL1 y PAUF.

LOXL1 es una proteína de matriz extracelular, necesaria para la colonización pulmonar de células de cáncer de mama. En este trabajo observamos que LOXL1 se sobre-expresa en el secretoma de las células altamente metastásicas de CCR KM12L4, que particularmente, metastatizan a pulmón. Observamos que LOXL1 está involucrada en los procesos pro-metastásicos de adhesión e invasión celular, y encontramos, gracias al estudio de su interactoma, que puede participar, al menos en CCR, en otros procesos biológicos como la vía de señalización canónica de Wnt o la regulación del transporte intra- y extra-celular. En definitiva, iniciamos el estudio de la relación existente entre LOXL1 y CCR observando que LOXL1, al igual que sucede en cáncer de mama, participa en adhesión e invasión celular, pudiendo ser determinante para la colonización pulmonar de las células KM12L4.

Por otro lado, caracterizamos por primera vez el papel en CCR de PAUF, una proteína poco conocida, regulada al alza en cáncer de páncreas, donde participa en procesos de adhesión, migración e invasión celular. Identificamos a PAUF como una proteína cuya expresión disminuye en el tumor primario de colon para posteriormente aumentar en la metástasis hepática de CCR, y corroboramos su efecto sobre adhesión e invasión celular. Observamos que PAUF se localiza en el núcleo y citosol, distribuyéndose de manera muy similar a APC. Además, su silenciamiento provoca aumento del tamaño nuclear, desplazamiento del perfil de ciclo celular, errores en las mitosis, disminución de la proliferación celular, así como gran inestabilidad cromosómica, sugiriendo su participación en el *checkpoint* mitótico. El análisis de su interactoma corroboró esta función, identificándose numerosas proteínas pertenecientes al *checkpoint* mitótico, entre las que se encontraba APC. La expresión de APC disminuye después del silenciamiento de PAUF, y se acompaña de una disminución de la expresión de E-cadherina, y un aumento de  $\beta$ -catenina nuclear, sugiriendo que la pérdida de PAUF podría promover la transición epitelio-mesénquima y la progresión tumoral de CCR. Por último, observamos que el silenciamiento de PAUF sensibiliza a células de CCR deficientes en APC al tratamiento con determinados tipos de drogas, como por ejemplo, el taxol.

En definitiva, caracterizamos a PAUF como una proteína del *checkpoint* mitótico, importante para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica en CCR, y cuyo silenciamiento, combinado con el uso de diferentes drogas, podría ser una buena estrategia a seguir para el tratamiento de pacientes con CCR.

## Conclusiones:

En esta Tesis Doctoral hemos ampliado el conocimiento de los mecanismos alterados en la metástasis de CCR, identificando, además, una serie de proteínas como potenciales biomarcadores de la enfermedad. Además, hemos caracterizado por primera vez el papel de LOXL1 y PAUF en CCR.

## **SUMMARY**



## Introduction:

Colorectal cancer (CRC) is the fourth most worldwide deadly cancer due to the metastatic development of the disease. For this reason, efforts are focused on the prediction and treatment of CRC metastases.

Metastatic tumor cells undergo a series of alterations, for example in their capacity of adhesion and invasion, which allow them to colonize, survive and proliferate in distal organs. At present, molecular mechanisms and proteins responsible for hepatic and pulmonary colonization of colon tumor cells are not known. Recently, our laboratory has identified CDH17 and IL13R $\alpha$ 2, and the molecular mechanisms through which they function, for hepatic colonization of CCR cells.

To search for biomarkers associated with diseases such as cancer, "omic" techniques are used to identify, quantify and characterize thousands of genes and/or proteins in complex biological samples. Our laboratory has used these techniques, such as protein microarrays or quantitative proteomics, identifying a total of 43 tumor associated antigens, including FGFR4 and PIM1, which could function as CRC biomarkers. These advances are of great importance, since few proteins have been described as CRC biomarkers.

## Goals:

In this context, the work developed in this Doctoral Thesis has attempted to advance in the knowledge of the mechanisms involved in CRC metastasis, with the final aim of finding new metastasis biomarkers and therapeutic targets for this disease.

## Results and Discussion:

Using quantitative proteomics tools, we have characterized the altered mechanisms in CRC metastasis, discovering that the alterations in metastatic cells with respect to tumor cells are broader than previously described, and encompass processes such as lipid and glycoproteins metabolism, sub-cellular protein localization and mitochondrial organization, among others. On the other hand, we have identified a number of potential metastatic CRC biomarkers, whose overexpression is associated with poorer survival, including PLOD1, a protein never before related to cancer, and QSOX1, whose involvement in metastasis of cancer has begun to be studied.

Within the proteins identified as deregulated proteins in CRC metastasis were LOXL1 and PAUF.

LOXL1 is an extracellular matrix protein, necessary for lung colonization of breast cancer cells. In this work we observe that LOXL1 is overexpressed in the secretoma of highly metastatic CCR cells KM12L4, which in particular, metastasize to the lung. We have observed that LOXL1 is involved in the pro-metastatic processes of cell adhesion and invasion, and found, thanks to the study of its interactome, that it can participate, at least in CRC, in other biological processes such as the Wnt canonical signaling pathway and regulation of intra- and extra-cellular transport. In conclusion, we started the study of the relationship between LOXL1 and CRC, discovering that LOXL1, like in breast cancer, participates in cell adhesion and invasion, and may be a determinant for lung colonization of KM12L4 cells.

On the other hand, we have analyzed for the first time the role in CRC of PAUF, a poorly known protein, upregulated in pancreatic cancer, where it participates in processes of cell adhesion, migration and invasion. We identified PAUF as a protein

whose expression decreases in the primary colon tumor to subsequently increase in liver metastasis of CRC, and corroborated its effect on cell adhesion and invasion. We observed that PAUF is located in the nucleus and cytosol, distributed in a very similar way to APC. In addition, its silencing causes increase in nuclear size, displacement of the cell cycle profile, errors in mitosis, decreased cell proliferation, as well as great chromosomal instability, suggesting its participation in the mitotic checkpoint. The analysis of its interactome corroborated this function, identifying numerous proteins belonging to the mitotic checkpoint, among which was APC. APC expression decreases after silencing of PAUF, and is accompanied by a decrease in E-cadherin expression, and an increase in nuclear  $\beta$ -catenin, suggesting that loss of PAUF could promote the epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. Finally, we have observed that the silencing of PAUF sensitizes APC-deficient CRC cells to treatment with certain types of drugs, such as taxol.

In short, we characterized PAUF as a mitotic checkpoint protein, important for the maintenance of chromosomal stability in CRC, and whose silencing, combined with the use of different drugs, could be a good strategy to follow for the treatment of patients with CRC.

Conclusions:

In this Doctoral Thesis we have expanded the knowledge of the altered mechanisms in the CRC metastasis, as well as identifying a series of proteins as potential biomarkers of this disease. In addition, we have analysed for the first time the role of LOXL1 and PAUF in CRC.



## **INTRODUCCIÓN**

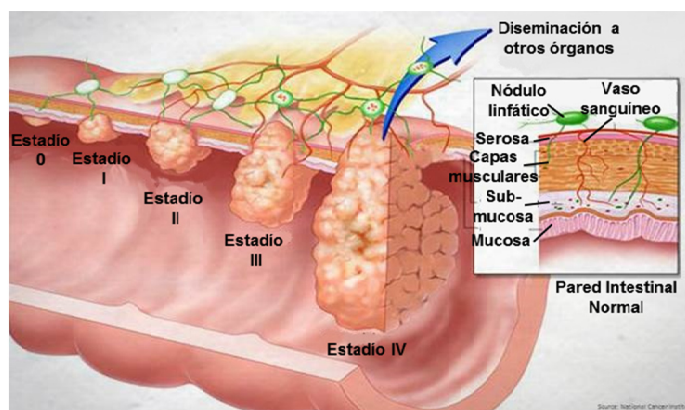


### 1. El cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más frecuente y el cuarto cáncer que más muertes produce (600.000 muertes al año) a nivel mundial (1). En España, según los datos recogidos en la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN, 2014), el CCR es el cáncer más frecuente (32.240 nuevos casos en 2012) y el segundo cáncer más mortal (14.700 muertes en 2012) después del cáncer de pulmón. En países de Europa occidental, Oceanía y Norte América tiene una incidencia anual de aproximadamente 1.2 millones de personas. Por el contrario, en países de África y Asia este tipo de cáncer tiene una incidencia menor, aunque la occidentalización de su estilo de vida y de su dieta está produciendo un aumento significativo de nuevos casos (1). El pronóstico de los pacientes con CCR varía enormemente dependiendo del estadio de la enfermedad.

#### 1.1. Estadios del CCR

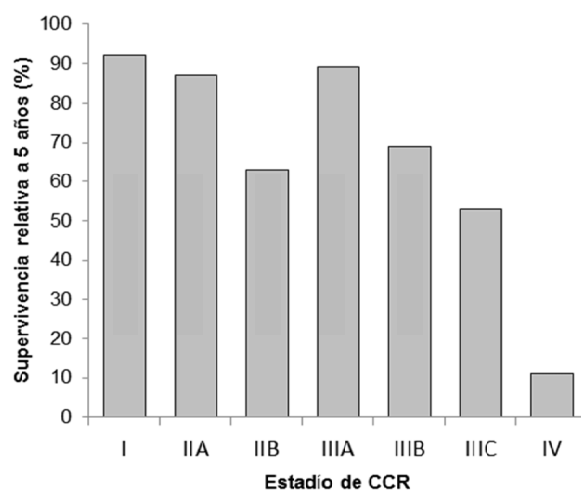
El estadiaje o clasificación del CCR permite cuantificar la extensión de la enfermedad y aporta la información necesaria para iniciar el tratamiento apropiado. Existen diferentes sistemas de clasificación del CCR. El más aceptado a nivel internacional es aquel en el que los tumores se clasifican en función de la profundidad de la invasión de la pared intestinal, de la presencia o ausencia de nódulos linfáticos afectados y de la presencia o ausencia de metástasis distal (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la progresión tumoral del CCR y su correspondiente estadiaje TNM (Adaptado del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos).

Este sistema de clasificación se conoce como TNM (tumor nódulo metástasis) y fue introducido por el Comité de Legislación Americano en Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC).

La pared intestinal está formada, desde el lumen hacia el exterior, por una capa mucosa, una capa submucosa, una serie de capas de tejido muscular y por último una capa serosa. Teniendo en cuenta lo anterior, el estadio I de CCR hace referencia a aquellos tumores localizados en la mucosa o submucosa colorrectal. En el estadio II, el tumor penetra la capa muscular. En el estadio III el tumor atraviesa toda la pared intestinal y se produce infiltración tumoral en los nódulos linfáticos. Por último, el estadio IV hace referencia a la presencia de metástasis distales. Por otro lado, clasificar de esta manera el CCR ayuda a establecer mejor el pronóstico de los pacientes.



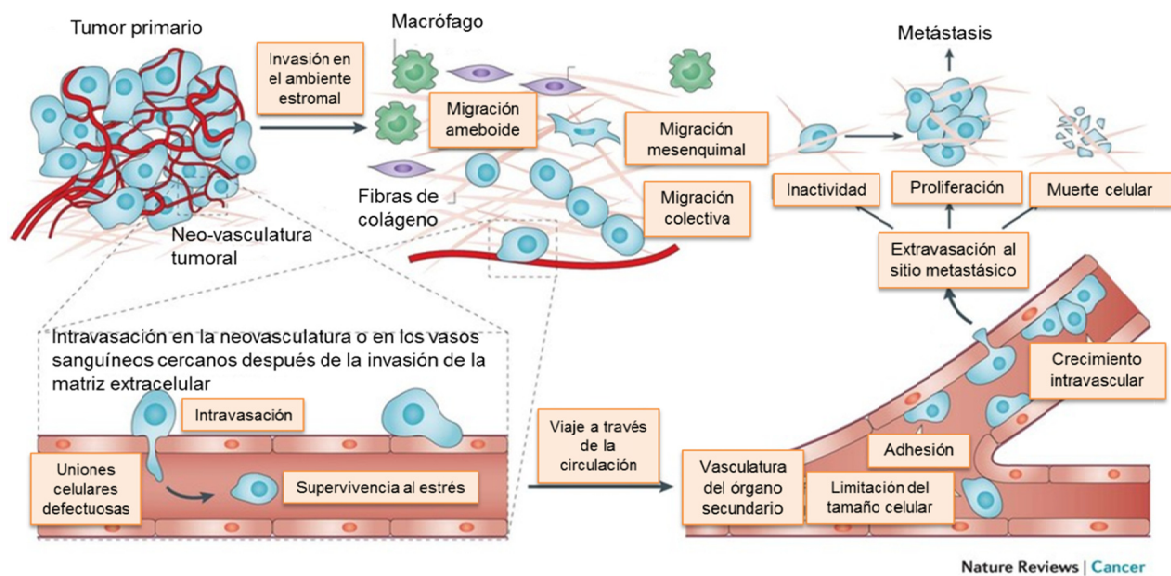
**Figura 2. Porcentajes de la tasa de supervivencia relativa a 5 años en pacientes con diferentes estadios de CCR (American Cancer Society).**

La tasa de supervivencia relativa a 5 años de los pacientes con CCR varía enormemente (Figura 2), desde un 90% en pacientes con CCR en estadio I a únicamente un 10% en pacientes con metástasis de CCR (2, 3). De hecho, la principal causa de muerte en pacientes con CCR es el desarrollo de metástasis del tumor primario a otros

órganos, principalmente a hígado y a pulmón, donde la cirugía no es suficiente y el tratamiento se basa en la quimioterapia. Por todo ello, actualmente las investigaciones en CCR se centran en identificar nuevos biomarcadores de detección precoz de la enfermedad, así como biomarcadores de diagnóstico y de pronóstico asociados a cada estadio, y biomarcadores que informen sobre la respuesta al tratamiento y la recurrencia de la enfermedad. Para abordar este objetivo es necesario profundizar en el conocimiento de los factores y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del tumor primario, en el microambiente tumoral y en el proceso metastásico.

### 1.1.1. Metástasis del CCR

La metástasis de las células cancerosas es un proceso complejo que consta de múltiples etapas (4), como la adhesión, invasión o migración celular (Figura 3), en las que participan tanto las células cancerosas, como el estroma tumoral (5, 6).



**Figura 3. Esquema de las múltiples etapas de la formación de metástasis. Adaptado de Nicolas Reymond *et al.*, (7).** Las etapas que componen lo que se conoce como cascada metastásica, abarcan: la transición epitelio-mesénquima, la proteólisis de la membrana basal y de la matriz extracelular, la disociación de las células tumorales por la alteración de las propiedades adhesivas, la supresión de la anoikis (apoptosis con pérdida inapropiada de adhesión celular), la alteración de la invasión y la migración celular, la angiogénesis e intravasación, la diseminación a través del torrente sanguíneo o sistema linfático, la extravasación, la colonización a órganos específicos y por último la capacidad de proliferación para la formación de metástasis en los órganos distales

En CCR, donde la metástasis ocurre preferentemente en hígado y en segundo lugar en pulmón (8, 9), no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que controlan cada una de las etapas necesarias para la colonización metastásica (10). A pesar de ello, se han realizado algunos avances en el conocimiento de las proteínas implicadas en este proceso. Por ejemplo, parece que la metaloproteinasa MMP-7, así como ciertos componentes del estroma tumoral, son claves en la degradación proteolítica de la matriz extracelular en CCR (11-13), que integrinas y cadherinas intervienen en los procesos de adhesión celular o que moléculas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (14, 15) y los receptores de citoquinas CXCR4 (16) y IL13R $\alpha$ 2 (17, 18), son necesarios para la angiogénesis, y la supervivencia y colonización celular en la metástasis hepática distal, respectivamente.

Dentro de las cadherinas implicadas en el desarrollo metastásico del CCR está CDH17, un miembro distintivo de la superfamilia cadherina conocida como la cadherina de hígado e intestino (19). Nuestro laboratorio identificó a CDH17 como una proteína sobre-expresada en las células de CCR KM12SM altamente metastásicas en comparación con la línea parental KM12C pobremente metastásica (20), y cuya alta expresión se asocia con la metástasis hepática del CCR (21). CDH17 participa en adhesión y proliferación celular, así como en la metástasis hepática del CCR a través de la modulación de la vía de señalización activada por integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (19), proteína con la que interacciona a través de un motivo RGD (22). Este motivo RGD parece ser clave para el desarrollo metastático, no solo del CCR, sino también de otros cánceres como mama y melanoma. En estos cánceres, el motivo RGD de VE-cadherina es responsable del papel de esta cadherina en proliferación, adhesión e invasión celular, de nuevo por su interacción y consiguiente activación de integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (23). Además, el motivo RGD de VE-cadherina es necesario para la colonización pulmonar de las células de

mama y melanoma (23). En resumen, el motivo RGD parece ser clave para la colonización hepática, y posiblemente pulmonar, del CCR. Otra de las proteínas identificada por nuestro laboratorio como clave para la metástasis del CCR fue IL13R $\alpha$ 2 (17). IL13R $\alpha$ 2 es un receptor de alta afinidad de IL13, sobre-expresado en varios tipos de cáncer humano, en alguno de los cuales actúa como factor de mal pronóstico (24-26). Nuestro laboratorio estudió el mecanismo de acción de IL13R $\alpha$ 2 en CCR, caracterizando que la activación de IL13R $\alpha$ 2 y su papel en migración, invasión y supervivencia celular era dependiente de su interacción con FAM120A, y que ambas proteínas eran necesarias para la colonización hepática de células de CCR (18).

El estroma tumoral participa en todas las etapas de la progresión del cáncer y la metástasis, existiendo una “comunicación” cruzada y “co-evolución” de las células cancerosas y del estroma durante la progresión de la enfermedad (27). Se está dedicando un creciente esfuerzo para la caracterización de las poblaciones de células estromales, y las proteínas que expresan, responsables de la malignización tumoral y la colonización metastásica. En este sentido, nuestro laboratorio identificó a LOXL2 como una proteína de los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), cuya alta expresión se asocia con mal pronóstico del CCR, así como con la identificación de pacientes con CCR en estadio II y III de alto riesgo (28). LOXL2 es una lisil oxidasa que cataliza la reticulación de colágenos y elastina en la matriz extracelular, provocando un aumento de la rigidez de la matriz, de la formación de adhesiones focales y de la activación de la vía PI3K (29), y facilitando el reclutamiento de células derivadas de médula ósea que liberan citoquinas y factores de crecimiento, lo que promueve la colonización de células cancerosas en órganos distantes (30). Además de su función extracelular, LOXL2, que tiene localización nuclear (28), participa en la regulación transcripcional (31), por lo que no

se puede descartar que el papel que desempeña LOXL2 en CCR sea de regulador transcripcional en las células del estroma.

## 1.2.Desarrollo y etiología del CCR

El CCR es una enfermedad heterogénea que puede producirse a partir de diferentes antecedentes patológicos (32, 33). En la mayoría de los casos (entre el 70-90%) el CCR es esporádico y la aparición del tumor se debe a complejas interacciones entre el individuo y determinados factores ambientales, como por ejemplo, la dieta (34, 35) o el tabaquismo (36). En el 10-30% restante, los casos de CCR se agrupan en diferentes síndromes, los cuales se caracterizan porque el desarrollo de la enfermedad está directamente relacionado con la presencia de distintas alteraciones genéticas hereditarias específicas (37) (Figura 4).

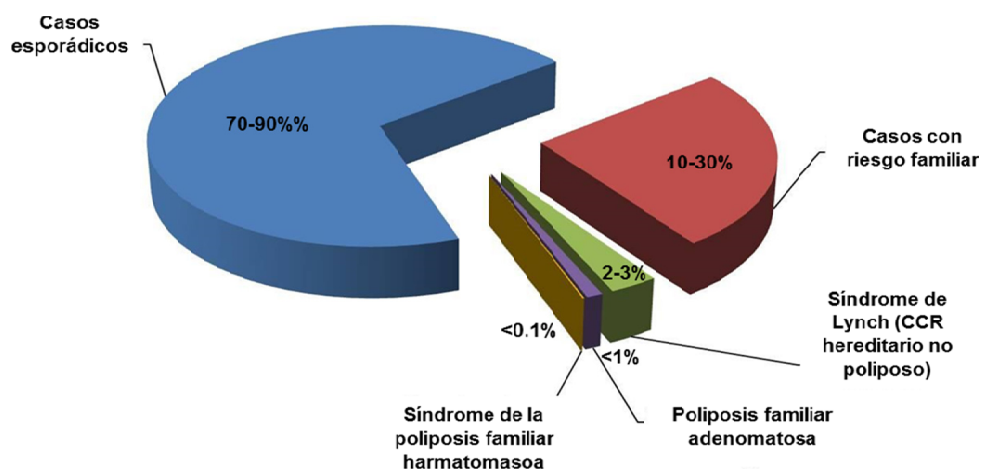


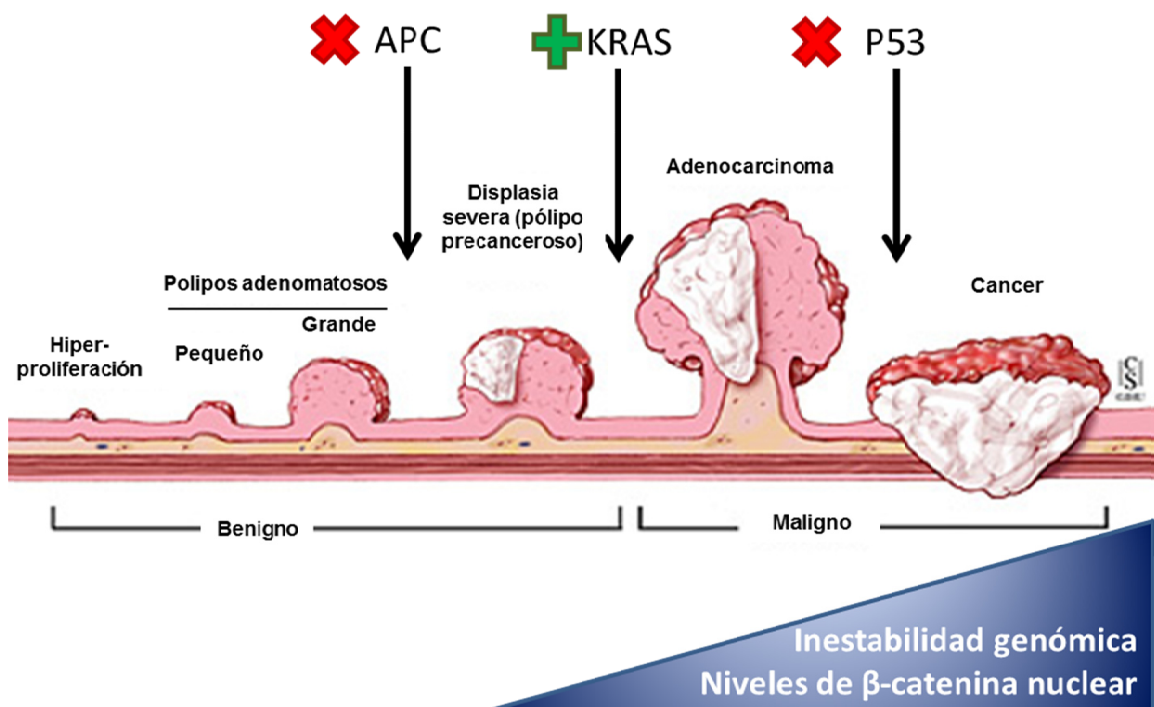
Figura 4: Gráfico de la etiología del CCR (National Institute of Health, USA)

### 1.2.1. CCR esporádico

La mayor parte de los CCR diagnosticados se tratan de casos esporádicos en los que el desarrollo tumoral no está asociado a ningún componente hereditario. En la década de los 80, el Dr. Bert Vogelstein desarrolló un modelo de carcinogénesis colorrectal, conocido como la secuencia adenoma-carcinoma, en el que propone que la transición de un epitelio normal a un tumor maligno está asociada a eventos moleculares

específicos ordenados secuencialmente (38). El primer evento que conlleva el paso de un pólipo adenomatoso a un pólipo displásico es la supresión de la función del gen *APC* (del inglés Adenomatoso Polyposi s Coli). A continuación, el paso del pólipo displásico a un adenocarcinoma está marcado por mutaciones activadoras del oncogén *KRAS*. Por último, la formación del carcinoma se completa con la inactivación o mutación en *P53* (39-41) (Figura 5).

Aunque hoy en día este modelo se considera el paradigma de la explicación de la carcinogénesis colorrectal, es demasiado esquemático, puesto que la carcinogénesis colorrectal es un proceso extremadamente complejo, en el que se da un gran número de alteraciones genéticas adicionales que contribuyen a incrementar la inestabilidad genómica (42), así como los niveles de  $\beta$ -catenina nucleares, ambos eventos característicos e intrínsecos a la carcinogénesis del CCR esporádico.



**Figura 5. Secuencia adenoma – carcinoma.** Modelo de la carcinogénesis del CCR propuesto por Vogelstein (38) (Adaptado de John Hopkins Medicine).

### **1.3.Mecanismos de inestabilidad genómica en CCR**

Se han descrito tres mecanismos moleculares de inestabilidad genómica en CCR. Cada uno de ellos presenta diferentes alteraciones moleculares que conducen a la malignización de la mucosa colorrectal: la inestabilidad de microsatélites, el fenotipo hipermetilador de las islas CpG y la inestabilidad cromosómica.

#### **1.3.1. Inestabilidad de microsatélites**

Los microsatélites son secuencias repetidas de DNA, de entre 1–6 pares de bases de longitud y distribuidas a lo largo del genoma humano. La inestabilidad de microsatélites (MSI) está asociada a defectos en los procesos de reparación del DNA o MMR (del inglés *DNA Mismatch Repairs*) que conllevan alteraciones en la replicación del DNA y se traducen en la aparición de inserciones y deleciones en las secuencias microsatélites. La MSI es característica del CCR hereditario no asociado a poliposis (HNPCC), aunque también aparecen en aproximadamente el 20% de los casos de CCR esporádico (43). Las mutaciones genéticas asociadas a MSI aparecen en genes relacionados con la reparación del DNA (*MRE11A*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2* o *PMS1*) (44), en receptores de factores de crecimiento (IGF receptor II) o en factores pro-apoptóticos (BAX), entre otros. Por el contrario, mutaciones en genes como *KRAS* o *PI3K*, cuyas alteraciones son muy prevalentes en la carcinogénesis colorrectal son infrecuentes en tumores con MSI (45).

#### **1.3.2. Fenotipo hipermetilador de islas CpG**

Los tumores cuya inestabilidad genómica se debe principalmente a este mecanismo (tumores CIMP+) presentan un alto índice de hipermetilación en zonas concretas (conocidas como islas CpG) de los promotores de genes supresores de tumores que lleva a la inactivación de su función (46, 47). Los tumores CIMP+ tienen una serie de características clínico-patológicas bien definidas como una pobre

diferenciación, una alta frecuencia de mutaciones en *BRAF* y ausencia de alteraciones clásicas en *P53* o *APC* (48).

### 1.3.3. Inestabilidad cromosómica

La inestabilidad cromosómica (CIN) se define como el ratio acelerado de ganancia o pérdida de cromosomas enteros o partes de ellos que resulta en la variabilidad cariotípica de célula a célula (39). La CIN es el mecanismo de inestabilidad genómica característico del CCR esporádico (se detecta aproximadamente en el 85% de los casos), que se asocia con mal pronóstico, no solo en el CCR, sino en todos los tumores sólidos (49). La consecuencia principal de la CIN es el desequilibrio en el número de cromosomas o aneuploidía. Existen dos tipos de aneuploidía en las células tumorales: la aneuploidía numérica, que se refiere a la ganancia y/o pérdida de cromosomas enteros, consecuencia de la segregación errónea de los cromosomas durante la mitosis; y la aneuploidía estructural, que hace referencia a la ganancia y/o pérdida de grandes porciones de cromosomas, debido a reordenamientos cromosómicos.

El papel que tiene la aneuploidía y CIN en cáncer es controvertido (50). La creciente evidencia sugiere que el efecto de la aneuploidía en los tumores está determinado por la tasa de CIN, de tal manera que una tasa baja de CIN se considera una característica promotora tumoral, mientras que una tasa alta de CIN parece causar la muerte celular y la supresión tumoral. La dificultad de entender los efectos de la aneuploidía y la CIN en tumorigénesis se debe en parte a que las proteínas implicadas en la aparición de estos procesos tienen otras funciones no mitóticas (50), lo que dificulta su identificación como proteínas responsables de estos procesos. Aún con ello, se han descrito los mecanismos generales implicados en el desarrollo de CIN, que son: defectos en la segregación cromosómica, principalmente debidos a fallos en el punto de control mitótico o *checkpoint* de mitosis, también conocido como *checkpoint* del huso

mitótico, aunque también debido a un número y/o función anormal de los centrosomas, disfunción telomérica y respuestas de daño a DNA (49, 51).

El *checkpoint* de mitosis retrasa la progresión mitótica hasta que los cromosomas se unen correctamente al huso mitótico para garantizar una segregación exacta. Las cromátidas hermanas se unen a los microtúbulos del huso a través de sus cinetocoros, unos complejos proteicos que se ensamblan en la región centromérica del DNA. Cuando los cinetocoros no están bien conectados, se genera la señal del punto de control mitótico que inhibe el inicio de la anafase. Aunque se conoce cómo funciona, de manera general, el *checkpoint* de mitosis, y que proteínas como Mad1, Mad2, Bub1, BubR1, Bub3, CENP-E, Mps1, el complejo promotor de la anafase / ciclosoma (APC / C) y Cdc20 (50, 52-54) participan en este punto de control, todavía se desconocen todas las proteínas implicadas en este proceso.

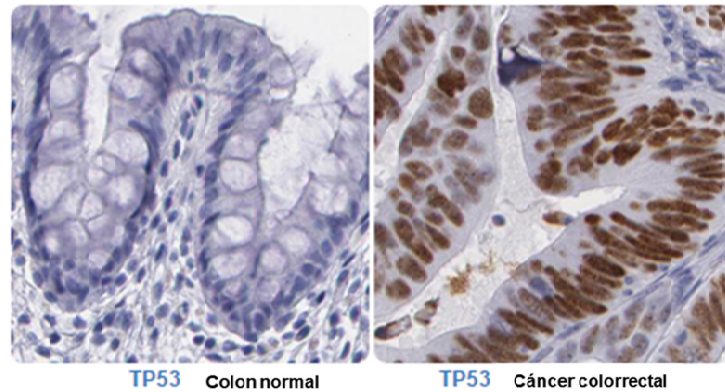
La citogenética convencional y los estudios de hibridación genómica comparada (CGH) en CCR muestran una frecuente aparición de aberraciones cromosómicas como la ganancia de las regiones cromosómicas 20q, 13q, 7p y 8q y la pérdida de 18q, 17p y 8p (55-57). Cabe destacar que la región alélica más común de pérdida (75% de los CCR) es la 17p, que contiene el gen supresor *P53* (39).

### **1.4.APC y p53 en CCR esporádico**

El gen supresor tumoral *APC* se considera el responsable de la iniciación de la poliploidía y la CIN en el desarrollo y progresión del CCR esporádico (58, 59). *APC* es una proteína multifuncional que contiene sitios de unión para múltiples proteínas, como son algunos factores de Rac, reguladores del citoesqueleto,  $\beta$ -catenina o microtúbulos (60). Gracias a su capacidad de unión a microtúbulos, *APC* está involucrada en migración celular (61), así como en la formación del huso mitótico (62), un proceso

clave para la correcta segregación cromosómica. Tanto es así, que la pérdida del gen *APC* promueve la aparición de errores en la segregación cromosómica (63, 64) con el consecuente desarrollo de aneuploidía y CIN. Por otro lado, la pérdida de *APC* conduce a la acumulación de  $\beta$ -catenina nuclear, con la consiguiente activación inapropiada de la vía de señalización Wnt (65), lo que también contribuye a la CIN (60, 66).

Todavía se desconocen los mecanismos implicados en el fallo mitótico desencadenado por la errónea segregación cromosómica de células de CCR deficientes en *APC*, si bien es cierto que se supone que podrían estar implicados defectos en el punto de control del huso mitótico (SAC) (67) y en la ruta de señalización mediada por p53 (68). p53 es un factor de transcripción al que también se le otorga el papel de supresor tumoral, ya que es el coordinador central de procesos celulares clave como respuestas de daño a DNA, estrés oxidativo, señales proliferativas aberrantes, regulación del ciclo celular o apoptosis (69). El papel de p53 en la aparición y promoción de la CIN es controvertido. p53 forma parte de los puntos de control del ciclo celular, provocando arresto en las fases G1 y G2/M del ciclo celular (70-73), apoptosis (74, 75) o senescencia (76-78), cuando las células se encuentran sometidas a un estrés, como por ejemplo, a CIN. *P53* es uno de los genes más frecuentemente alterados en cáncer. Aparece alterado en el 50-75% de los CCRs (79), donde muestra mutaciones (80), polimorfismos (81, 82), así como una expresión diferencial entre el tejido tumoral y su homólogo de tejido normal (Figura 6).



**Figura 6. Análisis de los niveles de expresión de p53 en CCR.** Las imágenes de inmunohistoquímica recopiladas en la base de datos Human Protein Atlas muestran un aumento de la expresión de p53 en tejido tumoral de CCR respecto del tejido normal.

Existe una fuerte correlación entre los tumores colorrectales aneuploides y la mutación de *P53* (83). Estos datos sugieren que alteraciones en p53 le incapacitan para impedir la viabilidad de las células tumorales con CIN mediante la ejecución de un programa apoptótico. A pesar de ello, sigue sin clarificarse si la mutación de *P53* es obligatoria para la propagación de células aneuploides. De hecho, si p53 está involucrado en restringir el potencial tumorigénico de las células con CIN, las mutaciones en p53 deberían preceder a la aparición de CIN en algunos tumores. Este parece ser el caso de la neoplásica del esófago de Barrett, donde la pérdida de p53, a través de la delección del cromosoma 17p, surge antes del desarrollo de la aneuploidía (84). Sin embargo, en muchos otros cánceres como el CCR, la CIN aparece como un evento temprano, anterior a la inactivación de p53, que ocurre mucho más tarde en la progresión tumoral (40). Además, células cancerosas aneuploides o con CIN todavía expresan p53 *wild type* ([http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell\\_lines](http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines)) (85) y son capaces de proliferar y sobrevivir (86, 87), lo que sugiere que otros mecanismos aún desconocidos podrían ser responsables de la aparición y la propagación de la CIN. En cualquier caso, todavía falta una descripción mecanicista completa de las vías de señalización y las proteínas que vinculan la aneuploidía y CIN en las células tumorales.

### **1.5. Taxanos y otras drogas en CCR**

El tratamiento del CCR incluye la utilización de distintas estrategias terapéuticas, en función del estadio tumoral. Aproximadamente el 40% de los casos de CCR en estadios I o II pueden ser curados únicamente con cirugía, sin tratamiento quimio o radioterapéutico (88). Los pacientes diagnosticados con estadio III son candidatos para recibir quimioterapia adjuvante después de la resección quirúrgica, mientras que los pacientes diagnosticados en estadio IV (con metástasis) normalmente reciben quimioterapia antes de la posible resección quirúrgica (88). Para tratar a los pacientes con CCR en estadios III y IV, hoy en día se utiliza quimioterapia combinada de diferentes drogas, como: 5-fluorouracil, leucovorin y oxaliplatin (FOLFOX); 5-fluorouracil, leucovorin y irinotecan (FOLFIRI); y capecitabine (la forma oral del 5-fluorouracil, también conocido como Xeloda®) más oxaliplatin (XELOX), puesto que se ha observado que incrementa la supervivencia desde 6 meses a 18-20 meses (89-95).

Otros fármacos tales como los taxanos, a pesar de ser los más eficaces en el tratamiento de tumores de pacientes que exhiben CIN, como por ejemplo los de mama, ovario o pulmón (96), no se utilizan en la terapia del CCR. El taxol (paclitaxel), uno de los taxanos más comúnmente utilizados, induce muerte celular a través de la inhibición de la polimerización/despolimerización de los microtúbulos durante la fase M del ciclo celular. Se sabe que las células deficientes en APC (la mayoría de las células de CCR) son menos sensibles al tratamiento con taxol, debido a un deterioro del paro mitótico (67, 97), siendo ésta la principal razón por la que los taxanos no se utilizan en el tratamiento del CCR.

Estos datos evidencian la necesidad de sensibilizar a las células de CCR al tratamiento con este tipo de fármacos o bien de encontrar nuevos fármacos específicos para el tratamiento de la metástasis del CCR. En este sentido, el bortezomib ha surgido

como el primero de una nueva clase de fármacos conocidos como inhibidores del proteosoma (98). Actualmente se utiliza para el tratamiento del mieloma múltiple (99) y consiste en un compuesto citotóxico que interfiere con la degradación y plegamiento de las proteínas, inhibiendo selectiva y reversiblemente la actividad del proteosoma 26S.

### **1.6. Biomarcadores en cáncer**

Un biomarcador se define como una característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (100).

Se han descrito más de 500 genes fuertemente implicados en el proceso de transformación de células normales a células cancerosas (101). Las proteínas de expresión alterada en cáncer, así como las mutaciones en genes asociados a esta enfermedad son buenos candidatos biomarcadores y/o dianas terapéuticas del cáncer, ya que logran diferenciar entre el tejido tumoral y su homólogo normal. Además de lograr discernir correctamente entre el tejido tumoral y el normal pareado correspondiente, un buen biomarcador debe desempeñar un papel importante en el desarrollo del cáncer, pero no así en otros procesos vitales clave (para limitar los potenciales efectos secundarios), tener un patrón de expresión específico y tener propiedades estructurales y funcionales que permitan su fácil detección mediante técnicas poco invasivas en el caso de biomarcadores.

#### **1.6.1. Biomarcadores en CCR**

Los biomarcadores de CCR actualmente utilizados son, entre otros, el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el CA19.9 (102). CA19.9, y sobre todo CEA, son buenos marcadores de recidiva después de la cirugía (102). Sin embargo, enfermedades inflamatorias como gastritis, enfermedad hepática o diverticulitis, entre otras, producen

un aumento de sus niveles, por lo que se considera que estos marcadores tienen baja capacidad diagnóstica del CCR. Además, presentan una baja sensibilidad para la detección de estadios tempranos (103). Por estas razones, la Sociedad Americana de Clínica Oncológica (ASCO) y el Grupo Europeo de marcadores tumorales recomiendan que únicamente se utilicen estos marcadores para el seguimiento de la respuesta al tratamiento de la enfermedad y no para el cribado de CCR (104). Para el cribado del CCR se están utilizando otros marcadores como *KRAS*, *BRAF*, *SMAD*, la MSI (105), y más recientemente las células tumorales circulantes, identificadas como un componente necesario para la cascada metastásica. Numerosos estudios han señalado que no existe una única proteína que defina claramente el estado de una enfermedad y que a su vez diferencie entre otros estados fisiológicos y patológicos. Por esta razón, se necesitan combinaciones de biomarcadores que perfilen un patrón específico de cada estadio de cada enfermedad.

Parte de los esfuerzos de nuestro laboratorio se centran en la búsqueda de biomarcadores del CCR y su metástasis, utilizando distintas técnicas como *microarrays* de proteínas (106), micoesferas multiplex para la detección de autoanticuerpos (107) o herramientas proteómicas. Concretamente, nuestro laboratorio se ha centrado en la búsqueda de autoanticuerpos que puedan funcionar como biomarcadores del CCR. El desarrollo de autoanticuerpos en pacientes con cáncer es consecuencia de la respuesta humoral (108) desarrollada por la presencia en el tumor de proteínas que están sobreexpresadas, mutadas, mal plegadas, en localizaciones subcelulares erróneas o degradadas de manera aberrante (109, 110), conocidas como antígenos asociados a tumor (AAT). Nuestro grupo identificó y caracterizó la respuesta humoral a CCR, describiendo un total de 43 AAT (106), entre los que se encontraban MST1, STK4, SULF1(111), FGFR4(112) o PIM1. Otros potenciales biomarcadores del CCR

identificados por nuestro grupo fueron los anteriormente comentados CDH17, IL13R $\alpha$ 2 y LOXL2.

### **1.6.2. Principales fuentes de biomarcadores en cáncer**

El secretoma y la fracción de membrana contienen un importante porcentaje de las proteínas totales de la célula (113). Se predice que aproximadamente el 39% de los 19628 genes codificadores de proteínas humanas tienen un péptido señal y/o al menos una región transmembrana que sugiere el transporte activo de la proteína fuera de la célula (secreción) o su ubicación en uno de los numerosos sistemas de membrana, respectivamente (113).

El secretoma se define como todas las proteínas liberadas por una célula, tejido u organismo a través de diversos mecanismos que incluyen la secreción clásica, la secreción no clásica y la secreción a través de exosomas (114). La fracción proteica de membrana hace referencia a todas aquellas proteínas asociadas o unidas a la membrana de una célula o a un orgánulo dentro de la célula.

Las proteínas o sus fragmentos secretados por la célula tumoral se encuentran no solo en los fluidos proximales al tumor, sino también en otros fluidos corporales como la sangre o la orina en concentraciones suficientemente altas como para ser detectadas a través de ensayos no invasivos. Por estas razones, gran parte de los tratamientos clínicamente aprobados utilizan fármacos dirigidos hacia (o bien consistentes en) proteínas secretadas o de membrana asociadas a la superficie celular (115). Todas estas razones hacen del secretoma tumoral una prometedora y confiable fuente de posibles biomarcadores del CCR, que ha sido objeto de investigaciones (116-118). En algunas de ellas, y mediante la utilización de herramientas de proteómica cuantitativa, se han llegado a identificar hasta 76 potenciales biomarcadores de la enfermedad, detectables

en sangre o heces (119), proteínas nucleares asociadas a la transformación de adenomas en carcinomas (120), así como proteínas exclusivamente asociadas a la metástasis del CCR (121).

### **1.6.3. Técnicas “ómicas” para la detección de biomarcadores**

La proteómica cuantitativa basada en espectrometría de masas se engloba dentro de las conocidas como tecnologías “ómicas”, las cuales permiten identificar, cuantificar y caracterizar miles de genes o proteínas en muestras biológicas complejas. El desarrollo de estas técnicas ha permitido estudiar las características de un tumor a nivel global, así como facilitar el descubrimiento de nuevos biomarcadores o dianas terapéuticas asociados al CCR.

Los biomarcadores pueden ser genéticos o proteómicos. La herramienta “ómica” fundamental para la detección de biomarcadores genéticos son los *microarrays* de DNA (122). La utilización de esta técnica ha permitido la caracterización genética de los cánceres de próstata (123), CCR (124-126), vejiga (127), melanoma (128) o mama (129), siendo este último clínicamente útil (130). Por otro lado, la proteómica es la técnica “ómica” utilizada para la detección de marcadores proteicos asociados al cáncer.

### **1.7. Proteómica cuantitativa**

Las herramientas de proteómica cuantitativa basadas en espectrometría de masas, juegan un papel fundamental en la investigación oncológica, proporcionando información acerca de los cambios dinámicos del proteoma, ya sea a nivel de abundancia o de modificaciones postraduccionales, relacionados con la progresión tumoral.

Los equipos utilizados en esta Tesis Doctoral han sido el LTQ-Orbitrap y el Q-Exactive. El LTQ-Orbitrap es un espectrómetro de masas híbrido formado por dos

analizadores, una trampa iónica lineal modificada con doble detector, acoplada a un analizador de masas electrostático de alta resolución, denominado Orbitrap (Figura 7).

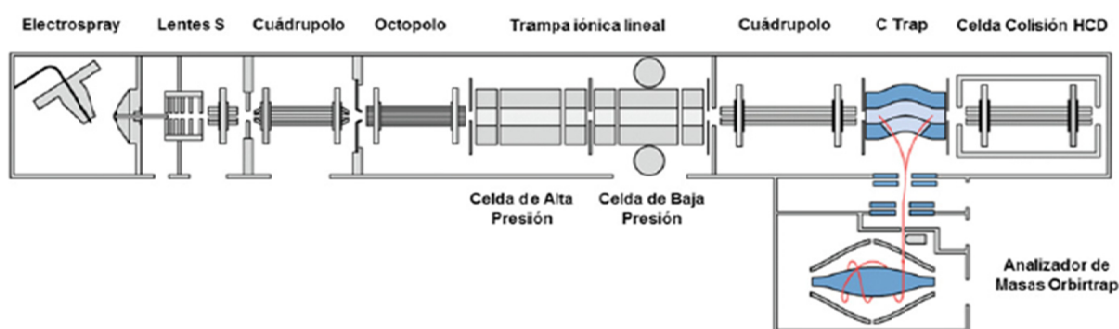


Figura 7. Esquema de la estructura del espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Adaptado de Thermo Scientific).

Por otro lado, el espectrómetro de masas híbrido Q-Exactive está formado por un cuadrupolo que actúa como filtro de masas frontal, acoplado a un analizador Orbitrap. Este tipo de espectrómetro de masas puede ser utilizado para seleccionar el ion precursor tanto para la monitorización de iones seleccionados (SRM) como para los experimentos MS/MS dependientes de los datos (Figura 8).

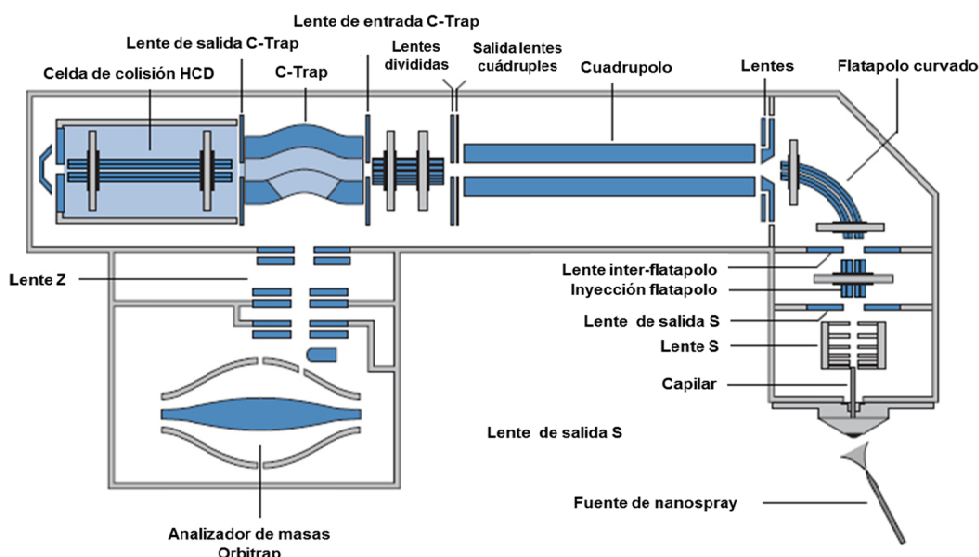


Figura 8. Esquema de la estructura del espectrómetro de masas Q-Exactive (Adaptado de Thermo Scientific).

La espectrometría de masas no es una técnica intrínsecamente cuantitativa, por lo que hoy en día se llevan a cabo varias técnicas que permiten la cuantificación

diferencial basada en espectrometría de masas (131). Una de ellas es el marcaje isotópico diferencial de las muestras a comparar. El marcaje se puede realizar *in vivo*, introduciendo los isótopos mediante la incorporación metabólica de aminoácidos marcados (SILAC) (132, 133) o *in vitro*, mediante reacción química con reactivos marcados isobáricamente (TMT o iTRAQ) (134, 135). Las variaciones de intensidad de cada péptido identificado, detectables en el espectro de masas, pueden relacionarse directamente con la variación de la abundancia de las proteínas entre las diferentes muestras.

Por otro lado, otra técnica utilizada es la cuantificación libre de marcaje, método que supera la limitación antes comentada mediante cálculos computacionales adicionales. Esta técnica, conocida como *label free*, consiste en analizar bioinformáticamente los datos de espectrometría de masas sin tratamiento previo de las muestras a comparar.

### 1.7.1. Marcaje isobárico iTRAQ

El marcaje isobárico se realiza *in vitro* y se basa en la incorporación de reporteros químicos marcados isotópicamente que se unen covalentemente a los péptidos. Existen dos estrategias de marcaje: el marcaje isotópico con TMT (del inglés *Tandem Mass Tag*) o iTRAQ (del inglés *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*). El reactivo TMT o iTRAQ se compone de un grupo reportero, un grupo reactivo de unión a grupos amino del extremo N-terminal y un grupo de balance de masas. Puesto que los reactivos son isobáricos, los péptidos marcados con ellos tienen la misma masa molecular, y se unen y fragmentan a la vez. Durante la fragmentación, el enlace entre el grupo reportero y el grupo de balance de masas se rompe fácilmente y libera los iones reporteros monocargados de distinta masa (TMT:  $m/z$  126 a 131 e iTRAQ:  $m/z$  de 113 a 121) para cada una de las muestras. La intensidad de dichos iones

reporteros permite la cuantificación relativa de las distintas especies marcadas. La cuantificación se realiza a nivel del espectro MS/MS.

Aunque este método permite realizar cuantificaciones fiables así como comparar hasta un total de 8 muestras en paralelo, tiene la desventaja del alto coste de los reactivos, posibilidad de marcaje incompleto en algunos de ellos y una importante complejidad de la preparación de la muestra, así como la necesidad de mayores concentraciones de ésta (136).

### 1.7.2. *Label-free*

La metodología *label free* se emplea cada vez más debido a que no requiere ningún marcaje, lo que minimiza el número de pasos en la preparación de la muestra y evita las desventajas que presentan las técnicas de marcaje. El *label free* es un área de rápido crecimiento en proteómica que puede dividirse a su vez en dos métodos: aquellos que utilizan directamente la intensidad de un péptido en el espectrómetro de masas como una medida cuantitativa y los que infieren indirectamente la cantidad de un péptido atendiendo, por ejemplo, al número de espectros obtenidos de dicho péptido (PSMs). Este último método, conocido como *spectral counting*, se basa en la correlación que existe entre la frecuencia con la que un espectrómetro de masas en tándem fragmenta un ion de un  $m/z$  dado y la abundancia de la proteína de la que procede ese ion (137).

El otro método de cuantificación por *label free* se basa en analizar la intensidad de la señal espectrométrica de los iones precursores de péptidos que pertenecen a una proteína particular. Se ha observado que las áreas de los picos obtenidos por espectrometría de masas de cromatografía líquida se correlacionan linealmente con la concentración de la proteína (138). La desventaja de este método de cuantificación es

que sólo el 70% de los péptidos identificados se comparten entre los replicados técnicos (139). Un péptido podría corresponder a una MS / MS en una réplica pero no en otra, aunque el péptido estuviera presente en ambas réplicas. Este problema se solventa alineando los tiempos de retención entre los conjuntos de archivos obtenidos, lo que permite asignar estas identificaciones esporádicas a cromatogramas de iones precursores en experimentos que carecen de dichas identificaciones. Sin embargo, en muchos casos, los picos en el espectro no corresponden con los péptidos identificados. De hecho, la reproducibilidad del tiempo de retención cromatográfico es uno de los mayores retos a solventar en la medición de las diferencias específicas entre los péptidos.

### **1.8. Estudio del interactoma mediante espectrometría de masas**

La proteómica engloba, además del estudio comparativo de los cambios en los niveles de expresión de proteínas (proteómica cuantitativa), el análisis de las interacciones proteína-proteína. La combinación de purificación por afinidad y espectrometría de masas (AP-MS) (140) ha permitido la caracterización de numerosos complejos proteicos, de gran utilidad para el conocimiento de los mecanismos implicados en muchos procesos biológicos, entre ellos el CCR. La combinación de ambas técnicas ha permitido conocer el interactoma, y por tanto los mediadores de señalización, de proteínas clave en CCR como CDH17 (21) o IL13R (18).

Recientemente ha surgido una nueva herramienta para el análisis del interactoma proteico, también acoplada a espectrometría de masas, conocida como biotinylación por proximidad (BioID). Esta técnica, introducida por Roux et al. (141), consiste en fusionar a una proteína de interés, la ligasa mutada de biotina de *Escherichia coli* (BirA\*), que constitutivamente biotinyliza a su vecindad más próxima, y por tanto, a la de la proteína de interés a la cual está fusionada. De esta manera, mientras que la AP-MS permite la identificación de grandes complejos proteicos, la BioID acoplada a

espectrometría de masas proporciona información acerca del interactoma más próximo de la proteína de interés. Aunque la utilización de esta técnica para la caracterización del interactoma proteico es muy reciente, ya se ha aplicado para el estudio de los complejos proteicos asociados a la cromatina (142).

La combinación de las técnicas de purificación por afinidad y BioID acopladas a espectrometría de masas se antoja como la aproximación más completa para la caracterización del interactoma proteico. Por esta razón, ambas técnicas se han utilizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral para analizar el interactoma de las proteínas LOXL1 y PAUF.

### **1.9. Modelo celular KM12 para el estudio de la metástasis del CCR**

La línea KM12C es una línea epitelial derivada de un carcinoma colorrectal humano en estadio II con poca capacidad metastática. Las células KM12C se inyectaron en la pared del ciego y en el bazo de ratones desnudos para obtener metástasis hepáticas espontáneas y experimentales, respectivamente. El resultado de extraer y poner en cultivo las metástasis hepáticas espontáneas originadas por la inoculación de las células KM12C en la pared del ciego de los ratones desnudos fue la obtención de la línea KM12SM, mientras que la extracción y puesta en cultivo de las metástasis experimentales formadas por la inoculación de las células KM12C en el bazo de los ratones desnudos dio lugar a la línea celular KM12L1. Esta última línea celular se pinchó en bazo y se extrajo de la metástasis hepática durante tres rondas y se obtuvo la línea KM12L4. Las células KM12SM y KM12L4 tienen alta capacidad metastática en comparación con su línea parental KM12C. Dado que las tres líneas celulares tienen el mismo origen, cualquier alteración en el patrón de expresión génica o en el nivel de expresión proteica debe estar directamente relacionado con la formación de metástasis.

En nuestro laboratorio, previamente se utilizaron técnicas de proteómica cuantitativa para la caracterización en profundidad del secretoma asociado a la metástasis hepática del CCR, utilizando el modelo celular de CCR KM12. Identificamos un gran número de proteínas desreguladas en las células KM12SM respecto de las KM12C, entre las que se encontraba la proteína ZGB16, también conocida como PAUF (de sus siglas en inglés Pancreatic Adenocarcinoma Upregulated Factor), que aparecía sobre-expresada en la línea celular altamente metastásica KM12SM.

## **2. PAUF**

PAUF es una proteína secretada de 208 aminoácidos, que es susceptible de N-glicosilarse (143). Los primeros 52 aminoácidos corresponden al péptido señal. Desde el aminoácido 77 al 185 posee un dominio jacalina, que en su imagen cristalográfica se revela como un motivo estructural  $\beta$ -prisma, similar al motivo de unión a carbohidratos de las proteínas de plantas lectinas (144, 145). Sin embargo, PAUF es incapaz de unirse a monosacáridos simples debido a la ausencia de un aspártico en la posición 225, así como de un largo bucle entre las hebras siete y ocho, que son las características estructurales que permiten la unión de las lectinas a los hidratos de carbono (144).

### **2.1.PAUF en cáncer**

PAUF se describió inicialmente como una proteína sobre-expresada en cáncer de páncreas (143). Sin embargo, parece que también se sobre-expresa en otros tipos de cánceres, como el cáncer de ovario (143, 146), cuello uterino (147) o estómago (143). El papel que desempeña PAUF en el desarrollo de estos tipos de cánceres está aún por explorar, si bien es cierto que en el cáncer de páncreas está algo caracterizado. En este tipo de cáncer se ha observado que PAUF promueve determinadas propiedades tumorigénicas como proliferación (148-150), adhesión (151), migración e invasión (143, 150) celular.

## **2.2.Mecanismo molecular de la acción de PAUF**

Poco se conoce acerca del mecanismo de acción de PAUF en los procesos tumorales comentados anteriormente. Parece que PAUF podría promover la proliferación (148, 149) y migración (150) celular a través de su interacción con el receptor de citoquinas C-X-C tipo 4 (CXCR4) (144, 152). Una vía alternativa de la regulación de la proliferación celular por parte de PAUF podría ser a través de la regulación de la expresión y actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina (153), una proteína implicada en supervivencia celular y tumorigénesis (154, 155).

Por otro lado, se ha descrito que PAUF interacciona con el receptor *toll-like 2* (TLR2) (144, 152), activando las kinasas MEK1/2 y ERK (144), que junto con las kinasas c-Jun y AKT, cuya activación también es promovida por PAUF (150), participan en vías de señalización que controlan la expresión de genes relacionados con invasión (150), progresión tumoral y metástasis (156, 157). Además, la interacción entre PAUF y TLR2 promueve la secreción de las citoquinas RANTES, interleukina (IL)-1RA y MF (144), citoquinas que estimulan la proliferación tumoral, la angiogénesis y la metástasis (158-160).

## **3. LOXL1**

LOXL1, identificada en esta Tesis Doctoral en el secretoma de células y tejidos tumorales de CCR, pertenece, al igual que LOXL2, a la familia de las lisil oxidasas (161). Es una proteína secretada que se localiza en el espacio extracelular formando parte del microambiente celular. Tiene actividad amina oxidasa extracelular dependiente de cobre, mediante la cual cataliza la primera etapa en la formación de las reticulaciones de colágeno y elastina. Esta actividad la comparte con el resto de miembros de la familia, pues todos presentan una secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal suficiente para el desarrollo de esta actividad (162). Por otro lado, el dominio N-

terminal, mal conservado entre los miembros de la familia, puede otorgarle a LOXL1 y al resto de componentes, funciones adicionales en la regulación del desarrollo, senescencia, supresión tumoral, control del crecimiento celular o quimiotaxis (162).

El papel de LOXL1 en cáncer no ha sido prácticamente caracterizado. El resto de proteínas de la familia desempeñan un papel dual en cáncer (163), promoviendo la progresión tumoral (29) y la metástasis (164-166), pero también inhibiendo el desarrollo tumoral (167-169). Lo poco que se conoce de LOXL1 en cáncer parece indicar que LOXL1 desempeña también un papel dual en esta enfermedad. Se ha descrito que LOXL1 podría actuar como un supresor tumoral en cáncer de vejiga (170), mientras que parece que promueve la metástasis pulmonar del cáncer de mama (171). El papel de LOXL1 en CCR es totalmente desconocido, no habiendo ninguna publicación al respecto en el momento de desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En esta Tesis Doctoral, la aplicación de herramientas de proteómica cuantitativa utilizando muestras celulares y de tejidos humanos de CCR ha permitido identificar nuevos posibles biomarcadores de la enfermedad, así como caracterizar en detalle los mecanismos moleculares alterados en la metástasis del CCR. Además, la utilización de estas técnicas, junto a otras de biología molecular, ha permitido comprender el papel que podrían desempeñar las proteínas PAUF y LOXL1 en CCR y su metástasis, proteínas de las que apenas se tenía conocimiento de su posible implicación en esta enfermedad.



## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido la identificación y caracterización de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas de la metástasis de CCR. Para abordar este objetivo general, se han llevado a cabo una serie de objetivos específicos. Por un lado, hemos identificado un conjunto de nuevos candidatos biomarcadores de CCR, utilizando muestras humanas y células de CCR, así como herramientas de proteómica cuantitativa. Por otro lado, hemos identificado a LOXL1 y PAUF como proteínas clave en CCR, caracterizando su función, así como los mediadores de su acción.

De forma desglosada, los objetivos de esta Tesis Doctoral han consistido en:

1. Caracterización, mediante herramientas de proteómica cuantitativa y usando líneas celulares de CCR, de las proteínas y mecanismos moleculares alterados en la metástasis de CCR.
  - Análisis de los procesos biológicos alterados en la metástasis de CCR.
  - Identificación de nuevos biomarcadores en CCR.
  - Validación de los candidatos biomarcadores seleccionados con muestras humanas de CCR, usando técnicas de proteómica cuantitativa, y con datos recogidos en bases de datos públicas.
2. Estudio del papel de LOXL1 y PAUF en CCR.
  - Análisis de la expresión de LOXL1 en CCR. Evaluación de su función en la tumorigénesis de cáncer de colon. Estudio del interactoma de LOXL1.
  - Análisis de la expresión de PAUF en CCR. Caracterización, *in vitro* e *in vivo*, del papel de PAUF en la tumorigénesis de cáncer de colon. Estudio del interactoma de PAUF. Evaluación de PAUF como posible nueva diana terapéutica en CCR.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



#### 4. Datos clínicos de los pacientes y de las muestras de tejidos normales, tumorales y metastásicos

Para el análisis de la expresión de PAUF se utilizaron muestras de tejido normal, tumoral y metastásico de 13 pacientes con CCR, cedidas por A. Villanueva (ICO. Barcelona). Todas las muestras se manejaron de forma anónima de acuerdo con las normas éticas y legales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de los hospitales. Los tejidos tumorales primario y metastásico se congelaron inmediatamente después de la cirugía y se conservaron a - 80 °C hasta su posterior procesamiento. Los datos de los 13 pacientes se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Información de los 13 pacientes con CCR metastásico**

Número	Tipo de metástasis	Localización del tumor primario
7	Sincrónica	Recto
14	Sincrónica	Colon
15	Sincrónica	Recto
16	Sincrónica	Colon
21	Sincrónica	Recto
22	Sincrónica	Colon
23	Sincrónica	Recto
24	Metacrónica	Colon
29	Sincrónica	Colon
32	Sincrónica	Colon
35	Sincrónica	Colon
36	Metacrónica	Colon
39	Sincrónica	Recto

Por otro lado, para la búsqueda de nuevos marcadores de CCR mediante herramientas proteómicas se utilizaron muestras de secretoma de tejidos pareados normales y tumorales correspondientes a 21 pacientes con CCR. Estas muestras se obtuvieron en el VU-Cancer Center de Amsterdam (Países Bajos), siguiendo las normas éticas y legales de dicho centro. Tanto el tejido de colon normal como tumoral se obtuvieron en la misma intervención quirúrgica. Inmediatamente después de la cirugía

los tejidos se incubaron 1 h a 37 °C en PBS para la obtención de los secretomas. Los datos clínicos de los 21 pacientes se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Datos clínicos de los 21 pacientes con CCR empleados para el análisis del secretoma soluble**

Número de paciente	Edad	Género	Longitud (cm) de la pieza tumoral	Clasificación TNM	Estadio	Localización tumoral	Grado de diferenciación tumoral
1	70	V	5.5	T3N0	IIA	colon transverso	bueno/moderado
2	51	V	6.5	T3N1	IIIB	sigmoideo	bueno/moderado
3	62	V		adenoma	adenoma	colon subtotal	adenoma tubular
4	81	M	5	T3N0	IIA	hemicolectomía derecha	bueno/moderado
5	80	V	12	T1N0	I	rectosigmoideo	bueno/moderado
6	64	M	3.5	adenoma	adenoma	sigmoideo	adenoma tubular
7	63	V	3.2	adenoma	adenoma	recto	adenoma tubular-viloso
8	73	M	5	T3N0	IIA	sigmoideo	adenoma
9	62	M	5	T3N0	IIA	sigmoideo	muscoso
10	86	M	4.5	T4N1	IV	sigmoideo	bueno/moderado
11	77	M	8	T3N0	IIA	hemicolectomía derecha	bueno/moderado
12	92	M	1.3	T2N0	I	sigmoideo	pequeño/nada
13	75	V	7	T2N0	I	colon descendente	bueno/moderado
14	72	M	5	T3N0	IIA	coecum	bueno/moderado
15	52	M	3.5	T3N0	IIA	recto	bueno/moderado
16	68	M	4.5	T3N1	IIIB	sigmoideo	bueno/moderado
17	68	M	7	T3N0	IIA	coecum	bueno/moderado
18	68	V	1.5	adenoma	adenoma	sigmoideo	adenoma tubular-viloso
19	64	V	3.5	T3N0	IIA	coecum	bueno/moderado
20	63	M	4	T3N2	IIIC	rectosigmoideo	bueno/moderado
21	86	M	3.8	TEN2M1	IV	colon ascendente	pequeño/nada

V: varón. M: mujer

## 5. Líneas celulares

Todas las líneas celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral se crecieron en medio DMEM (Biowest) suplementado con suero bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich) al 10% y penicilina/estreptomicina (Gibco) al 1%, en una atmósfera humidificada a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las líneas celulares establemente infectadas con los vectores lentivirales expresando shRNAs y la línea celular Flp- In™ 293 T-REx™ parental y establemente transfectada con distintas construcciones de PAUF, se crecieron, además de en las

condiciones anteriormente citadas, con una serie de antibióticos cuya concentración se detalla en el apartado 11.2.3.

### **5.1.Líneas celulares de CCR**

KM12C es una línea celular epitelial derivada de un carcinoma colorrectal humano en estadio B de Duke's con poca o nula capacidad metastásica (172). Presenta inestabilidad cromosómica y de microsatélites (173).

KM12SM y KM12L4 son unas líneas celulares epiteliales aisladas de la metástasis hepática producida por la inoculación de las células parentales KM12C en la pared del ciego y en el bazo de ratones "Balb/c nude", respectivamente (172, 174). Las KM12L4 son el resultado de tres rondas de inyección en el bazo y aislamiento del hígado de estos ratones. KM12SM y KM12L4 son líneas celulares altamente metastásicas. Mientras que las KM12SM solo metastatizan en hígado, las KM12L4 producen metástasis en hígado y ocasionalmente en pulmón. Ambas líneas celulares presentan inestabilidad cromosómica y de microsatélites (173).

SW480 es una línea celular epitelial tumorigénica de carcinoma colorrectal humano en estadio B de Dukes's (175).

SW620 es una línea celular epitelial de carcinoma de colon transversal humano de estadio B de Dukes's que se obtuvo de los nódulos linfáticos del mismo paciente de donde se obtuvieron las células SW480 (175). Tanto las SW480 como las SW620 presentan inestabilidad cromosómica pero no presentan inestabilidad de microsatélites.

HT-29 es una línea celular epitelial de adenocarcinoma de colon (176). Presenta inestabilidad cromosómica pero no presenta inestabilidad de microsatélites.

Colo320 es una línea celular epitelial tumorigénica de adenocarcinoma colorrectal humano de estadio C de Dukes's (177). Presenta inestabilidad cromosómica pero no presenta inestabilidad de microsatélites.

HCT116 (178-180) y RKO (178, 181) son líneas celulares epiteliales de carcinoma de colon. Presentan inestabilidad de microsatélites y no presentan inestabilidad cromosómica.

Las líneas celulares de CCR KM12C, KM12SM y KM12L4 se obtuvieron del laboratorio del Dr. Fidler (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA), y las SW480, SW620, HT-29, Colo320, HCT116 y RKO se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC).

## **5.2.Líneas celulares de cáncer de páncreas**

PANC-1 y BxPC-3 son líneas celulares epiteliales de adenocarcinoma de páncreas humano. Capan-1 es una línea celular epitelial de adenocarcinoma de páncreas humano que se obtuvo a partir de una metástasis en el hígado. Todas las líneas de cáncer de páncreas utilizadas se obtuvieron de la ATCC.

## **5.3.Otras líneas celulares**

HEK293 es una línea celular de riñón embrionario humano. Presenta alta capacidad de división y es fácilmente transfectable por diferentes métodos. Por esta razón, HEK293 y sus líneas celulares derivadas HEK293T y HEK293FT se utilizan de rutina para el empaquetamiento de retrovirus y/o lentivirus, respectivamente. Además, en esta Tesis Doctoral se ha utilizado el sistema Flp- In™ T-REx™ (Thermo Fisher Scientific) en la línea celular HEK293 para la expresión condicional de la proteína PAUF. Las líneas celulares HEK293 y sus derivadas se obtuvieron de la ATCC.

## **6. Extracción de proteínas**

### **6.1.Extracción de proteínas a partir de tejidos**

#### **6.1.1. Obtención de extractos proteicos tisulares totales para el análisis de la expresión de PAUF**

Las muestras de tejido fueron homogenizadas en un Potter-Elvehjem (VWR Internacional) con el tampón de lisis (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 1% de NP-40, 0.25% de deoxicolato sódico, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA y 10% de glicerol), con inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free. Roche) e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó 1 h a 4 °C en rotación, tras lo cual se centrifugó. El sobrenadante se recogió y la cantidad de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford.

#### **6.1.2. Obtención de secretomas de tejidos normales y tumorales**

Para obtener los secretomas de los tejidos normales y tumorales de los 21 pacientes de CCR, inmediatamente después de la cirugía, los tejidos se incubaron 1 h a 37 °C en PBS. El secretoma soluble se separó de la fracción de vesículas extracelulares utilizando el kit ME<sup>TM</sup> de aislamiento de exosomas (Nep New England) que contiene microesferas unidas al péptido Vn96, que reconoce y une con gran afinidad proteínas de choque térmico (HSP) presentes en la membrana externa vesicular. Tras incubar las muestras de secretoma con estas microesferas, la mezcla se centrifugó, lavó, y el pellet (fracción de vesicular) se separó del sobrenadante (fracción de secretoma soluble).

### **6.2.Extracción de proteínas a partir de líneas celulares**

#### **6.2.1. Obtención de extractos proteicos celulares totales**

Los extractos proteicos celulares totales a partir de líneas celulares se obtuvieron tras levantar las células con tripsina-EDTA (Gibco) durante 2 min a 37 °C. Las células

se centrifugaron a 1200 rpm en una micro-centrífuga durante 5 min y se resuspendieron en tampón de lisis (10 mM EDTA, 0.1% de NP-40, 10% de glicerol y 50 mM Tris pH 8.0) con inhibidores de proteasas y de fosfatasas. La cuantificación proteica se realizó mediante el método de Bradford tras centrifugar las muestras a 12000 x g durante 30 min a 4 °C.

### **6.2.2. Fraccionamiento celular proteico**

La fracción proteica nuclear y citoplasmática de las líneas celulares se obtuvo con el kit de fraccionamiento sub-celular de proteínas para cultivos celulares de Thermo Fisher Scientific (#78840), siguiendo las directrices del fabricante. Brevemente, las células se levantaron con PBS-EDTA durante 3 min a 37 °C, se recogieron y se centrifugaron durante 5 min a 12000 x g. El pellet celular se resuspendió en 500  $\mu$ L del tampón de lisis CEB (tampón de extracción citoplásmico) y se incubó durante 10 min a 4 °C en continua rotación. Tras ello, la mezcla se centrifugó a 500 x g durante 5 min a 4 °C para obtener el sobrenadante (fracción citoplasmática) y el pellet, al cual se le añadieron 500  $\mu$ L del tampón de lisis MEB (tampón de extracción de membrana). La mezcla se incubó durante 10 min a 4 °C y se centrifugó a 3000 x g durante 5 min a 4 °C para obtener el sobrenadante (fracción de membrana) y el pellet. A continuación, para la obtención de la fracción nuclear, el pellet resultante se resuspendió en 500  $\mu$ L del tampón de lisis NEB (tampón de extracción nuclear), se incubó durante 30 min a 4 °C en rotación y se centrifugó durante 5 min a 5000 x g para obtener el sobrenadante (fracción nuclear soluble).

### **6.2.3. Obtención de secretomas a partir de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4**

Para la obtención de secretomas a partir de líneas celulares, las células se sembraron a una densidad de  $6 \times 10^6$  células por placa p100. 24 h después, las células se lavaron con PBS para quitar los restos de suero y se cultivaron con medio DMEM sin suero durante 48 h. Tras este tiempo, el medio se recogió, se centrifugó para retirar los restos celulares y se concentró mediante columnas de ultra-centrifugación Vivaspín (Sartorius), durante 1 h a  $6000 \times g$  y a  $4^\circ\text{C}$ .

## **7. Extracción de RNA de líneas celulares**

Las células SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas en PAUF se levantaron de la placa incubándolas durante 2 min con tripsina-EDTA. Se recogieron y centrifugaron durante 5 min a  $12000 \times g$  y el precipitado se resuspendió en 1 mL de Trizol (Thermo Fisher Scientific) por cada  $5 \times 10^6$  células. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron  $200 \mu\text{L}$  de cloroformo y se volvió a incubar durante 3 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$ , se recogió la fracción acuosa donde se encuentra el RNA y se le añadió 1 volumen de etanol al 70%. Tras ello, el RNA se purificó con el kit RneasyMini (Qiagen). La concentración y la pureza del RNA extraído se midieron en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Technologies). Se consideraron válidos aquellos RNAs obtenidos con una concentración igual o mayor de  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$  y unos valores de absorbancia a  $260/280 \text{ nm}$  y  $260/230 \text{ nm}$  de en torno a 2.0-2.2.

## **8. Síntesis de DNA complementario**

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó por RT-PCR a partir de  $1 \mu\text{g}$  de RNA total de líneas celulares usando el kit Superscript III first-strand synthesis system (Thermo Fisher Scientific) con oligodT como oligonucleótido de amplificación.

Para la primera reacción de pre-incubación, se mezcló 1  $\mu\text{g}$  de RNA, 1  $\mu\text{L}$  de oligo dT, 1  $\mu\text{L}$  de 10 mM dNTPs y agua DEPC en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó durante 5 min a 65 °C e inmediatamente después se incubó 5 min en hielo. A continuación, se añadió la mezcla de síntesis de cDNA que contiene 1  $\mu\text{L}$  de tampón 10x RT, 1  $\mu\text{L}$  de 0.1 M DTT, 2  $\mu\text{L}$  de 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  de RNasa y 1  $\mu\text{L}$  de Superscript III RT, y se incubó a 50 °C durante 50 min, tras lo cual se paró a 85 °C durante 5 min. Por último, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de RNasa H y se incubó durante 20 min a 37 °C. Las concentraciones de cDNA obtenidas se midieron en el Nanodrop ND-1000.

## **9. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa**

### **9.1. PCR cuantitativa en tiempo real**

Las diferencias de expresión entre los genes analizados se evaluaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se comparó la cantidad relativa o relación del RNA mensajero (mRNA) de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo (control endógeno).

La reacción de qPCR se realizó con el FastStart Master Mix (Roche) y las sondas de la biblioteca del conjunto de sondas universales de Roche. El volumen final de cada reacción (20  $\mu\text{L}$ ) incluía 1  $\mu\text{L}$  de cDNA, 0.5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido (directo y reverso) y la mezcla de reacción del FastStart Master Mix. Las amplificaciones se realizaron en un sistema LightCycler® 480 Real-Time PCR (Roche). Cada valor se ajustó utilizando los valores de expresión de los RNAs GAPDH y 18S como referencia.

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de qPCR**

Gen	Sonda	Oligo	Secuencia	Gen	Sonda	Oligo	Secuencia
hTTK	34	Directo	ggaacgcaagagtactggaa	hCCDC99	14	Directo	acgctgaggccttaagttaa
		Reverso	gaaagttagctgggttaaatcactg			Reverso	gttgaagctttgattcagcag
hZW10	9	Directo	gccagcctaacaatagttattattcg	hSCRIB	1	Directo	ggccctgaatgatgtgtctc
		Reverso	ggtcagtgtaagtggaacaa			Reverso	gcagggacttgagcaggtt
hCDC23	44	Directo	ctggtgaaactggcaaaagc	hCSNK2A1	70	Directo	ccgcatattgtctgtgtga
		Reverso	cccacaggaatagatatcttgat			Reverso	ttgacaagccttgatagagctg
hNCAPG	77	Directo	caccagaaccaggcgaag	hPCM1	54	Directo	gttactcaacccaactgttaate
		Reverso	gaaaaactgtcttatcatccatcg			Reverso	tcttctatttctgaccacaactc
hNAP1L1	38	Directo	caggatgtatgtggccttga	hAURKA	61	Directo	cgccctgtaggatactgctt
		Reverso	tgaaaataggcttgaatgatg			Reverso	caaatatccccgactctg
hAPC	4	Directo	gctcgtactctggccactg	hCDC20	58	Directo	ctgtctgagtgccgtggat
		Reverso	gcttcatcttaactctctgttagt			Reverso	tccttgaatggggagacca
hCENPJ	2	Directo	aaagaagaaaaccgtaacctcc	hTXN	66	Directo	ttacagccgctcgtcaga
		Reverso	gttctgtcacttttcccaaca			Reverso	aaggcttcctgaaaagcagtc
hCETN2	17	Directo	caaggagttgggtgagaacc	hUBA52	65	Directo	cagcagcgtctgatatttgc
		Reverso	ccatctccatctcgtatcagc			Reverso	agggtcaggggtgactctt
hCEP192	77	Directo	aagatctgaagctcttgggtgc	hUBE2L3	18	Directo	agcagcaccaaaatccaagat
		Reverso	tctaataaaatagccaatgatggtct			Reverso	ttcgggatttcttcaagctc
hANAPC1	2	Directo	attccaacatggcagctct	hMRPL12	26	Directo	tgtgatgtctggggctgtc
		Reverso	ctttgcaccctgaaaaaga			Reverso	acggtgaaatgtgtccgttc
hSKA3	78	Directo	cctccggaagtaactaaaattcc	hNDUFAF2	55	Directo	actactacatccccagtcacaaga
		Reverso	ttggagtagctaggttgagttgtatt			Reverso	tgettctacaattctttctctcg
hDVL1	63	Directo	aagaactgtctcagcaacc	hPRDX1	20	Directo	cactgacaaacatggggaagt
		Reverso	agcttggcattgtcatcaaa			Reverso	ttgctcttttgacatcagg
hBUB1B	6	Directo	gcaggttgggaagaaag	hCASC5	59	Directo	aatcagttgggaactactagc
		Reverso	agggacatggcttactca			Reverso	tttcttactactcttctcaggt
hPUM1	1	Directo	gatgcgtttaaaggacaggt				
		Reverso	ggagtgctgtggtcagggaga				

## 9.2. PCR genómica

### 9.2.1. PCR genómica para la amplificación de los genes LOXL1 y GFP en las células HEK293 editadas con el sistema CRISPR/Cas9

Para la amplificación de los genes LOXL1 y GFP se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los nucleótidos, la enzima y el tampón del sistema Advantage® 2PCR Enzyme System (Clontech), según las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron dos tipos de oligonucleótidos directos: 5'-GGGAGCTGGGGGCCCTG-3' y 5'-GGGTGCCTGTGCGTGCTGGT-3' y uno reverso: 5'-GGGGCTGCCCACGCTGA-3' para la amplificación de LOXL1; y el oligonucleótido directo 5'-GGGACTAGCATGGAGAGCG-3' y reverso 5'-GGGTGGATGTGGAATGTGT-3' para la amplificación de GFP. Todos los oligonucleótidos fueron diseñados de acuerdo

con las directrices marcadas por LifeTechnologies. Como DNA molde se utilizó el DNA resultante del lisado y sonicado del pellet de células HEK293 control y editadas con el sistema CRISPR/Cas9.

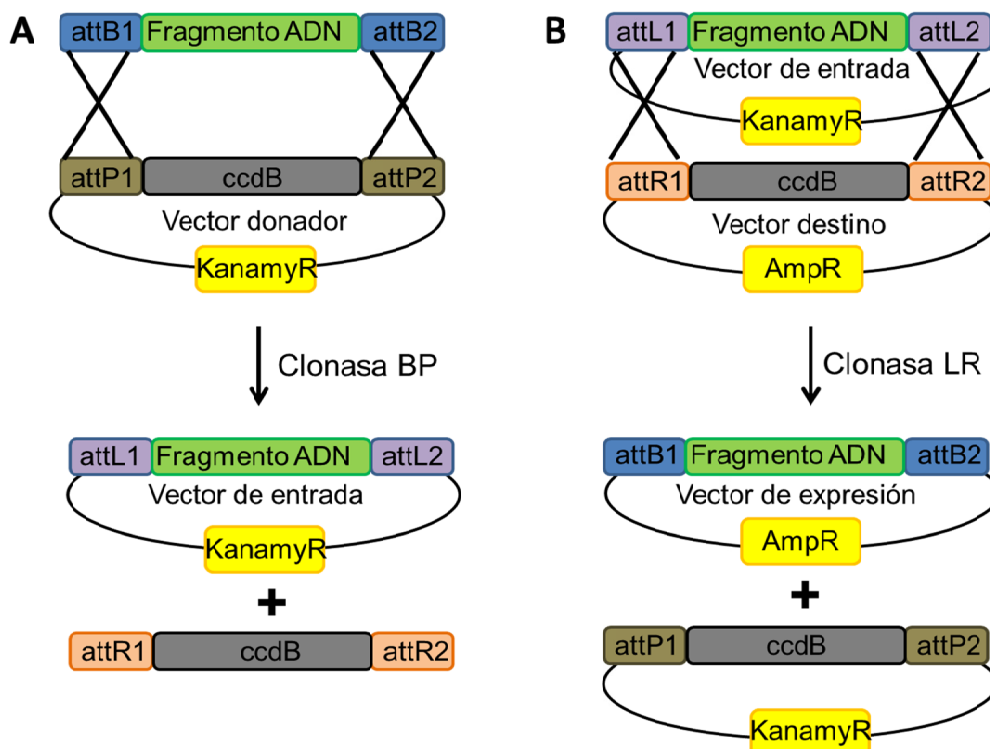
## **10. Clonaje de PAUF en el sistema Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>**

### **10.1. PCR genómica para la generación de la secuencia attB1-PAUF-attB2**

Para la generación de las construcciones de PAUF en el Sistema Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> se utilizó el sistema de clonaje Gateway®. El primer paso para iniciar el clonaje de PAUF en el vector donador mediante este sistema fue la generación de la secuencia génica attB1-PAUF-attB2. Esta secuencia se obtuvo por PCR utilizando el oligonucleótido directo (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGGGCCAGGGGGCC-3') y el oligonucleótido reverso (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGCGACCCACGGGTGAGTT-3'), ambos diseñados de acuerdo con las directrices marcadas por LifeTechnologies. Como DNA molde, se utilizaron 100 ng del vector pCMV6-AC-PAUF-GFP (OriGene Tech). De nuevo se utilizaron los nucleótidos, la enzima y el tampón del sistema Advantage® 2PCR Enzyme System.

### **10.2. Clonación por recombinación mediante el sistema Gateway®**

El sistema de clonaje Gateway® se utilizó para la generación de las construcciones de PAUF en el Sistema Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>. Este sistema es un método de clonación universal que aprovecha las propiedades específicas de recombinación del bacteriófago lambda (182) (Figura 9).



**Figura 9. Esquema del sistema de recombinación Gateway®.** A) En primer lugar se da una reacción de recombinación, catalizada por la clonasa BP, entre los sitios *attB* que flanquean el fragmento génico de interés y los sitios *attP* presentes en el vector donador y que flanquean al gen que codifica para la proteína *ccdB*, que interfiere con la DNA girasa de *E. coli* (183), inhibiendo así el crecimiento de la mayoría de las cepas de *E. coli* (por ejemplo, DH5<sup>™</sup>, TOP10). El resultado de la primera reacción de recombinación es la formación del vector de entrada que contiene el DNA de interés flanqueado por las regiones *attL*. En la segunda reacción (B), la clonasa LR cataliza la recombinación entre los sitios *attL* del vector de entrada y las regiones *attR* del vector destino. De esta manera el casete que contiene el gen *ccdB* es reemplazado por el gen de interés, generándose así el vector de expresión.

Los vectores destino utilizados fueron pDEST 5' Triple-FLAG-pcDNA5-FRT-TO y pDEST 5' BirA\*-FLAG-pcDNA5-FRT-TO, cedido por la Dra. Anne-Claude Gingras (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute. Toronto, Canadá). Los vectores de entrada con el gen que codifica para PAUF flanqueado por los sitios *attL* (*attL1*-PAUF-*attL2*) se obtuvieron por la reacción de recombinación BP entre el producto de PCR *attB1*-PAUF-*attB2* y el vector donador pDONR<sup>™</sup>221 (Thermo Fisher Scientific), utilizando la enzima recombinasa BP (Gateway Technology II. Thermo Fisher Scientific). Seguidamente, la reacción de recombinación LR se llevó a cabo entre el vector de entrada y el vector destino pDEST 5' Triple-FLAG-pcDNA5-FRT-TO o pDEST 5'

BirA\*-FLAG-pcDNA5-FRT-TO, para crear los vectores de expresión de PAUF pcDNA5-FRT-FLAG-PAUF y pcDNA5-FRT-BirA\*-FLAG-PAUF, utilizando la enzima recombinasa LR (Gateway Technology II. Thermo Fisher Scientific). Las reacciones BP y LR se llevaron a cabo durante toda la noche a 25 °C, utilizando 1  $\mu$ L de enzima y 100 ng de cada vector, en un volumen total de 5  $\mu$ L. Todas las construcciones, así como el producto de PCR attB1-PAUF-attB2, se separaron y visualizaron en un gel de agarosa y se validaron posteriormente por secuenciación.

## **11. Silenciamiento y sobre-expresión de los genes de interés en células de mamífero**

### **11.1. Transfección transitoria en células de mamífero**

#### **11.1.1. Transfección transitoria con RNAs de interferencia**

El silenciamiento transitorio de la expresión de los genes de interés en las líneas celulares HT29, Colo320, KM12L4, SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas en PAUF, se llevó a cabo mediante RNAs de interferencia (siRNAs) específicos para PAUF (siGENOME siRNA. Dharmacon), LOXL1 (Santa Cruz Biotechnologies), AURKA, UBA52 y UBE2L3 (Sigma-Aldrich). Como control, si utilizaron siRNAs inespecíficos (siRNAs *scrambled*) (Dharmacon, Santa Cruz Biotechnologies y Sigma-Aldrich). Se sembraron  $5 \times 10^5$  células con medio DMEM y 10% de suero durante 24 h y se transfectaron con 55 pmol de siRNA, 2  $\mu$ L del agente de transfección JetPrime (PoliplusTransfection) y 200  $\mu$ L de tampón JetPrime. Las células transfectadas se mantuvieron en medio DMEM y 10% de suero durante 24 o 48 h. Tras este tiempo, las células se recogieron y se sometieron a ensayos de *Western blot* (WB), ciclo celular, apoptosis, citotoxicidad, invasión, adhesión o viabilidad celular.

### **11.1.2. Transfección transitoria con DNA plasmídicos**

Se utilizaron los vectores pCMV6-AC-PAUF-GFP y pGFP-C-shLenti-PAUF C (Origene) para la expresión y el silenciamiento transitorio de PAUF, respectivamente. En ambos casos,  $5 \times 10^5$  células se sembraron en pocillos de placas p6, 24 h antes de la transfección, con medio DMEM y 10% de suero. Las células se transfectaron con 4  $\mu\text{g}$  de DNA, 8  $\mu\text{L}$  de JetPrime y 200  $\mu\text{L}$  de tampón JetPrime.

En todos los casos de transfección transitoria, los niveles de expresión de los genes de interés se analizaron 24 y 48 h después de la transfección mediante WB.

## **11.2. Transfección estable en células de mamífero**

### **11.2.1. Transfección estable para la obtención de células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF**

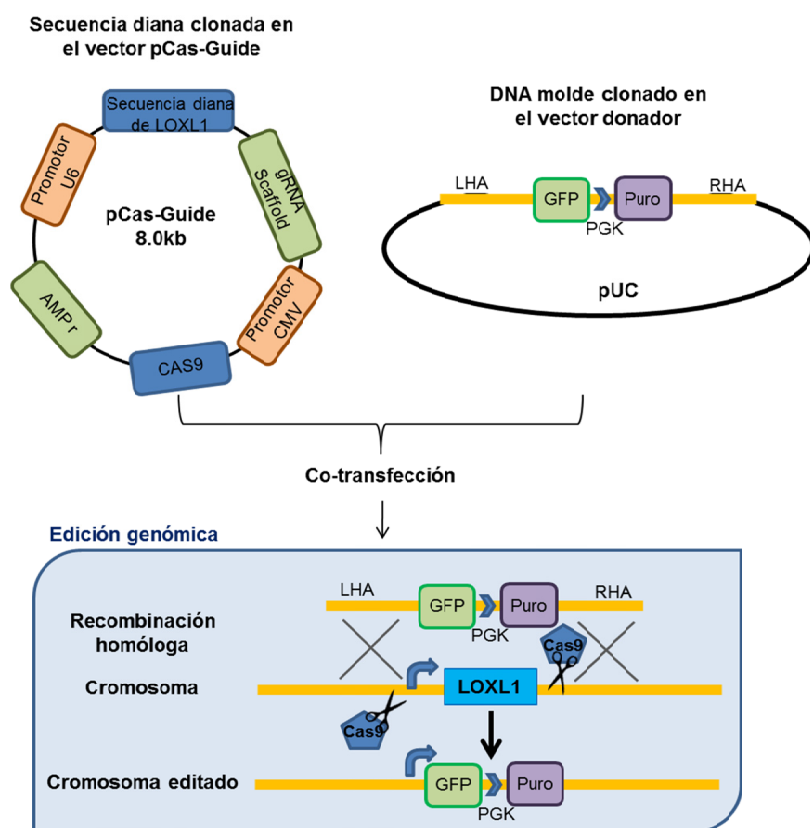
El silenciamiento estable de PAUF en las líneas celulares SW620 y KM12L4 se llevó a cabo mediante infección lentiviral utilizando los vectores pGFP-C-shLenti (Origene) conteniendo 4 shRNAs para PAUF (TL307561). Como control, se utilizó el vector pGFP-C-shLenti-scrambled Non-Effective (Origene) que contiene un shRNA que no reconoce ninguna secuencia humana.

Para generar los lentivirus, las células HEK293FT se transfectaron con los vectores empaquetadores pCMV-rev, pMDLg-pRRE y pNGVL-VSVG (AddGene), además de con los pGFP-C-shLenti-PAUF o el pGFP-C-shLenti-scrambled Non-Effective usando JetPrime. Después de incubar las células durante 12-15 h en medio libre de suero, el medio se reemplazó con DMEM al 10% de suero y antibióticos. Al día siguiente, los medios que contenían los lentivirus se centrifugaron, se diluyeron 1:2-1:10 en DMEM con 10% de suero y antibióticos, y la mezcla se añadió directamente a las células SW620 y KM12L4. 48 h después de la infección, las células infectadas con

el shRNA se seleccionaron durante 3 semanas usando 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina (Sigma-Aldrich). Una vez seleccionadas, las células se mantuvieron en cultivo con 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina.

### **11.2.2. Transfección estable para el silenciamiento de LOXL1 mediante el sistema CRISPR/Cas9**

Por otro lado, se realizó la transfección estable de las células HEK293 con los distintos plásmidos necesarios para silenciar a LOXL1 mediante el sistema CRISPR/Cas9 (Origene) (Figura 10). Brevemente,  $1 \times 10^6$  células HEK293 se sembraron en una placa p60 y 8 h después se transfectaron doblemente, usando el agente de transfección JetPrime, con 2  $\mu\text{g}$  del vector pCas-Guide (Origene) que contiene la Cas9 y el RNA guía (gRNA) para la secuencia génica de LOXL1; y 2  $\mu\text{g}$  del vector donador que contiene el DNA molde que se inserta en la zona génica donde Cas9, guiada por el gRNA, realiza la rotura de doble cadena. Este DNA molde consta de un gen de resistencia a puromicina así como del gen que codifica para GFP. 24 h después, las células co-transfectadas se seleccionaron con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina. A las 48 h de la selección con puromicina, las células se diluyeron hasta obtener clones independientes. Cada clon se creció y expandió en medio DMEM completo suplementado con 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina. Los clones positivos para el silenciamiento de LOXL1, así como los clones control (cotransfectados con el vector donador y el vector pCas-Guide que contiene un gRNA frente a una secuencia génica no codificante) se testaron por PCR y por WB.

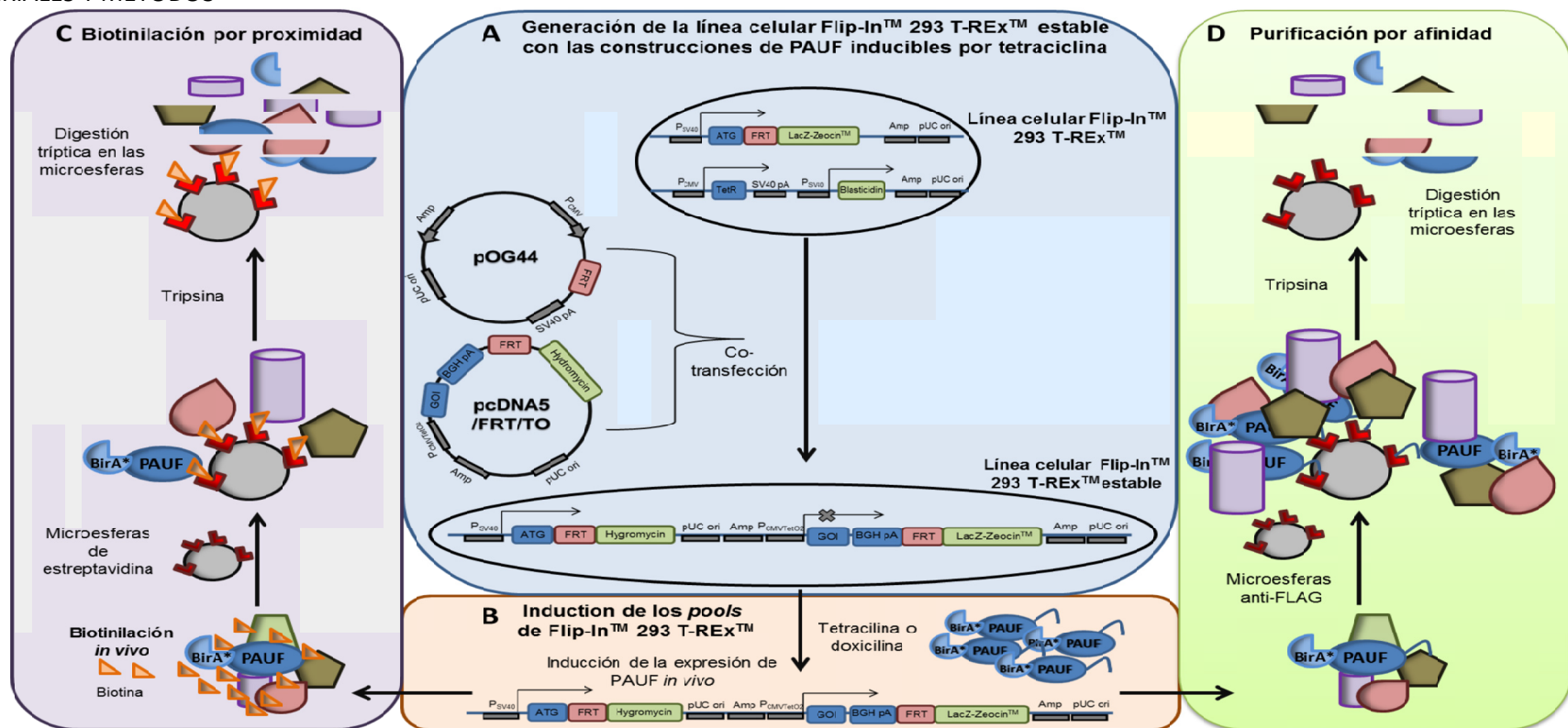


**Figura 10. Esquema del sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 (Origene).** Para obtener la línea celular HEK293 silenciada en LOXL1 se llevó a cabo la edición de su genoma mediante el sistema CRISPR/Cas9 (OriGene). Se co-transfectaron los plásmidos pCas-Guide que contienen secuencias diana dentro de la secuencia génica que codifica para la proteína LOXL1 así como el gen que codifica para la nucleasa Cas9; con el plásmido donador pUC que contiene el DNA molde que se va a insertar en el lugar donde Cas9 realiza la rotura de doble cadena, flanqueado por sitios de recombinación homóloga LHA y RHA. El resultado de la co-transfección es el corte de la secuencia génica de LOXL1 por parte de Cas9, seguido de la recombinación homóloga entre los extremos que deja el corte de Cas9 y las regiones LHA y RHA del DNA molde. Todo ello da lugar al cromosoma editado con GFP, con un gen de resistencia a puromicina y sin el gen que codifica para LOXL1.

### 11.2.3. Transfección estable para la generación del sistema Flp- In™ 293 T-REx™ de inducción de la expresión de distintas construcciones de PAUF

Por último, para la transfección estable de las construcciones de PAUF inducibles por tetraciclina o doxicilina se utilizó el sistema Flp- In™ T-REx™ integrado en las células HEK293 (Thermo Fisher Scientific). El sistema Flp- In™ 293 T-REx™ permite una rápida generación de líneas celulares estables y garantiza la expresión homogénea de la proteína de interés a partir de un vector de expresión Flp- In™ (Figura 11A).

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 11: Esquema del sistema Flp-In™ 293 T-REx™ acoplado a las técnicas purificación por afinidad y biotinilación por proximidad, para su posterior análisis por espectrometría de masas.** Para analizar el interactoma de PAUF mediante las técnicas de purificación por afinidad y biotinilación *in vivo*, en primer lugar se llevó a cabo la generación de la línea celular Flip-In™ 293 T-REx™ estable con las construcciones de PAUF inducibles por tetraciclina (A). Las células parentales Flip-In™ 293 T-REx™ contienen en su genoma un sitio FRT integrado de forma estable en un locus genómico transcripcionalmente activo, así como genes de resistencia a zeocina y a blasticidina. La co-transfección de esta línea celular con el vector pOG44 que contiene la recombinasa Flp y un vector de expresión que contiene un sitio FRT, un gen de resistencia a higromicina, así como un gen de interés (GOI, del inglés *Gene Of Interest*) cuya expresión está controlada por un promotor inducible por tetraciclina, da como resultado la integración dirigida del vector de expresión dentro del genoma de las células. (B) A continuación, la inducción de los *pools* de las distintas construcciones de PAUF integradas en la línea celular Flip-In™ 293 T-REx™ se consigue con la adición al medio de tetraciclina o doxiciclina. (C y D) En estos esquemas se muestra el proceso de purificación por afinidad (C) y biotinilación por proximidad (D) para la proteína de fusión BirA\*-PAUF-FLAG. Después de la inducción de la expresión de las construcciones de PAUF, el interactoma de PAUF se atrapa con microesferas anti-FLAG (C) o de estreptavidina (D), para su posterior digestión con tripsina y análisis de los péptidos tripticos resultantes por espectrometría de masas. En el caso de la biotinilación por proximidad, junto con la tetraciclina o doxiciclina se añade biotina, para que BirA\*, una ligasa mutada de biotina que une biotina de manera constitutiva, biotinilice a su interactoma más próximo y éste pueda ser capturado con microesferas de estreptavidina que unen biotina.

La línea celular parental Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> se creció, además de en las condiciones anteriormente citadas, con los antibióticos zeocina (Thermo Fisher Scientific), a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y blasticidina (Thermo Fisher Scientific), a una concentración de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para los que esta línea celular tiene resistencia.

Los vectores de expresión pcDNA5-FRT-FLAG-PAUF o pcDNA5-FRT-BirA\*-FLAG-PAUF se transfectaron doblemente con el vector pOG44 que codifica para la recombinasa Flp en las células Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>, usando el agente de transfección JetPrime. 24 h después, las células transfectadas doblemente se seleccionaron con 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina (Thermo Fisher Scientific). Después, las células estables Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> FLAG-PAUF y Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> BirA\*-FLAG-PAUF se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero, penicilina/estreptomicina al 1%, 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de blasticidina y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina en una atmósfera humidificada a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **11.3. Inducción de la expresión de PAUF en células Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>**

La inducción de la expresión de PAUF en las células Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> FLAG-PAUF y Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> BirA\*-FLAG-PAUF se realizó con el siguiente protocolo. Brevemente, las células se sembraron en placas de 15 cm a una confluencia aproximada del 70%. 8 h después, se indujo la expresión de PAUF con 150 ng/mL de doxiciclina (Sigma-Aldrich) durante 8 o 24 h, en función de si la estrategia a seguir para el análisis de su interactoma era la de biotilación por proximidad o purificación por afinidad, respectivamente (Figura 11B).

## 12. Biotinilación por proximidad acoplada a espectrometría de masas

La biotinilación por proximidad (BioID) acoplada a espectrometría de masas se realizó siguiendo el protocolo de Lambert JP *et al.* (142) (Figura 11C). Junto con la inducción de la expresión de PAUF con 150 ng/ml de doxiciclina, el medio de cultivo se suplementó con biotina 50  $\mu$ M (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 24 h. Las células con una confluencia de aproximadamente el 85-95% se lavaron con 5 mL de PBS y se recogieron con un rascador en 1 mL de PBS frío. Las células se centrifugaron durante 5 min a 233 x g a 4 °C. Los pellet celulares así obtenidos se lisaron con 1.5 mL de tampón RIPA frío (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% de NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% de SDS, 0.5% de deoxycolato sódico, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, inhibidores de proteasas y fosfatasas) y se incubaron durante 45 min a 4 °C en rotación. A continuación, la mezcla se sonicó, se trató con benzonasa y se centrifugó. El sobrenadante se incubó con 50  $\mu$ L de microesferas de estreptavidina-sefarosa (GE Healthcare, Cat 17-5113-01), previamente lavadas 3 veces con 1 mL de tampón RIPA, durante 3 h a 4 °C para la captura de las proteínas biotiniladas. Tras este tiempo, la mezcla se centrifugó y las microesferas se lavaron dos veces con 1 mL de tampón RIPA y una vez con 1 mL de bicarbonato amónico 50 mM (pH 8.0). Finalmente las microesferas se resuspendieron en 100  $\mu$ L de bicarbonato amónico 50 mM con 1  $\mu$ g de tripsina (Promega) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C en agitación constante en un ThermoMixer (Eppendorf). Al día siguiente, a la mezcla se le añadió 1  $\mu$ g de tripsina y se incubó durante 3 h más a 37 °C en agitación. Después, los péptidos trípticos se pasaron a un tubo limpio y las microesferas se lavaron dos veces con 100  $\mu$ L de agua de calidad HPLC. El sobrenadante resultante de los dos lavados se juntó con los péptidos recolectados anteriormente. La solución con péptidos se

acidificó con 50% de ácido fórmico (FA) hasta tener una concentración final de FA del 2%. Las muestras se secaron en el concentrador de vacío SpeedVac (Eppendorf) y se resuspendieron en 20  $\mu\text{L}$  de FA al 5% y una tercera parte se analizó en el espectrómetro de masas Q-Exactive.

### **13. Purificación por afinidad acoplada a espectrometría de masas**

#### **13.1. Purificación por afinidad de la proteína de fusión PAUF-FLAG acoplada a espectrometría de masas**

El protocolo seguido para la purificación por afinidad de la proteína de fusión PAUF-FLAG fue muy similar al utilizado para la estrategia BioID. En este caso, la inducción de la expresión de PAUF con 150 ng/ml de doxiciclina se llevó a cabo durante 8 h y las microesferas utilizadas fueron microesferas anti-FLAG (Sigma-Aldrich). El resto del protocolo seguido es idéntico al comentado anteriormente.

#### **13.2. Purificación por afinidad de la proteína LOXL1 acoplada a espectrometría de masas**

Para la purificación por afinidad de la proteína LOXL1, en primer lugar se llevó a cabo la obtención de extracto celular total de las células KM12L4 tal y como se detalló en el apartado 6.2.1. 500  $\mu\text{g}$  de extracto celular total se incubaron durante 1 h a 4 °C con 20  $\mu\text{L}$  de microesferas de proteína G sefarosa (Sigma-Aldrich), previamente lavadas 3 veces con el tampón de lisis. Tras este tiempo, la muestra se centrifugó durante 1 min a 4 °C y 1000 rpm en una microcentrífuga y las microesferas se descartaron. El sobrenadante se incubó con 50  $\mu\text{L}$  de microesferas y 3  $\mu\text{g}$  de anticuerpo anti-LOXL1 (o anticuerpo anti-IgG de ratón en el caso de la muestra control) durante toda la noche a 4 °C en rotación. Tras este tiempo, las muestras se centrifugaron, el sobrenadante se descartó y las microesferas se lavaron

dos veces con 1 mL de tampón de lisis y una vez con 1 mL de bicarbonato amónico 50 mM (pH 8.0). De aquí en adelante, el protocolo para la obtención de los péptidos trípticos pertenecientes a las proteínas del interactoma de LOXL1 y su procesamiento para ser analizados por espectrometría de masas es idéntico a los protocolos comentados en los apartados anteriores.

## **14. Inmunodetección de proteínas**

### **14.1. Anticuerpos**

#### **14.1.1. Anticuerpos primarios**

Las características de cada anticuerpo utilizado en los ensayos de WB, inmunofluorescencia (IF) o inmunoprecipitación (IP) se especifican en la Tabla 4.

Tabla 4. Listado de anticuerpos primarios

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Uso	Dilución	Especie
MTA2	Abcam	ab8106	WB	1:1000	Conejo
RhoGDI	Santa Cruz	A-20	WB	1:1000	Conejo
rhPAUF	Dr SS Kho (Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology).		WB/IF	1:1000/1:50	Conejo
$\alpha$ -tubulin	Santa Cruz	B-7	WB/IF	1:1000/1:100	Ratón
E-Cadherina	BD Biosciences	610182	WB	1:1000	Ratón
$\beta$ -catenin	Cell signaling Technology	9562	WB/IF	1:1000/1:100	Conejo
APC	Milipore	Mab3785	WB/IF	1:100/1:50	Ratón
Lamina B	Santa Cruz	C-20	IF	1:1000	Cabra
NUDC	Santa Cruz	C-3	IF	1:1000	Ratón
P53	Santa Cruz	DO-1	WB	1:1000	Ratón
LOXL1	Santa Cruz	H-11	WB/IF/IP	1:1000/1:100 /1:50	Ratón
CDH17	Santa Cruz	H-167	WB	1:1000	Conejo
Calumenina	Santa Cruz	H-40	WB	1:2000	Conejo
Lumican	Santa Cruz	H-90	WB	1:2000	Conejo
Vimentina	Abcam	ab7783	WB	1:1000	Conejo
MDH1	Sigma-Aldrich	2B11-B7	WB	1:500	Ratón
ISG15	Santa Cruz	H-150	WB	1:1000	Conejo
LAMA5	Novus	NBP1-66514	WB	1:500	Conejo
COPE	Sigma-Aldrich	SAB1101348	WB	1:2000	Conejo
ETHE1	Santa Cruz	B-12	WB	1:1000	Ratón
ITGAV	Santa Cruz	H-2	WB	1:500	Ratón
CTSA	Sigma-Aldrich	HPA031068	WB	1:1000	Conejo
Integrina- $\beta$ 1	Santa Cruz	K-20	WB	1:1000	Ratón
Paxilina	BD Biosciences	349	WB	1:500	Ratón
LEPRE	Sigma-Aldrich	3C7	WB	1:1000	Ratón
CLIC1	Sigma-Aldrich	3F9	WB	1:500	Ratón
MVP	Sigma-Aldrich	2H3-1A6	WB	1:500	Ratón
Alix	Santa Cruz	1A12	WB	1:1000	Ratón
Prohibitina	Abcam	II-14-10	WB	1:200	Ratón
CDC5L	Santa Cruz	D-11	WB	1:1000	Ratón
C-Myc	Sigma-Aldrich	9.00E+10	WB	1:1000	Ratón
UBA52	Abcam	EPR4546	WB	1:1000	Conejo
ARUKA	Santa Cruz	35C1	WB	1:1000	Ratón
TXN	Santa Cruz	3A1	WB	1:1000	Ratón
MRPL-12	Santa Cruz	397.1	WB	1:500	Ratón
NDUFAF2	Santa Cruz	H-11	WB	1:1000	Ratón
UBE2L3	Santa Cruz	E-2	WB	1:1000	Ratón
Ciclina A	Santa Cruz	BF683	WB	1:1000	Ratón
Cdc20	Santa Cruz	2F2	WB	1:1000	Ratón
PRDX1	Origene	TA324139	WB	1:500	Conejo
ZW10	Santa Cruz	3363C4a	WB/IF/IP	1:1000/1:100 /1:50	Ratón

### 14.1.2. Anticuerpos secundarios

Las características de los anticuerpos secundarios utilizados en los diferentes ensayos se especifican en la Tabla 5.

**Tabla 5. Listado de los anticuerpos secundarios**

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Uso	Dilución	Especie
anti-IgG Ratón peroxidasa	Sigma	A4416	WB/IP	1:5000/1:50	Conejo
anti-IgG Conejo peroxidasa	Sigma	A6154	WB	1:5000	Ratón
anti-IgG Cabra peroxidasa	Dako C.	P0382	WB	1:8000	Ratón
anti-IgG Conejo Alexa Fluor 488	Thermo F.	A-11008	IF	1:200	Cabra
anti-IgG Ratón Alexa Fluor 488	Thermo F.	A-11001	IF	1:200	Cabra
anti-IgG Conejo Alexa Fluor 568	Thermo F.	A-11011	IF	1:200	Cabra
anti-IgG Ratón Alexa Fluor 568	Thermo F.	A-11004	IF	1:200	Cabra
anti-IgG Ratón Alexa Fluor 647	Thermo F.	A-21235	IF	1:200	Cabra
Alexa 568 faloidina	Thermo F.	A-12380	IF	1:50	
anti-IgG Ratón True Blot	eBioscience	88-8887	WB	1:200	Ratón

### 14.2. *Western blot*

25-35  $\mu\text{g}$  de cada extracto proteico se fraccionaron en un gel monodimensional de SDS-PAGE en geles conteniendo entre un 7-12.5% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra) durante 1 h a 100 V utilizando un Mini Trans-Blot Cell (BioRad). Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios específicos mono o policlonales de las proteínas de interés durante toda la noche a 4 °C. Tras 3 lavados con Tween al 1% en PBS, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, conejo o cabra conjugados con HRP. Las membranas se lavaron 4 veces con 1% de Tween en PBS y el inmunoensayo se reveló usando SuperSignal West Pico o Femto (Pierce) dependiendo de la abundancia de la proteína en la muestra. La abundancia de las proteínas mediante *Western blot* (WB) se cuantificó mediante densitometría usando el programa de análisis Multi Gauge v3.0.

### **14.3. Microscopia confocal**

Las células se sembraron directamente en cubreobjetos recubiertos de 35-50  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:3 de Matrigel (BD Biosciences), se fijaron con 1% paraformaldehído (Sigma-Aldrich) y se permeabilizaron con 0.5% Triton X-100 en PBS. Tras ello, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos específicos y/o faloidina-FRITC durante 1 h a 37 °C. A continuación, las muestras se lavaron dos veces con 0.5% Triton X-100 en PBS durante 10 min y se incubaron durante 1 h a 37 °C con los anticuerpos secundarios correspondientes. Tras este tiempo las muestras se lavaron y se incubaron con 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich) durante 10 min para la detección de los núcleos celulares. Después de la incubación, las muestras se lavaron nuevamente y se montaron con el medio de montaje Mounting Fluorescence Medium (Dako, Copenague, Dinamarca). Las células se observaron al microscopio confocal TCS-SP5-AOBS-UV (Leica-Microsystems). Las imágenes se adquirieron con un objetivo de 63x en aceite de inmersión usando el programa Leica Confocal Soft.

### **15. Microscopía de campo claro**

Las imágenes de campo claro se obtuvieron en un microscopio de sistema invertido IX50 (Olympus) con los objetivos LCPLFL20X y LCPLFL40X. Las células en cultivo se lavaron con PBS para limpiar cualquier resto celular de la placa y se pusieron de nuevo con medio DMEM fresco, antes de tomar las fotos.

### **16. Análisis del área y diámetro nuclear y celular, y contaje celular**

El diámetro y área nuclear y celular se midieron utilizando las imágenes de microscopía con el programa libre de procesamiento de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Todos los parámetros se

midieron utilizando imágenes obtenidas a la misma escala de píxeles. El diámetro y el área nuclear y celular se calcularon en píxeles y los datos obtenidos se convirtieron en micras ( $\mu\text{m}$ ) o micras cuadradas ( $\mu\text{m}^2$ ), respectivamente. Para el conteo celular, se utilizó el *plugin* “*cell counter*” del programa ImageJ. La cuantificación de cada una de las imágenes se llevó a cabo contando un mínimo de 300 células.

## **17. Ensayos funcionales *in vitro* en las líneas celulares**

### **17.1. Análisis del ciclo celular y de la expresión celular de GFP**

Para el análisis del ciclo celular,  $3 \times 10^5$  células se fijaron con 70% de etanol durante 30 min a 4 °C. Después de la fijación, las células se lavaron con PBS con 2% de albúmina de suero bovina (BSA) y se incubaron durante 15 min con una solución de yoduro de propidio y RNAsa (PI/RNASE Solution, Immunostep) a temperatura ambiente en oscuridad. El análisis se llevó a cabo adquiriendo los datos de al menos 10.000 células por muestra, en un citómetro de flujo COULTER<sup>®</sup> EPICS<sup>®</sup> XL<sup>™</sup>, y se analizaron con el programa Flowlogic<sup>®</sup>.

Para la expresión celular de GFP, se recogieron  $3 \times 10^5$  células y se resuspendieron en 300-500  $\mu\text{L}$  de PBS frío. La mezcla se analizó en el mismo citómetro de flujo, y el contenido celular de GFP se midió excitando a las células con un láser de argón a 488 nm y recogiendo el espectro de emisión a una longitud de onda de 509 nm.

### **17.2. Adhesión celular**

Las placas de 96 pocillos se tapizaron con  $0.4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$  de Matrigel en 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.8, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, los pocillos tapizados con Matrigel se incubaron con el medio de adhesión (DMEM con 0.5%

BSA) durante 2 h a 37 °C para bloquear los sitios de unión inespecíficos. Previamente a sembrar las células en los pocillos tapizados y bloqueados, las células se mantuvieron en medio sin suero durante 5 h y se marcaron con BCECF-AM (Molecular Probes) durante 30 min a 37 °C. Tras este tiempo, se sembraron  $10^5$  células por pocillo y se incubaron durante 30 min. A continuación, las células no adheridas se eliminaron con varios lavados con DMEM. Por último, las células adheridas se lisaron con 1% de SDS en PBS y se cuantificó la fluorescencia en un Varioskan Flash Multimode Reader.

### **17.3. Invasión celular**

$8 \times 10^5$  células se resuspendieron en medio de invasión (DMEM con 0.5% de BSA) y se sembraron en cámaras de invasión Transwell (Costar) con tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ , recubiertas con 35-50  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:3 de Matrigel. En el compartimento inferior de las cámaras de invasión se añadió medio DMEM con 10% de suero. Tras 24 h, las células no invasivas se eliminaron de la superficie del filtro y las células que migraron a través del filtro se fijaron con 4% paraformaldehído, se tiñeron con cristal violeta y se contaron en el microscopio.

### **17.4. Apoptosis celular**

Las células en cultivo se levantaron con tripsina-EDTA durante 2 min a 37 °C, se centrifugaron y se resuspendieron en 0.5 mL de una solución de yoduro de propidio y RNAsa (Immunostep). Se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad, y las células positivas para yoduro de propidio se detectaron excitándolas con un láser de argón de 488 nm y recogiendo el espectro de emisión a una longitud de onda máxima de 623 nm. Los datos de al menos 10000 células por muestra se recogieron en un citómetro de flujo COULTER® EPICS® XL™ y se analizaron con el programa Flowlogic.

### **17.5. Viabilidad celular**

Se sembraron en placas de 96 pocillos 7500 células y se incubaron toda la noche a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, el medio se renovó, lo que se consideró como día 0 y las células se incubaron 72 h más a 37 °C. A continuación, el medio se renovó y las células se incubaron con 100  $\mu$ L de 3-[4,5- dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 mg/mL en DMEM durante 2 h a 37 °C. Tras este tiempo, el medio se retiró y a cada pocillo se le añadieron 200  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) para romper las células y liberar el colorante. Las lecturas se realizaron a 570 nm en un Varioskan Flash Multimode Reader.

### **17.6. Ensayos de citotoxicidad**

#### **17.6.1. Ensayo de citotoxicidad del paclitaxel**

El paclitaxel es un despolimerizador de microtúbulos, comúnmente utilizado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como el de ovario o el de mama. El paclitaxel se une a la subunidad  $\beta$  de la tubulina, estabiliza el microtúbulo polimerizado y lo protege de su despolimerización.

Para evaluar la apoptosis mediada por la sensibilidad al paclitaxel de las células silenciadas de PAUF, las células se sembraron a una densidad de 10<sup>5</sup> células por pocillo de placa p24 y se dejaron adheriendo toda la noche. Al día siguiente, se incubaron con distintas concentraciones de paclitaxel o con 0.1% de DMSO que se utilizó como control. 72 h después, las células se levantaron con tripsina-EDTA, se lavaron y se midió el número de células apoptóticas por citometría de flujo, como se describió anteriormente.

Por otro lado, para evaluar el efecto del paclitaxel sobre la tasa de proliferación de las células SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas de PAUF, se sembraron 5000 células por pocillo de placa p24 y se dejaron adhiriendo toda la noche. Al día siguiente, se incubaron con 1 nM de paclitaxel o con 0.1% DMSO. 72 h después (día 1), el medio se retiró y las células se lavaron con PBS para quitar cualquier resto de paclitaxel o DMSO. A continuación, las células se cultivaron en medio DMEM, y se contó el número de células cada 24 h desde el día 1 hasta 7 días después. Cada tratamiento se realizó al menos por triplicado.

### **17.6.2. Ensayo de citotoxicidad del peróxido de hidrógeno**

Para evaluar la apoptosis mediada por la sensibilidad al peróxido de hidrógeno de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF,  $3 \times 10^5$  células se sembraron en una placa de 24 pocillos. Después de 24 h, las células se incubaron durante 16 h en medio sin suero con distintas concentraciones de  $H_2O_2$ . Tras este tiempo, las células se recogieron y procesaron como se detalla en el apartado 17.4 para su análisis por citometría de flujo.

### **17.6.3. Ensayo de citotoxicidad del bortezomib**

El bortezomib es un medicamento utilizado actualmente para el tratamiento del mieloma múltiple. Es un inhibidor selectivo y reversible de la actividad del proteosoma 26S.

Para evaluar el efecto del tratamiento con bortezomib de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF, se sembraron  $3 \times 10^5$  células en pocillos de una placa p24. Al día siguiente, las células se incubaron con distintas concentraciones de bortezomib (Selleckchem) o con 0.005% de DMSO como

control. Tras este tiempo, las células se recogieron y procesaron como se detalla en el apartado 17.4 para su análisis por citometría de flujo.

## **18. Ensayos funcionales *in vivo* en ratones desnudos**

El comité ético del CSIC aprobó los protocolos usados para la experimentación animal de acuerdo a las normas de experimentación y bienestar animal. Todos los experimentos se realizaron en ratones inmunodeprimidos “Swiss Nude” (Charles River). Los ratones se sacrificaron usando cámaras de CO<sub>2</sub> siguiendo las normas éticas de la guía “Human End points for Animal Use in Biomedical Research (HEP)”.

### **18.1. Inyección intravenosa de células tumorales**

Para generar metástasis pulmonares, se inyectaron  $1 \times 10^6$  células KM12SM y KM12L4 en 100  $\mu$ L de PBS en la cola de los ratones. 55 días después, los ratones se sacrificaron y las metástasis pulmonares se contabilizaron y fotografiaron.

### **18.2. Xenotransplantes tumorales**

Para generar tumores subcutáneos, se inyectaron  $1 \times 10^7$  células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF en 0.2 mL de PBS con 20% de Matrigel y 0.1% de glucosa. El volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) se midió cada dos días mediante un calibre y aplicando la siguiente fórmula:  $1/2$  (ancho<sup>2</sup> x largo). Los ratones se sacrificaron a los 20 días y los tumores se pesaron y fotografiaron.

## **19. Array de hibridación genómica comparada**

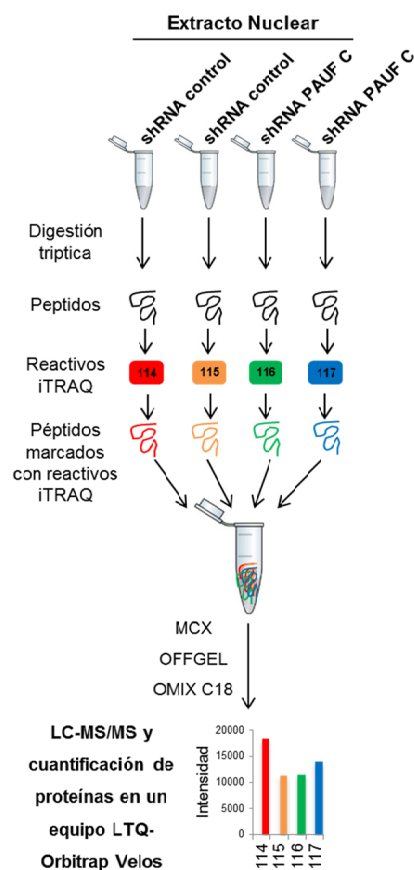
El *array* de hibridación genómica comparada (CGH, del inglés Comparative Genomic Hybridization) se llevó a cabo usando el Agilent SurePrint G3 Human CGH 60 K *microarray* (AMADID 021924 Agilent Technologies, Santa Clara, CA), que abarca la totalidad del genoma humano con una resolución media de 41 kb.

En primer lugar, 500 ng de DNA genómico de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF se marcaron diferencialmente con Cy5-dCTP y Cy3-dCTP y posteriormente se hibridaron siguiendo las directrices del fabricante. El *array* se escaneó en el equipo Agilent DNA Microarray G2565CA (Agilent Technologies), los datos se extrajeron con el programa Feature Extraction v10.7 y se visualizaron con el programa Agilent Genomic Workbench (AGW) v7.0 (Agilent Technologies). Para detectar el número de regiones alteradas se utilizó el algoritmo Aberration Detection Method 2 (ADM-2) establecido como 6, con un número mínimo de tres sondas consecutivas. Este protocolo se llevó a cabo por la Dra Sandra Rodríguez Perales (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas CNIO. Madrid. España).

## **20. Proteómica cuantitativa**

### **20.1. Obtención y marcaje isobárico por iTRAQ de los péptidos trípticos de las proteínas nucleares de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF**

Para el marcaje isobárico por iTRAQ (del inglés *Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification*) se siguió el esquema de la Figura 12.



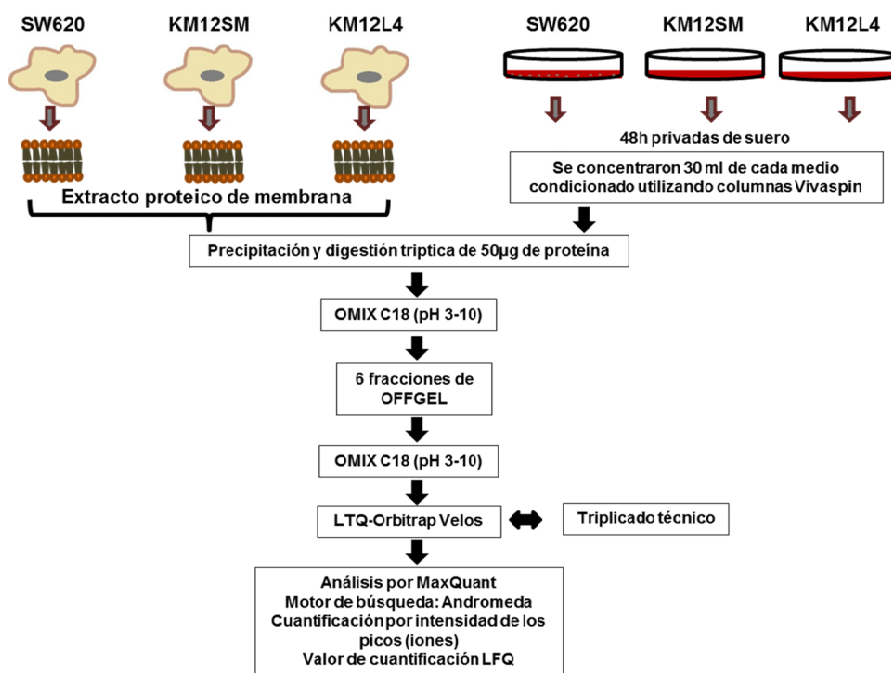
**Figura 12.** Esquema del marcado isobárico por iTRAQ de los péptidos resultantes de la tripsinización de las proteínas de la fracción nuclear de las células SW620 shRNA control y SW620 shRNA PAUF C. Cada muestra de proteínas fue digerida con tripsina y marcada con dos reporteros diferentes (con 114 y 115 las muestras control, y 116 y 117 las muestras silenciadas en PAUF). Los péptidos marcados resultantes se juntaron en una sola muestra. La mezcla se limpió con columnas MCX, se fraccionó por OFFGEL y se volvió a limpiar con columnas OMIXs. Los péptidos resultantes se secaron y se resuspendieron en una solución de 0.1% FA y 2% ACN para ser analizados por LC-MS/MS en un equipo LTQ-Orbitrap Velos.

En primer lugar, se obtuvieron los extractos nucleares de las células SW620 shRNA control y SW620 shRNA PAUF C, como se detalló en el apartado 6.2.2. A continuación, se precipitaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína de cada extracto nuclear (por duplicado) con 5 volúmenes de acetona durante 16 h a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $16000\text{ x g}$ , y el pellet resultante se resuspendió en el tampón de resuspensión del kit de iTRAQ 4-plex (Applied Biosystems) y se le añadió 0.5  $\mu\text{g}$  de caseína, 1  $\mu\text{L}$  del agente desnaturizante y 2  $\mu\text{L}$  del agente reductor y se incubó durante 1 h a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  en rotación. Tras este tiempo, a las mezclas se les añadió 1  $\mu\text{L}$  de reactivo de bloqueo de cisteína y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, las proteínas se digirieron con tripsina durante toda la noche con ligera agitación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, los péptidos se etiquetaron con los 4 marcadores (114 y 115 para las células SW620 control, y 116 y 117 para las células SW620 silenciadas en PAUF)

para tener un replicado técnico de cada muestra y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después, los péptidos marcados se mezclaron en un único tubo y la mezcla se limpió con unas columnas MCX (del inglés *Mixed-Mode Cation-eXchange*, Waters) y se secó en el concentrador de vacío SpeedVac, antes de ser fraccionada por OFFGEL (Agilent). Para ello, la muestra seca se reconstituyó en tampón de enfoque (5% de glicerol y 2% de IPG, pH 3.0-10 (GE Healthcare)) y se cargó en tiras de isoelectroenfoque de 12 pocillos (13 cm ImmobilineDryStrip, pH 3.0-10 (GE Healthcare)). Las fracciones recuperadas del OFFGEL se desalaron mediante columnas OMIXs de fase reversa C18 (Millipore), se secaron en el SpeedVac y se reconstituyeron en 5  $\mu$ L de 0.1% de FA y 2% de acetonitrilo (ACN) antes de ser analizadas en el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap.

## **20.2. Cuantificación por *label free* de las proteínas secretadas y de membrana de las células SW620, KM12SM y KM12L4**

Los secretomas y la fracción de membrana de las células SW620, KM12SM y KM12L4 se obtuvieron y concentraron como se detalló en los apartados 6.2.2 y 6.2.3, y el flujo de trabajo que se siguió se detalla en la Figura 13. De cada muestra se precipitaron 50  $\mu$ g de proteína con 5 volúmenes de acetona durante toda la noche a - 20 °C. Al día siguiente, las muestras se resuspendieron y se limpiaron con OMIXs C18. A continuación, las muestras se reconstituyeron en tampón de enfoque (5% de glicerol y 2% de IPG, pH 3.0-10 (GE Healthcare)) y se cargaron en tiras de isoelectroenfoque de 12 pocillos (13 cm ImmobilineDryStrip, pH 3.0-10 (GE Healthcare)) para ser fraccionadas por OFFGEL. De cada muestra se obtuvieron un total de 6 fracciones, cada una de las cuales se limpió nuevamente con OMIXs antes de ser reconstituidas en 5  $\mu$ L de una solución 0.1% de FA, 2% de ACN y analizadas por LC-MS/MS.

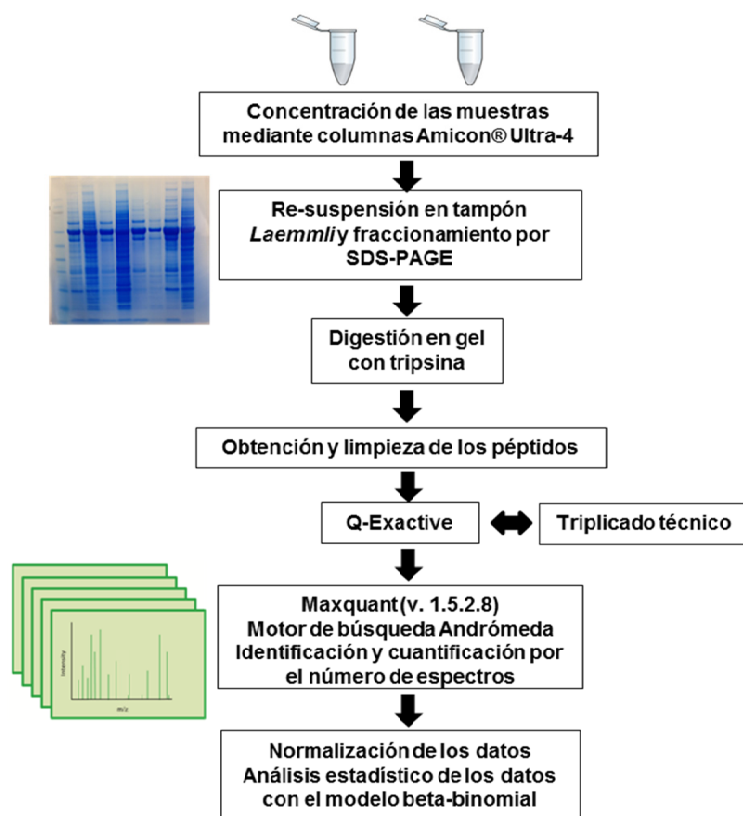


**Figura 13.** Esquema del experimento *label free* con las muestras de membrana y secretoma de líneas celulares de CCR. Las proteínas secretadas y de la fracción de membrana de las células SW620, KM12SM y KM12L4 se precipitaron con acetona y se sometieron a digestión triptica. Los péptidos tripticos resultantes se limpiaron con OMIXs y se fraccionaron por OFFGEL para su posterior identificación y cuantificación en el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos. El análisis de los espectros de masas se realizó por MaxQuant con Andromeda como motor de búsqueda. Como método de cuantificación se utilizó la intensidad de los picos. El valor normalizado de intensidad de cada proteína utilizado fue el LFQ.

### 20.3. Cuantificación por *label free* de las proteínas del secretoma soluble de los tejidos de pacientes con CCR

El secretoma soluble de 42 muestras de colon (21 normales y 21 tumorales) correspondientes a 21 pacientes con CCR se obtuvo como se detalló en el apartado 6.1.2. La obtención de los péptidos tripticos a partir de estas muestras se esquematiza en la Figura 14.

## Muestras normales y tumorales pareadas de secretoma soluble



**Figura 14. Esquema del experimento *label free* con las muestras de colon normal y tumoral de 22 pacientes con CCR.** Las proteínas del secretoma soluble de los tejidos normales y tumorales de CCR se concentraron y resuspendieron en el tampón correspondiente para su fraccionamiento por SDS-PAGE. De cada muestra se obtuvieron 5 fracciones para su posterior identificación y cuantificación en el espectrómetro de masas Q-Exactive. El análisis de los espectros de masas se realizó por MaxQuant con Andromeda como motor de búsqueda. Como método de cuantificación se utilizó el número de espectros. El análisis de los datos mediante el test beta-binomial reveló las proteínas significativamente desreguladas.

Brevemente, las muestras de secretoma soluble se concentraron utilizando columnas Amicon® Ultra-4, centrifugándose durante 40 min a 6000 x g y 4 °C. Posteriormente, las muestras concentradas se fraccionaron por SDS-PAGE en un total de 5 fracciones. La digestión con tripsina de las proteínas se llevó a cabo en el gel y los péptidos tripticos resultantes se limpiaron y resuspendieron en 0.1% de FA, 2% de ACN antes de ser analizados por LC-MS/MS. Este protocolo se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra Connie Jimenez durante la estancia predoctoral desarrollada.

#### **20.4. Análisis LC-MS/MS en el LTQ-Orbitrap Velos**

Los experimentos *label free* de las muestras procedentes de las líneas celulares y iTRAQ se realizaron en el equipo LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se pasaron por una columna C18-A1 ASY (Thermo Fisher Scientific) y a continuación se eluyeron en una columna C18 Biosphere (10 cm de longitud, 75  $\mu\text{m}$  de diámetro y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula). Tras ello, se separaron en un gradiente de 180 min de 0-35% de tampón B en tampón A (tampón A: 0.1% de FA/2% de ACN; tampón B: 0.1% de FA en ACN) con una velocidad de flujo de 300 nL/min en un nanoEasy HPLC (Proxeon) acoplado a una fuente iónica con nanoelectrospray (Proxeon). Los espectros de masas se adquirieron en un espectro de masas LTQ-Orbitrap Velos trabajando en modo positivo. Los espectros de masas correspondientes al espectro de barrido completo ( $m/z$  400-1200) se obtuvieron con una resolución de 60.000 y se seleccionaron los 15 iones más intensos para su fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID) en la trampa iónica, con la energía de colisión normalizada al 35%. Se desecharon los iones con carga única o sin asignación de carga. La ventana de exclusión dinámica tenía una duración de 30 s.

#### **20.5. Análisis LC-MS/MS en el Q-Exactive**

Los experimentos de purificación de LOXL1 y PAUF-FLAG por afinidad, los experimentos de BioID, así como el experimento *label free* de las muestras del secretoma soluble de 21 pacientes con CCR se analizaron en el espectrómetro de masas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). La separación de los péptidos se llevó a cabo en un Easy-nLC 1000 nano (Thermo Fisher Scientific). Para cada análisis, 4  $\mu\text{L}$  de cada muestra se cargaron en una precolumna Acclaim PepMap 100 (Thermo Fisher Scientific) y se eluyeron en una columna RSLC PepMap C18 de 15 cm de

longitud, 75  $\mu\text{m}$  de diámetro y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Thermo Fisher Scientific). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 300 nL/min usando 0.1% de FA en agua (tampón A) y 0.1% de FA y ACN al 100% (tampón B). Se siguió un perfil de gradiente de 0–35% de tampón B durante 90 min, 35%–100% de tampón B durante 4 min y 100% de tampón B durante 8 min. Para el experimento *label free*, el perfil de gradiente fue 0–35% de tampón B durante 120 min, 35%–100% de tampón B durante 4 min y 100% de tampón B durante 8 min. Para la ionización se utilizaron 1.800 V de voltaje y 270 °C de temperatura del capilar. Los espectros de masas correspondientes al espectro de barrido completo tenían una relación masa/carga ( $m/z$ ) 400–1500 y una resolución de 70.000 ( $m/z$  200). Se seleccionaron los 10 iones precursores más intensos para su fragmentación con una energía de colisión normalizada de 27 eV. Se desecharon los iones con carga única o sin asignación de carga. La ventana de exclusión dinámica se fijó en 30 s.

## 20.6. Análisis de los datos obtenidos mediante *label-free*

Los datos de espectrometría de masas de los experimentos *label-free* adquiridos en los equipos LTQ-Orbitrap y Q-Exactive se analizaron con Maxquant (versiones 1.5.0.0. y 1.5.2.8., respectivamente). La cuantificación se realizó por intensidad de los picos en el caso de los datos correspondientes a las líneas celulares y por conteo de espectros en el caso de los datos correspondientes a las muestras de secretoma soluble de los pacientes con CCR. En la cuantificación por intensidad de los picos, el programa determina el área de los cromatogramas iónicos y le otorga un valor normalizado denominado LFQ. Dicho valor fue el utilizado para calcular los ratios de intensidad de cada proteína entre las muestras. Los datos crudos de los espectros de masas (\*.raw) correspondientes al experimento de líneas celulares se enfrentaron a la base de datos Uniprot human reference proteome 42104 (61552 secuencias);

mientras que los datos del experimento del secretoma soluble se enfrentaron a la base de datos de Swissprot 20197\_entries.fasta (42122 secuencias). En ambos casos, la tolerancia para el ion parental se fijó en 10 ppm y 0.5 Da para los iones producto.

#### **20.6.1. Análisis de los datos obtenidos mediante iTRAQ**

Los datos crudos obtenidos del experimento de iTRAQ adquiridos en el LTQ-Orbitrap se analizaron con Proteome Discoverer (version 1.4.0.288) (Thermo) y se enfrentaron a la base de datos Uniprot Human Reference Proteome 42104 (61552 secuencias). De nuevo, la tolerancia para el ion parental se fijó en 10 ppm y 0.5 Da para los iones producto. La carbamidometilación de cisteínas se estableció como modificación fija y la oxidación de metionina y la acetilación N-terminal se establecieron como modificaciones variables.

#### **20.6.2. Análisis de los datos obtenidos en los experimentos de purificación de PAUF-FLAG y LOXL1 por afinidad y de BioID**

Los datos de espectrometría de masas adquiridos en el Q-Exactive se analizaron con el Proteome Discoverer (version 1.4.0.288) (Thermo) utilizando los protocolos estandarizados. Los archivos de espectros se enfrentaron a la base de datos SwissProt 57.15 (20266 secuencias) utilizando MASCOT (version 2.3, Matrix Science) como motor de búsqueda. En los parámetros de búsqueda, la carbamidometilación de cisteínas se estableció como modificación fija y la oxidación de metionina y la acetilación N-terminal se establecieron como modificaciones variables. La tolerancia de la selección de los precursores y los iones producto se fijó en 10 ppm y 0.02 Da, respectivamente. La identificación de los péptidos se validó mediante el algoritmo Percolator usando un valor  $q \leq 0.01$  (184).

## 21. Herramientas bioinformáticas

Las proteínas identificadas y cuantificadas en los estudios de proteómica se analizaron mediante biología de sistemas usando el programa STRING v 9.0 ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)) (185) con el fin de obtener la predicción de las funciones biológicas y el análisis de las interacciones proteicas. STRING es una base de datos que recoge las interacciones de proteínas conocidas y previstas, incluidas las asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) derivadas de la genómica, de experimentos de alto rendimiento, de co-expresión y de conocimientos previos publicados. En todos los casos se aplicó un filtro de alta confianza (0.600). En algunos casos, para la visualización de los datos y el análisis de las interacciones se utilizó la plataforma Cytoscape ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org)). Además, se obtuvo información complementaria de las proteínas estudiadas en la base de datos Genecards del instituto de ciencias Weizmann Place, que aporta información a nivel genético, transcriptómico y proteómico de todos los genes descritos o predichos del ser humano (186). La expresión relativa de los genes de interés, tanto a nivel de mRNA como de proteína, se obtuvo de la base de datos Oncomine (Universidad de Michigan), que recoge información de múltiples experimentos de expresión de mRNA mediante microarrays (187, 188), y del Human Protein Atlas que contiene datos de inmunohistoquímica para diferentes anticuerpos de la misma proteína en diferentes tejidos normales y patológicos (189). Por otro lado, se utilizó la base de datos cBioportal (Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSK), Nueva York, Estados Unidos), que presenta de una manera gráfica y accesible los datos experimentales de estudios de secuenciación masiva y/o expresión de mRNA o proteína en distintos tipos tumorales obtenidos por el consorcio “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) (National Cancer Institute (NCI) y National Human

Genome Research Institute (NHGRI)) (190). Además, el programa Funrich (191) se utilizó como herramienta de análisis de enriquecimiento funcional.

El análisis de la localización celular de las proteínas de interés se realizó utilizando los programas SignalP (version 4.1, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (192), que identifica las proteínas que tienen secreción clásica, así como el SecretomeP (version 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), capaz de discriminar el tipo de secreción (clásica o no clásica) de las proteínas (193). También se utilizaron los datos recogidos en la base de datos de Vesiclepedia (194), para identificar las proteínas que se han descrito previamente como proteínas extravesiculares. Para el análisis *in silico* de la localización nuclear de PAUF se utilizaron los programas: NLStradamus (Toronto's University) (195), Epiloc (Queen's University) y Phobius (Stockholm Bioinformatics Center).

## **22. Análisis de supervivencia**

Para validar los posibles biomarcadores del CCR seleccionados en los experimentos de proteómica cuantitativa, se realizaron análisis de supervivencia, utilizando la base de datos GSE17538, que recoge los datos clínicos y de expresión génica, de 232 pacientes con cáncer de colon. El cálculo de la supervivencia se llevó a cabo mediante el método de Kaplan-Meier (196), usando el paquete estadístico SPSS v.11.5 (Chicago Illinois, EE.UU.). Para eliminar las variaciones técnicas entre los conjuntos de datos, los niveles de expresión para todas las sondas dentro de cada muestra (paciente), se transformaron a un valor *z-score*. El *z-score* se obtuvo restando la intensidad media de todas las sondas a cada valor de expresión y dividiendo esta diferencia por la desviación estándar de todas las intensidades. Posteriormente, se obtuvieron los ratios *z-score* restando el *z-score* promedio de toda la cohorte a cada *z-score* individual y dividiendo el resultado por la desviación

estándar de los *z-score* (197). Un valor positivo o negativo de *z-score* ( $> 0$  o  $< 0$ , respectivamente) indica un mayor o menor nivel de expresión de estas proteínas. De esta manera, los pacientes se dividieron en pacientes con "baja expresión" (aquellos que presentaban un score  $z < 0$ ) y pacientes con "alta expresión" (aquellos que presentaban un score  $z > 0$ ) de cada proteína de interés.

### **23. Análisis estadístico**

Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes y, al menos, por triplicado. La evaluación de la significancia estadística entre grupos se calculó utilizó la prueba t de Student (para dos condiciones) o el test de ANOVA (para más de dos condiciones). Para los datos de variables discretas, como el número de células en mitosis o fuera de mitosis, se utilizó el test  $\chi^2$ . Para la evaluación de la significancia estadística de la diferencia de expresión de una proteína entre dos grupos en el experimento *label free* de las muestras de secretoma soluble, se realizó un test beta binomial, previamente identificado como el test más óptimo para calcular la significatividad de la desregulación de una proteína entre dos grupos (198). Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra Connie Jimenez. Por último, la significancia de los datos de las curvas de supervivencia se calculó mediante el test de rangos logarítmicos (*log-rank test*). En todos los casos, los p-valores inferiores a 0.05 se consideraron significativos, los p-valores inferiores a 0.01 muy significativos y muy altamente significativos los p-valores inferiores a 0.001.



## **RESULTADOS**



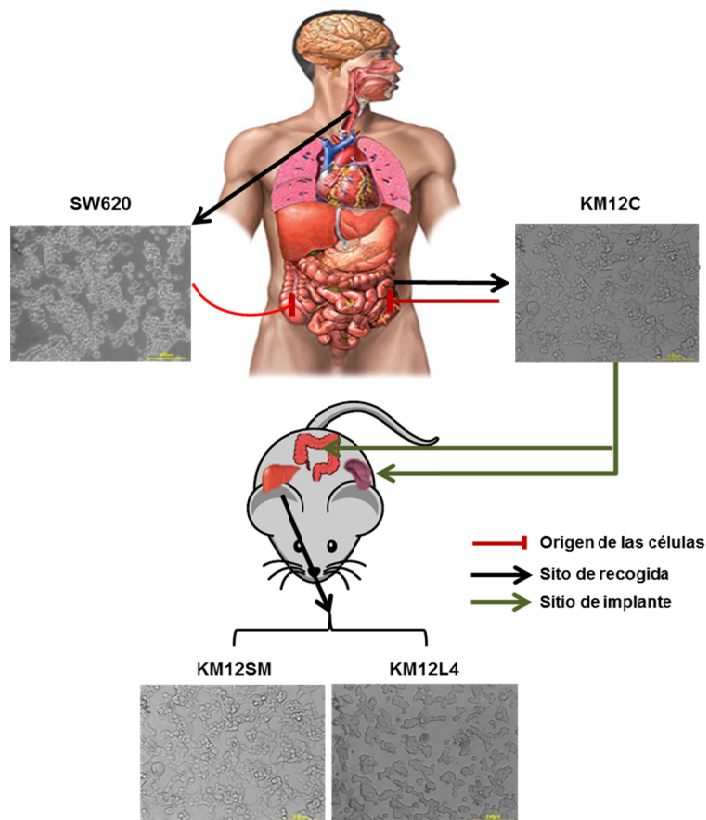
## **24. Nuevos biomarcadores de pronóstico o diagnóstico y nuevas dianas terapéuticas de la metástasis del CCR**

El objetivo del primer bloque de esta Tesis Doctoral fue caracterizar los mecanismos implicados en el desarrollo de la metástasis del CCR, con el fin de encontrar nuevos biomarcadores de pronóstico o diagnóstico, así como nuevas dianas terapéuticas de la metástasis de esta enfermedad. Para ello, se llevaron a cabo técnicas de proteómica cuantitativa libre de marcaje (*label free*) y se centró el análisis en las fracciones proteicas de membrana (fuente de potenciales dianas terapéuticas) y del secretoma (fuente de potenciales biomarcadores) de una serie de líneas celulares de CCR, así como de un total de 42 muestras pareadas de tejidos de colon normal y tumoral de pacientes con CCR.

### **24.1. Proteómica cuantitativa *label free* de las fracciones de membrana y secretoma de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4**

Como modelo para el estudio de los mecanismos implicados en la metástasis del CCR, se utilizaron tres líneas celulares humanas de CCR con distinta capacidad metastásica: las SW620, aisladas de ganglio linfático, y dos líneas celulares de CCR seleccionadas en ratones atímicos: KM12SM (que generan metástasis en hígado) y KM12L4 (que generan metástasis en hígado y en pulmón) (172) (Figura 15).

Las células SW620, de baja capacidad metastásica, solo son capaces de infiltrar ganglios linfáticos, mientras que las células KM12SM y KM12L4, de alta capacidad metastásica, son capaces de colonizar órganos. El estudio y comparación de las fracciones de secretoma y de membrana de estas líneas celulares podría explicar la diferencia que existe en su capacidad metastásica.



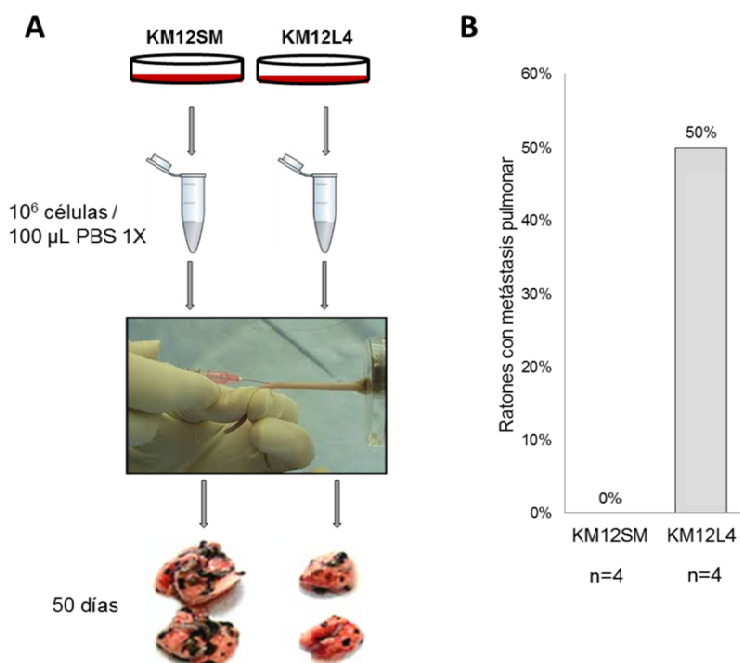
**Figura 15. Esquema del modelo experimental utilizado para la caracterización de la metástasis del CCR.** La línea celular SW620 se obtuvo a partir de las células tumorales presentes en un ganglio linfático del mismo paciente con adenocarcinoma colorrectal primario (estadio Dukes C) del que se obtuvieron las células SW480. Las células altamente metastásicas KM12SM y KM12L4 derivan de la línea celular parental KM12C. KM12C es una línea celular derivada de un carcinoma de colon en estadio B de Dukes. Las células KM12C se implantaron en el bazo o en el ciego de ratones desnudos y las metástasis hepáticas originadas (experimental y espontánea, respectivamente) se aislaron y pusieron en cultivo dando como resultado la obtención de las líneas celulares KM12L1 y KM12SM, respectivamente. Las células KM12L1 se pincharon de nuevo en el bazo y se recogieron del hígado durante 3 rondas, obteniéndose finalmente la línea celular KM12L4. En rojo se representa el origen de las células, en negro el sitio de recolección y en verde el lugar de implante.

### 24.1.1. Comparación de la capacidad metastásica de las células KM12SM y KM12L4 a pulmón de ratones atímicos desnudos

Se había descrito que las células KM12L4 tenían mayor capacidad para metastatizar a pulmón que las células KM12SM (172). Este resultado se confirmó mediante un experimento de formación de metástasis pulmonar, inyectando 1 millón de células KM12SM y KM12L4 en la cola de ratones desnudos (“Swiss Nude”) (Figura 2A).

La mitad de los ratones inyectados con células KM12L4 tenían metástasis pulmonar. Sin embargo, ninguno de los ratones a los que se les inyectaron células

KM12SM presentaron metástasis pulmonar (Figura 16B). Estos resultados corroboraron la capacidad única de las células KM12L4 de metastatizar a pulmón.



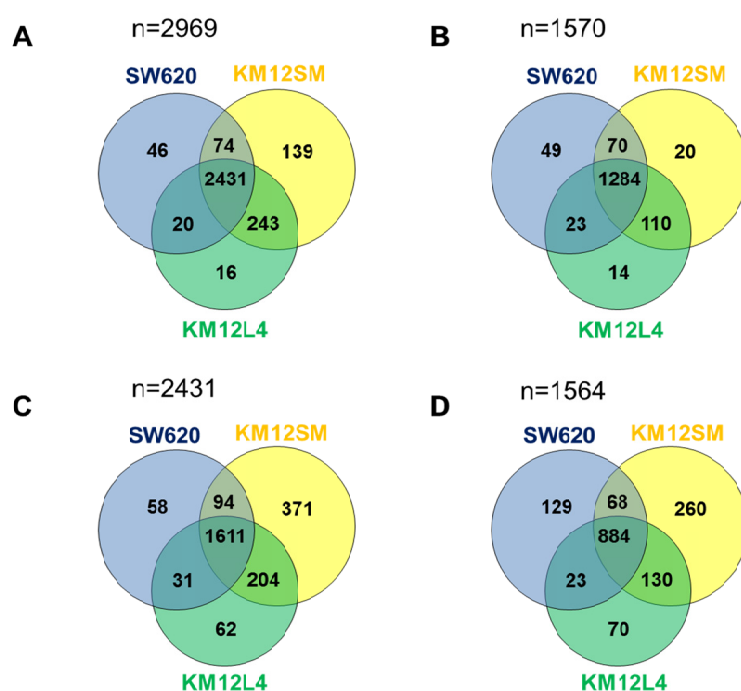
**Figura 16. Estudio comparativo de la capacidad de las células KM12SM y KM12L4 de metastatizar a pulmón.** A) Esquema del experimento de formación de metástasis pulmonar. 10<sup>6</sup> células KM12SM y KM12L4 se pincharon en la cola de ratones desnudos (4 ratones por cada tipo celular) y 50 días después los ratones se sacrificaron, se obtuvieron sus pulmones y se analizó la presencia o ausencia de metástasis. B) Representación gráfica de los resultados obtenidos. El 50% de los ratones inyectados con células KM12L4 presentó metástasis pulmonar. Por el contrario, ninguno de los 4 ratones inoculados con células KM12SM tuvo metástasis pulmonar.

#### 24.1.2. Resultados del análisis mediante espectrometría de masas

Las fracciones proteicas de membrana y del secretoma de las tres líneas celulares se obtuvieron como se detalla en los apartados 6.2.2 y 6.2.3. Las proteínas de ambas fracciones se procesaron y analizaron como se describe en el apartado 20.2. Brevemente, 50 μg de proteína de cada fracción, de cada línea celular se digirieron con tripsina y los péptidos se separaron mediante OFFGEL en un total de 6 fracciones, cada una de las cuales se analizó por triplicado en el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap (Figura 5).

En el análisis de la fracción de membrana de las tres líneas celulares, se identificaron un total de 2.969 proteínas y se cuantificaron 2.431 (Tabla

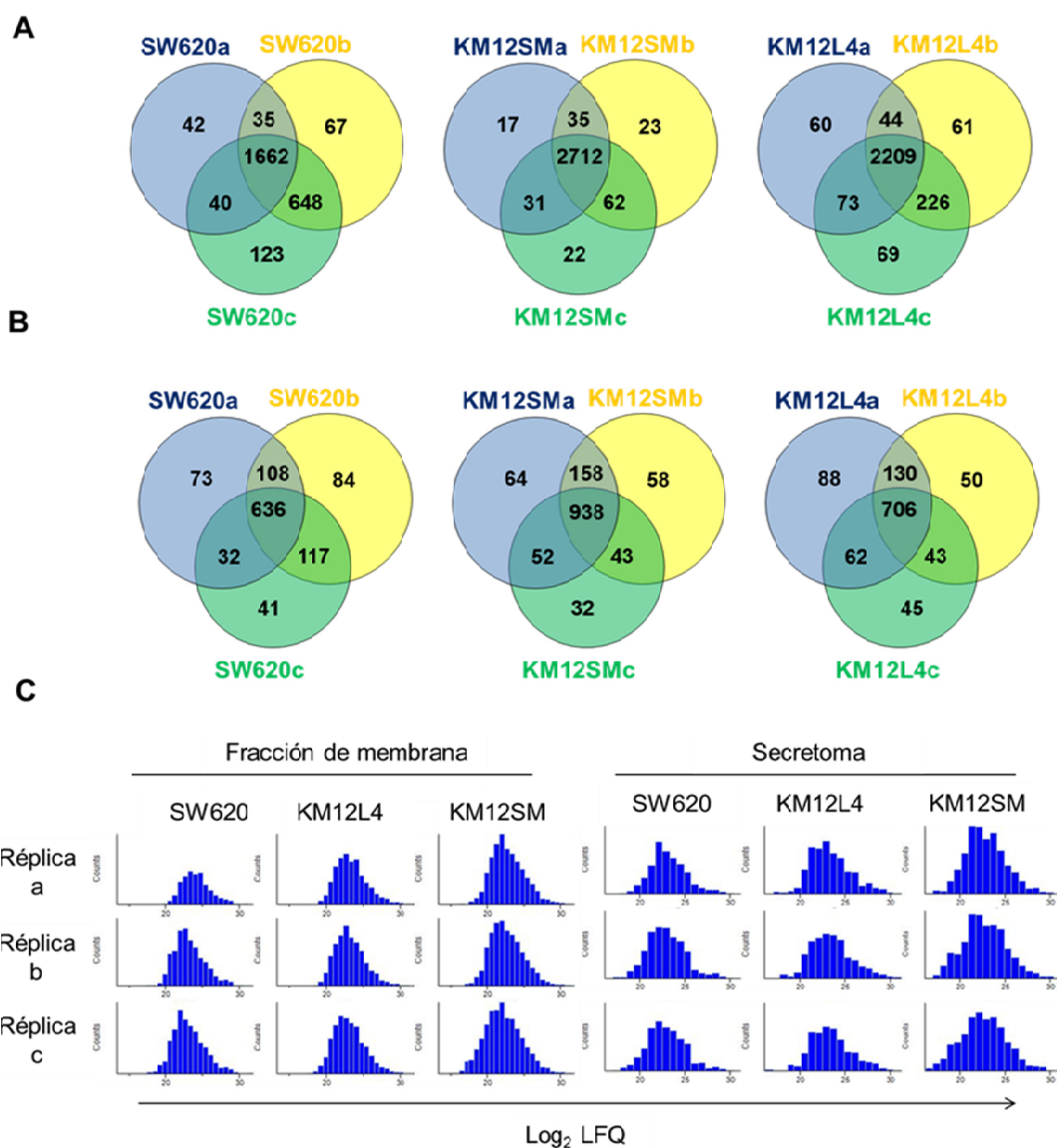
Suplementaria 1, anexo). Por otra parte, en la fracción del secretoma de las tres líneas celulares se identificaron un total de 1.570 proteínas, 1.564 de las cuales también se cuantificaron (Tabla Suplementaria 2, anexo). De las proteínas totales identificadas en la fracción de membrana, 2.431 se identificaron y 1.611 se cuantificaron comúnmente en las tres líneas celulares (Figura 17A y C). En el secretoma, de todas las proteínas totales identificadas, 1.284 se identificaron comúnmente en las tres líneas celulares, mientras que 884 proteínas cuantificadas fueron comunes en las tres líneas celulares (Figura 17B y D). Además, en ambas fracciones aparecieron proteínas identificadas de manera exclusiva en una línea celular.



**Figura 17. Análisis general de los resultados de identificación y cuantificación proteica obtenidos por espectrometría de masas.** Representación mediante diagramas de Venn de las proteínas comúnmente identificadas (A y B) y cuantificadas (C y D) en las fracciones de membrana (A y C) y secretoma (B y D) de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4.

#### 24.1.2.1. Análisis de la calidad de los triplicados

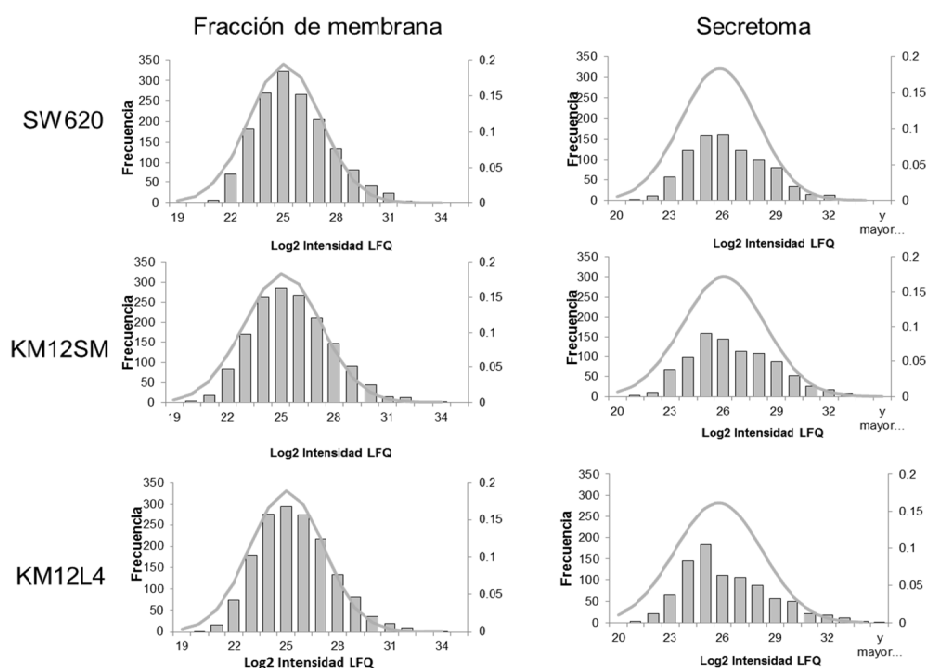
A continuación, se analizó la reproducibilidad de los triplicados de las muestras correspondientes a las fracciones de membrana y secretoma de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4 (Figura 18).



**Figura 18. Análisis de la calidad de los triplicados a nivel de identificación y cuantificación proteica.** (A y B) Representación, mediante diagramas de Venn, de las proteínas comúnmente identificadas en la fracción de membrana (A) y en el secretoma (B) de cada uno de los triplicados (a, b y c) de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4. C) Histogramas de frecuencias de la intensidad de las proteínas cuantificadas en cada uno de los triplicados analizados, representada como el log<sub>2</sub> del valor LFQ.

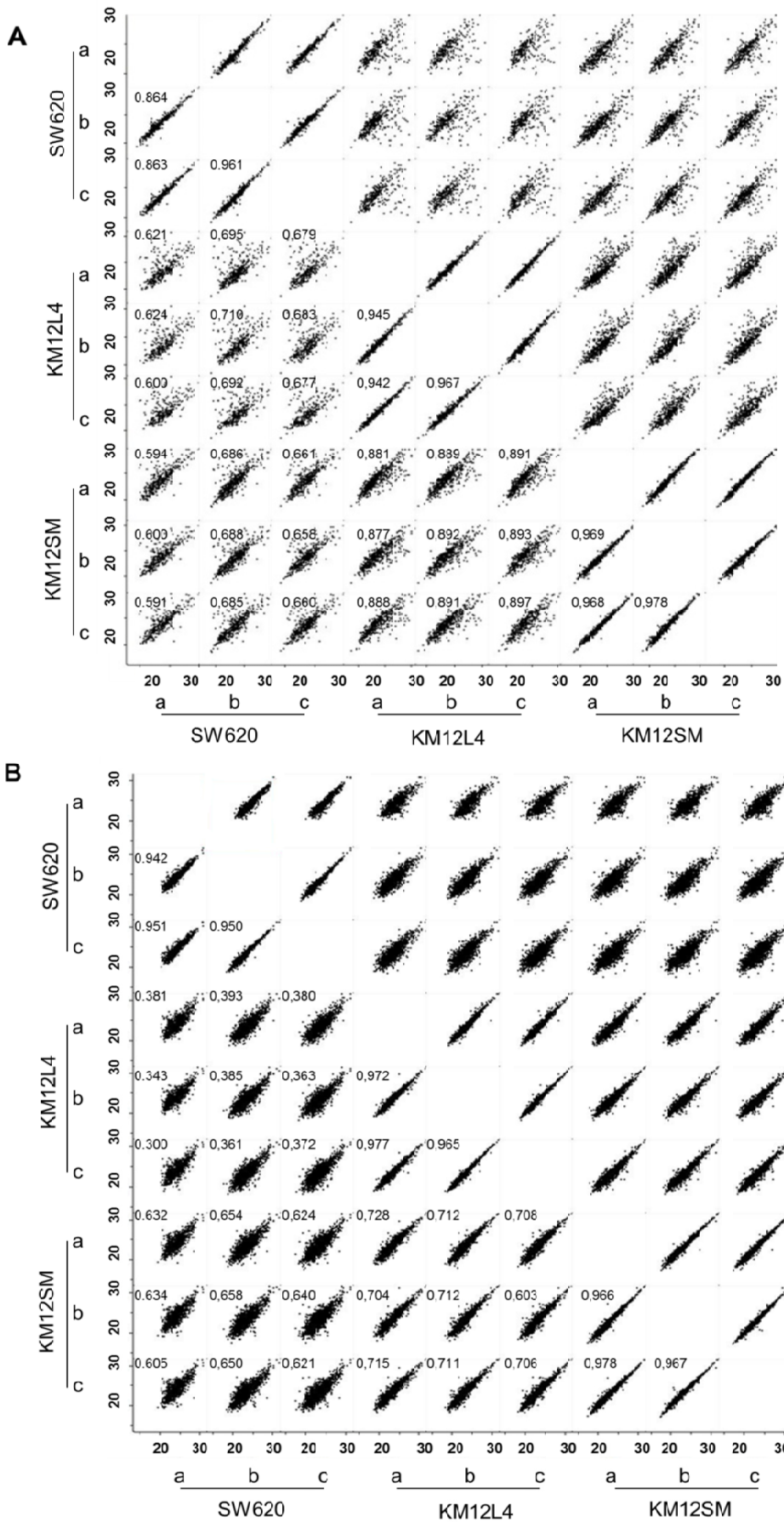
La mayoría de las proteínas identificadas fueron coincidentes en las tres réplicas (a, b y c) de cada fracción, de cada línea celular (Figura 4A y B). Por otra parte, los histogramas de las distribuciones de los valores de LFQ transformados con log<sub>2</sub> de las proteínas cuantificadas en cada triplicado, mostraron una distribución muy similar, que en todos los casos siguió un patrón de distribución normal y centrada en torno a un valor de LFQ transformado de 25 (Figura 18C).

Además, el análisis, mediante histograma de frecuencias, de la distribución de los valores de LFQ transformados de las proteínas cuantificadas comúnmente en los tres triplicados de cada fracción, de cada línea celular, confirmó la distribución normal de los datos centrada en torno a un valor de 25 (Figura 19).



**Figura 19. Análisis de la distribución de las intensidades de las proteínas cuantificadas en las fracciones de membrana y secretoma de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4.** Se representa, mediante histogramas de frecuencias, la distribución de las intensidades LFQ en cada una de las fracciones analizadas, así como la distribución teórica normal (mediante líneas) en cada uno de los casos.

Por último, la comparación del valor LFQ de cada una de las proteínas cuantificadas entre todos los triplicados y el análisis de la correlación lineal entre cada una de las comparaciones mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson y del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), reveló una alta reproducibilidad de los datos cuantitativos obtenidos (Figura 19). En todos los casos en los que se comparó la correlación lineal entre los triplicados (a, b y c) dentro de una misma muestra, se obtuvo un valor de  $R^2$  de aproximadamente 1.



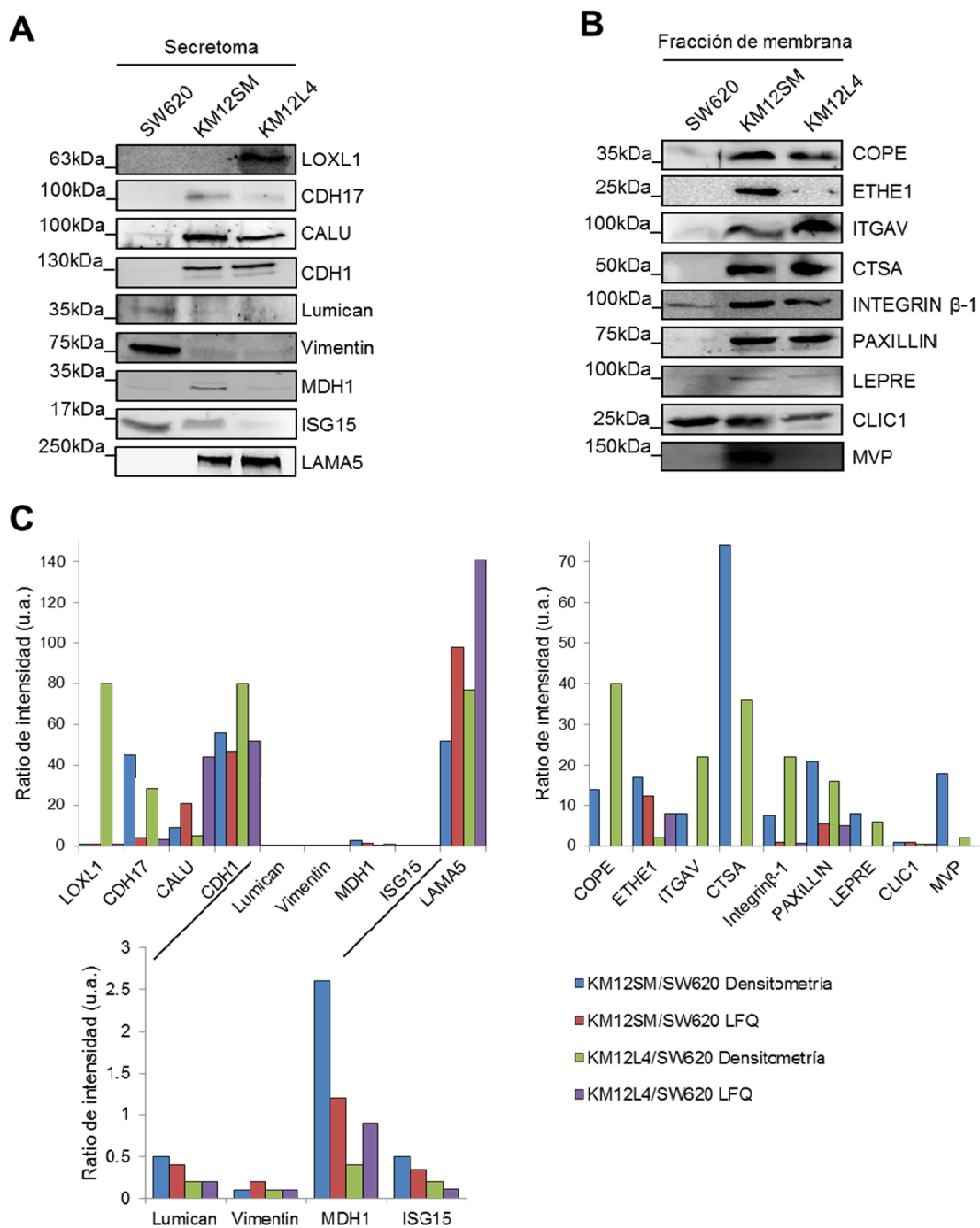
**Figura 19. Análisis de la calidad de los triplicados.**

El estudio de la calidad de los triplicados analizados por espectrometría de masas se analizó mediante el cálculo del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y del coeficiente de correlación de Pearson, entre cada uno de los triplicados. En esta Figura se muestran diagramas de dispersión, donde los ejes “x” e “y” representan el  $\log_2$  del valor de intensidad LFQ de todas las proteínas cuantificadas en cada triplicado (a, b y c), de cada muestra analizada (SW620, KM12SM y KM12L4) tanto en la fracción de membrana (A) como en el secretoma (B). Se muestra además el valor del estadístico  $R^2$  de cada una de las comparaciones.

En base a todos estos resultados, fue posible afirmar la confianza del enfoque cuantitativo de los datos obtenidos.

### **24.1.2.2. Validación ortogonal mediante WB de los datos cuantitativos obtenidos**

Con el objetivo de validar de manera ortogonal los datos de cuantificación obtenidos mediante espectrometría de masas, se seleccionaron para su análisis mediante WB, nueve proteínas de cada fracción expresadas diferencialmente entre las tres líneas celulares (Figura 20). Se cuantificó la intensidad de las bandas del WB mediante densitometría óptica y se calcularon los ratios de expresión de cada una de las proteínas entre las células KM12SM y SW620 (KM12SM/SW620) y entre las células KM12L4 y SW620 (KM12L4/SW620). La comparación de los ratios de expresión de todas estas proteínas obtenidos mediante densitometría óptica y mediante espectrometría de masas se representan en la Figura 20C. Como se observa, en todas las proteínas analizadas los ratios de expresión KM12SM/SW620 y KM12L4/SW620 analizados por ambas técnicas siguieron la misma tendencia. En ocasiones, alguno de estos ratios, a pesar de seguir la misma tendencia (por ejemplo, aumentar), mostraron gran diferencia de intensidad. Este es el caso, por ejemplo, de la proteína LAMA5, cuyo valor de intensidad KM12SM/SW620 valorado mediante espectrometría de masas es 100, y 50 si se considera el ratio KM12SM/SW620 analizado mediante densitometría óptica.

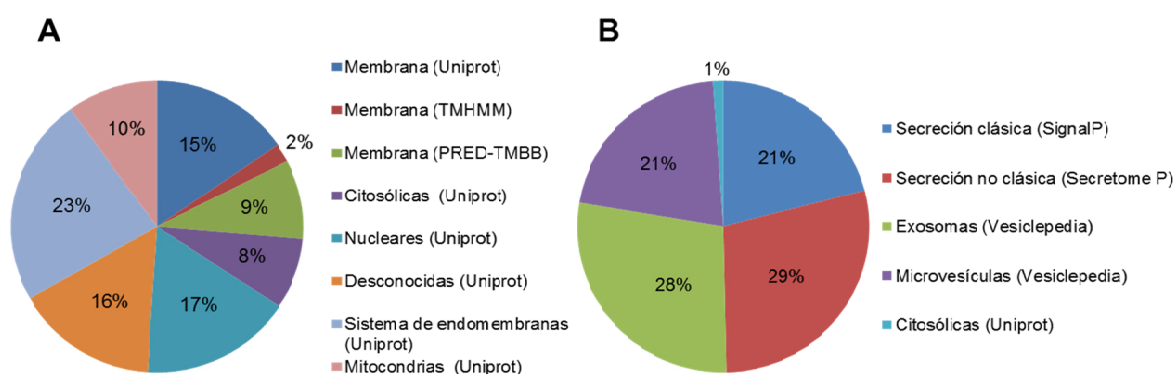


**Figura 20. Validación ortogonal de la cuantificación proteica por proteómica cuantitativa label free mediante WB.** (A y B) El nivel de expresión de 18 proteínas identificadas en las fracciones de membrana y secretoma de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4 se examinó por WB. 30 $\mu$ g de proteína de cada fracción celular se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se sometieron a transferencia utilizando anticuerpos específicos frente a cada una de las proteínas seleccionadas. C) La intensidad de las bandas se cuantificó mediante densitometría óptica y los ratios de expresión de cada una de las proteínas entre las células KM12SM y KM12L4 con respecto de las células SW620, valorados por densitometría óptica y por espectrometría de masas (LFQ) se representaron mediante diagramas de barras.

En resumen, los resultados obtenidos mediante WB fueron consistentes con los datos de cuantificación obtenidos mediante espectrometría de masas.

### 24.1.2.3. Análisis *in silico* de la localización celular de las proteínas identificadas

Con el fin de evaluar la calidad de los resultados, se corroboró el enriquecimiento en cada una de las fracciones estudiadas mediante el análisis *in silico* de la localización celular de todas las proteínas identificadas (Figura 21).



**Figura 21. Análisis de la localización celular de las proteínas identificadas en las fracciones de membrana y secretoma de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4.** Representación de la localización celular de las 2969 proteínas identificadas en la fracción de membranas (A) y de las 884 proteínas cuantificadas en el secretoma (B) de las tres líneas celulares estudiadas. La localización de las proteínas se analizó mediante la base de datos Uniprot y la predicción de las proteínas de membrana y secretadas se realizó con los programas TMHMM y PRED-TMBB; y SignalP, SecretomeP y Vesiclepedia, respectivamente.

El análisis de la localización celular de las proteínas pertenecientes a la fracción de membrana reveló que el 15% de las proteínas identificadas se describen como proteínas de membrana en la base de datos de Uniprot (199). A continuación, se llevó a cabo el análisis de la predicción de motivos estructurales típicos de proteínas de membrana en las 2510 proteínas restantes que no se habían identificado como proteínas de membrana. Para ello se utilizaron los programas TMHMM (v. 2.0), que predice la presencia de hélices- $\alpha$  transmembrana en la secuencia aminoacídica de interés (200, 201) y PRED-TMBB (202), que predice la presencia de motivos tipo barril- $\beta$ . Mientras que las proteínas integrales de la membrana interna presentan generalmente en su estructura hélices- $\alpha$  hidrófobas, la mayoría de las proteínas integrales de la membrana externa poseen motivos estructurales

barriles- $\beta$  consistentes en hebras  $\beta$  anfipáticas y antiparalelas (203). Por lo tanto, ambos motivos estructurales se encuentran típicamente en proteínas de membrana y su presencia en una secuencia aminoacídica puede denotar su localización de membrana. El 2% de las proteínas se predijo como proteínas con estructuras hélices- $\alpha$  transmembrana y el 9% se predijo como proteínas con motivos barril- $\beta$  de localización de membrana. Además, el 23% y el 10% de las proteínas pertenecen al sistema de endomembranas y a las mitocondrias, respectivamente, fracciones que también se enriquecen con el kit de fraccionamiento celular utilizado. Cabe destacar que el 16% de las proteínas tenían localización celular no descrita hasta ese momento.

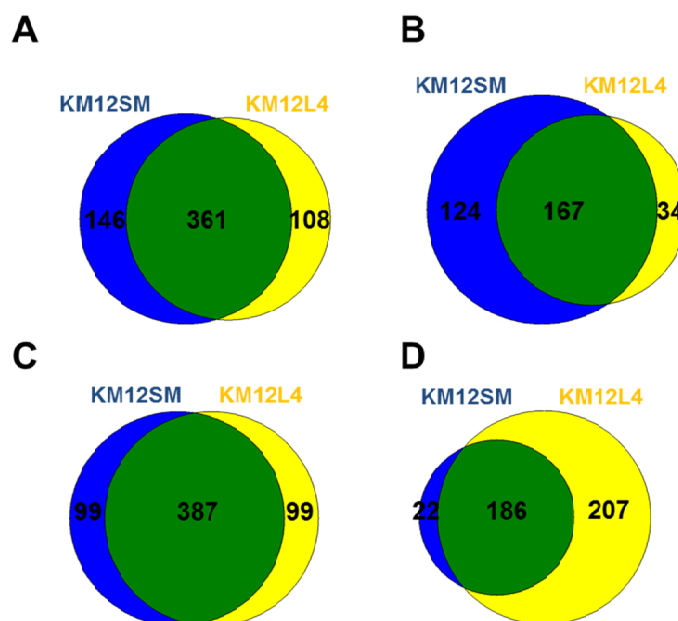
Por otra parte, para analizar la localización de las proteínas identificadas en el secretoma, se utilizaron los programas SignalP (v. 4.1) (192), para detectar proteínas con una secreción clásica, y SecretomeP (v. 2.0) (193), para detectar proteínas con una secreción no clásica. El 21% de las proteínas cuantificadas en la fracción del secretoma eran proteínas secretadas por la vía clásica. Por el contrario, el 29% se predijeron como proteínas con una vía de secreción no clásica. Por último, el 28% eran proteínas exosomales, el 21% era proteínas pertenecientes a microvesículas y únicamente el 1% de las proteínas cuantificadas en la fracción del secretoma no habían sido descritas previamente como proteínas secretadas.

Estos resultados confirmaron el correcto enriquecimiento en las fracciones de secretoma y de membrana de las muestras analizadas.

#### **24.1.2.4. Proteínas desreguladas en las líneas celulares KM12SM y KM12L4 altamente metastásicas en comparación con la línea celular poco metastásica SW620**

Como se comentó anteriormente, el objetivo principal de este experimento fue la búsqueda de biomarcadores y nuevas dianas terapéuticas de la metástasis del CCR. Las proteínas implicadas en la metástasis del CCR son aquellas que permiten la colonización hepática y/o pulmonar, así como el crecimiento de las células tumorales en estos órganos distales. En este sentido, las proteínas comúnmente desreguladas en las células altamente metastásicas KM12SM y KM12L4 comparado con las células poco metastásicas SW620, podrían constituir una buena fuente de información en la búsqueda de potenciales candidatos biomarcadores y dianas terapéuticas de la metástasis del CCR. Por esta razón, el primer paso en el análisis de los datos obtenidos fue quedarse con las proteínas comúnmente desreguladas en las células KM12SM y KM12L4 en comparación con las células SW620.

En la fracción de membrana, 361 proteínas estaban sobre-expresadas en las líneas celulares KM12SM y KM12L4 altamente metastásicas en comparación con las células SW620 poco metastásicas, considerando un incremento en su nivel de expresión de  $> 1,5$  veces (*fold change*  $> 1,5$ ) (Tabla Suplementaria 3, anexo) y 387 estaban reguladas a la baja en las células KM12SM y KM12L4 comparado con las células SW620, considerando un descenso en su nivel de expresión de  $< 0.67$  veces (*fold change*  $< 0.67$ ) (Tabla Suplementaria 4, anexo) (Figura 22).



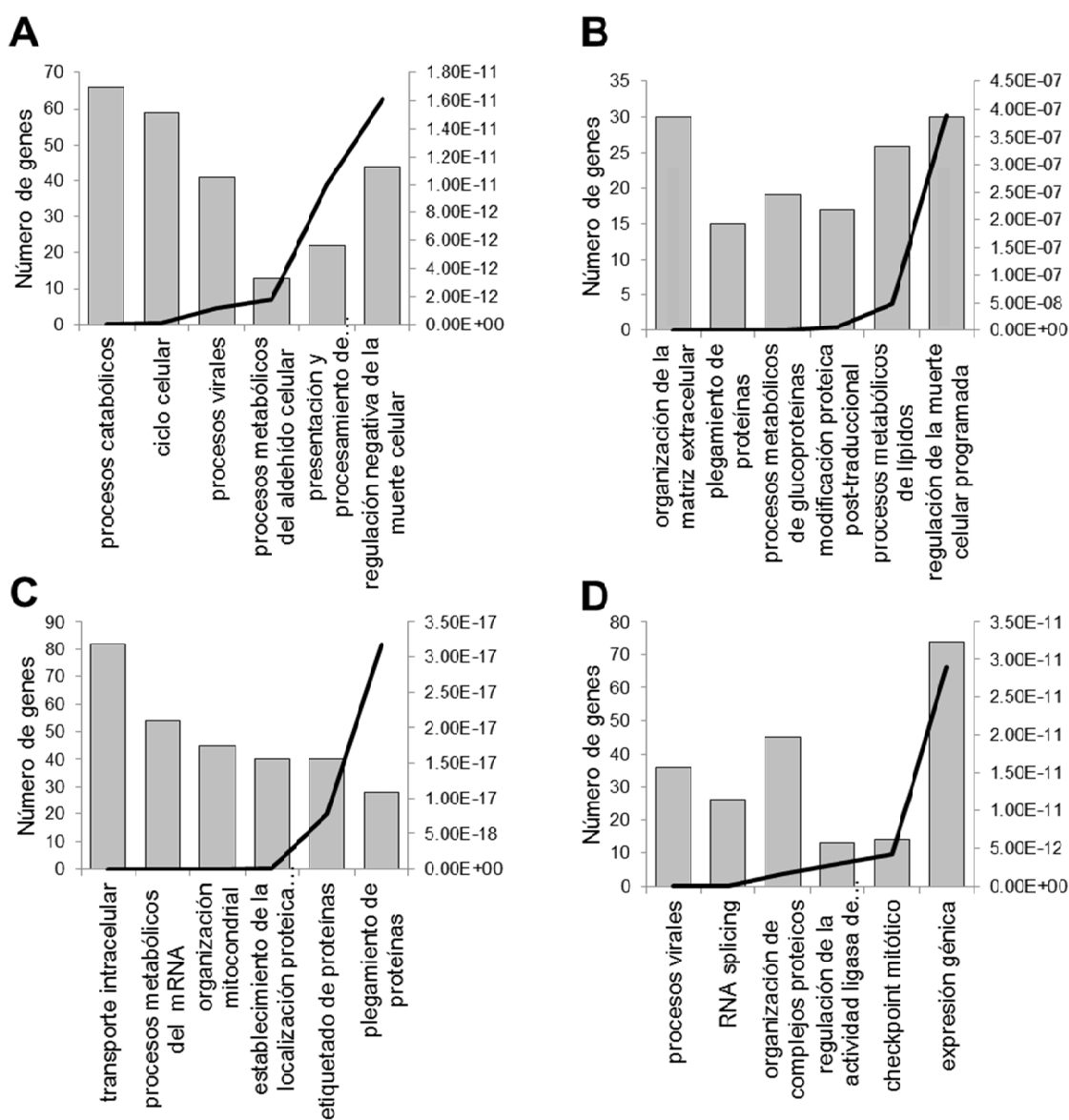
**Figura 22. Proteínas comúnmente desreguladas en las fracciones de membrana y secretoma de las células KM12SM y KM12L4 en comparación con las células SW620.** Representación mediante diagramas de Venn de las proteínas comúnmente sobre-expresadas en la fracción de membrana (A) y en el secretoma (B), así como de las proteínas comúnmente reguladas a la baja en la fracción de membrana (C) y en el secretoma (D) de las células altamente metastásicas KM12SM y KM12L4 en comparación con las poco metastásicas SW620.

En la fracción de secretoma, 167 proteínas estaban sobre-expresadas (*fold change* > 1,5) en las líneas celulares altamente metastásicas en comparación con las células SW620 poco metastásicas (Tabla Suplementaria 5, anexo), y 186 estaban reguladas a la baja (*fold change* < 0.67) en las células KM12SM y KM12L4 comparado con las células SW620 (Tabla Suplementaria 6, anexo).

#### 24.1.2.4.1. Procesos biológicos alterados en la metástasis del CCR

El análisis funcional de las proteínas desreguladas en las líneas celulares KM12SM y KM12L4 en comparación con la línea celular SW620 mediante STRING y el algoritmo Gene Ontology (GO), reveló que las 361 proteínas sobre-expresadas en la fracción de membrana estaban implicadas mayoritariamente y de manera significativa en procesos catabólicos, en ciclo celular, en procesos virales,

en la presentación de antígenos, así como en la regulación negativa de la muerte celular (Figura 23A).



**Figura 23. Función biológica de las proteínas desreguladas en las líneas celulares KM12SM y KM12L4 altamente metastásicas en comparación con la línea celular poco metastásica SW620.** Representación, mediante diagramas de barras, de los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas comúnmente sobre-expresadas en la fracción de membrana (A) y en el secretoma (B), así como de las proteínas comúnmente reguladas a la baja en la fracción de membrana (C) y en el secretoma (D) de las células altamente metastásicas KM12SM y KM12L4 en comparación con las poco metastásicas SW620. Sobre el diagrama de barras, en el eje “y” secundario, se representa el p valor asociado a cada proceso biológico.

Por el contrario, las 387 proteínas reguladas a la baja estaban significativamente relacionadas con el transporte intracelular, el metabolismo del

mRNA, la organización mitocondrial, la determinación de la localización proteica en diferentes orgánulos y con el etiquetado y ensamblaje de proteínas (Figura 23B).

Por otro lado, las 167 proteínas sobre-expresadas en la fracción de secretoma estaban implicadas mayoritaria y significativamente en la organización de la matriz extracelular, el ensamblaje de proteínas, el metabolismo de lípidos y glicoproteínas, la modificación post-traducciona l y en la regulación de la muerte celular programada (Figura 23C). Por el contrario, las 186 proteínas secretadas reguladas a la baja eran proteínas que participan en procesos virales, *splicing* de mRNA, organización de complejos proteicos, *checkpoint* mitótico y regulación de la expresión génica (Figura 23D). El listado detallado de todos los procesos biológicos enriquecidos en cada uno de los conjuntos de proteínas analizados se muestra en las Tablas Suplementarias 7, 8, 9 y 10, anexo.

#### **24.1.3.5. Determinación de potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas de la metástasis de CCR para distintas aplicaciones clínicas**

Por un lado, se seleccionaron los potenciales biomarcadores de la metástasis del CCR. Para ello, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: (1) debido a que un biomarcador ideal para el cribado y el monitoreo del CCR debería ser medible en las muestras de fluido corporal, solo se incluyeron aquellas proteínas identificadas en las muestras de secretoma. (2) Debido a que los biomarcadores deberían estar altamente aumentados en pacientes con metástasis de CCR en comparación con pacientes con CCR o pacientes sanos, solo se consideraron aquellas proteínas cuya expresión aumentaba 5 o más veces en las células altamente metastásicas en comparación con las poco metastásicas. La aplicación de estos criterios condujo a la selección de un total de 111 prometedores biomarcadores de la metástasis del CCR (Tabla Suplementaria 11, anexo).

Por otro lado, el análisis de la fracción de membrana de las células SW620, KM12SM y KM12L4 proporcionó información sobre las proteínas de membrana que pueden ser utilizadas como dianas terapéuticas. Considerando únicamente las proteínas que cuya expresión aumenta 5 o más veces en las células KM12SM y KM12L4 altamente metastásicas en comparación con las células SW620 poco metastásicas, se obtuvo la lista definitiva (67 proteínas) de potenciales dianas terapéuticas de la metástasis del CCR (Tabla Suplementaria 12, anexo).

### **24.1.3.5.1. Validación de los candidatos seleccionados como biomarcadores de pronóstico del CCR, mediante la base de datos GSE17538**

Para validar los 111 posibles biomarcadores seleccionados, se calculó la supervivencia global de 232 pacientes con cáncer de colon, cuyos datos clínicos y genéticos se recogen en la base de datos GSE17538.

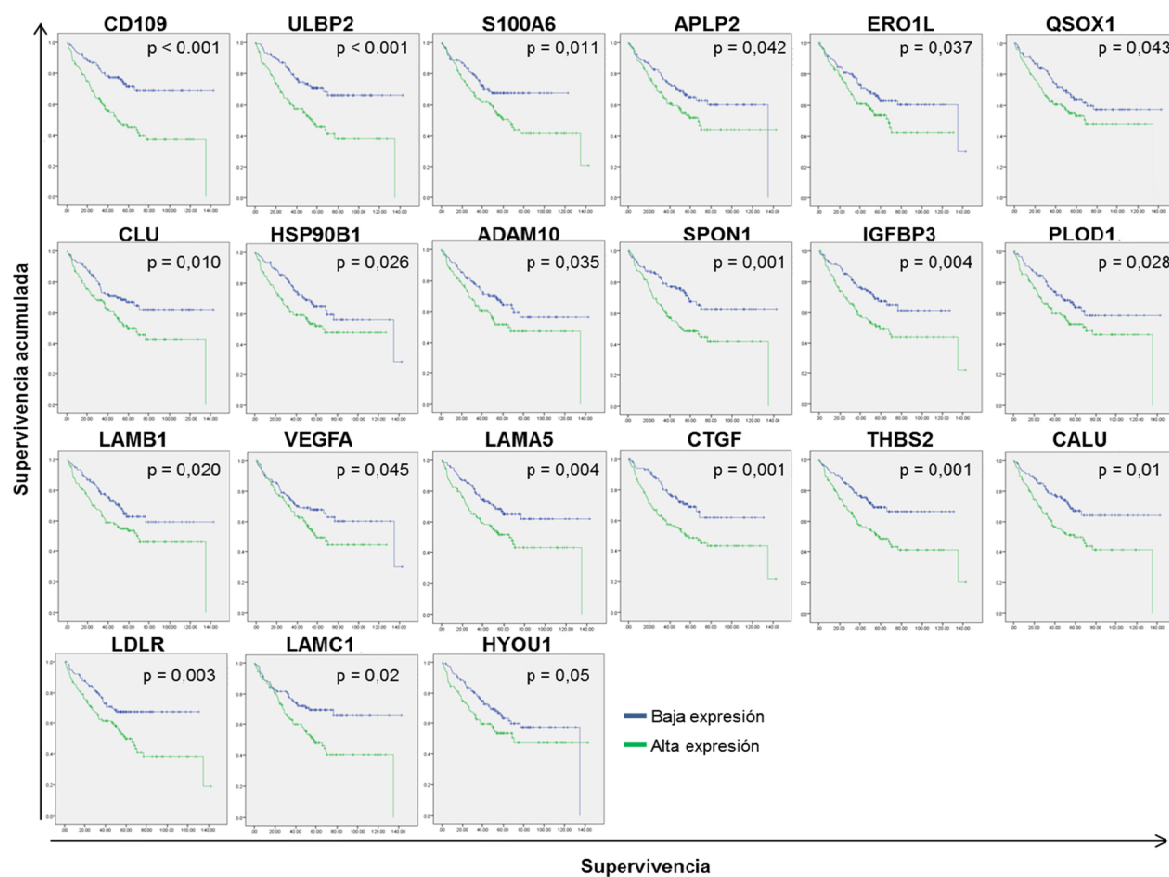
En primer lugar, se analizó la expresión de las 111 proteínas en los 232 pacientes. En segundo lugar, los pacientes se dividieron en dos grupos: pacientes con alta expresión y pacientes con baja expresión de cada proteína de interés. Después, se trazaron las curvas de supervivencia, utilizando el método Kaplan-Meier, de los pacientes con alta y baja expresión para cada una de las 111 proteínas seleccionadas y se calculó la significancia estadística entre ambas curvas de supervivencia mediante el *log-rank test*. Se observó que, de los 111 marcadores utilizados, en 42 de ellos su alta expresión se relacionaba con peor supervivencia global a la enfermedad (Tabla 6).

**Tabla 6. Biomarcadores seleccionados en la fracción del secretoma**

Número de acceso	Nombre del gen	Sonda génica	KM12LA/ SW620	KM12SM /SW620	KM12LA/ KM12SM	p valor logrank
AL110152	CD109	226545_at	44.88	45.97	0.98	0
AA831769	ULBP2	238542_at	10.55	21.61	0.49	0
AW166825	S100A6	228923_at	5.11	2.12	2.41	0.011
BC004371	APLP2	211404_s_at	52.94	50.73	1.04	0.042
BE966748	ERO1L	225750_at	16.39	1.35	12.17	0.037
M20206	LAMB1	211651_s_at	180.28	43.26	4.17	0.02
A1982754	CLU	222043_at	18.85	24.86	0.76	0.01
AK025862	HSP90B1	216449_x_at	9.70	3.69	2.63	0.026
AU135154	ADAM10	214895_s_at	7.98	3.61	2.21	0.035
A1885290	SPON1	213994_s_at	22.65	7.07	3.21	0.001
M31159	IGFBP3	210095_s_at	23.06	11.99	1.92	0.004
AF091352	VEGFA	210513_s_at	6.01	6.24	0.96	0.045
BC003355	LAMA5	210150_s_at	25.74	3.37	7.63	0.004
M92934	CTGF	209101_at	19.98	21.67	0.92	0.001
NM_003247	THBS2	203083_at	77.55	21.38	3.63	0.001
NM_000527	LDLR	202068_s_at	6.98	9.98	0.70	0.003
NM_002826	QSOX1	201482_at	5.01	2.31	2.17	0.043
NM_000302	PLOD1	200827_at	33.56	21.80	1.54	0.028
NM_006389	HYOU1	200825_s_at	15.31	1.24	12.36	0.05
J03202	LAMC1	200770_s_at	61.87	24.03	2.57	0.002
NM_001219	CALU	200757_s_at	44.32	21.15	2.10	0.001
A1739241	REG4	238984_at	1316.64	369.51	3.56	0.058
AW451356	PLBD2	228845_at	27.56	23.21	1.19	0.112
AA130998	CTSB	227961_at	13.63	14.31	0.95	0.071
W92036	PCSK9	227759_at	37.17	18.60	2.00	0.059
W96225	CD44	1565868_at	33.79	3.62	9.34	0.258
AF084943	MINPP1	209585_s_at	6.28	3.40	1.85	0.063
NM_002770	PRSS2	205402_x_at	69.16	0.90	76.58	0.135
NM_000227	LAMA3	203726_s_at	19.44	9.39	2.07	0.067
AF248966	ATP6AP2	201443_s_at	6.74	4.97	1.36	0.257
NM_001909	CTSD	200766_at	12.37	8.82	1.40	0.119
BC038440	GALNT1	1568618_a_at	28.21	5.18	5.44	0.229
BC001144	DNAJB11	223054_at	5.07	0.90	5.64	0.219
NM_022356	LEPRE1	220750_s_at	7.56	1.49	5.07	0.143
AK026926	PDIA6	216640_s_at	35.65	1.40	25.47	0.241
BE880245	GNS	212334_at	17.48	18.50	0.94	0.18
NM_006129	BMP1	202701_at	7.52	2.08	3.62	0.105
NM_003226	TFF3	204623_at	25.82	3.21	8.03	0.102
NM_000152	GAA	202812_at	6.63	9.06	0.73	0.137
NM_000235	LIPA	201847_at	35.82	23.62	1.52	0.202
M32221	PSAP	200866_s_at	13.01	9.57	1.36	0.069
NM_000391	TPP1	200743_s_at	8.17	6.56	1.24	0.072

Es decir, 42 proteínas presentaban mayor expresión en las células altamente metastásicas en comparación con las poco metastásicas y además su alta expresión se relacionaba con peor supervivencia al CCR según los datos recogidos en la base de datos GSE17538. Sin embargo, solo en 21 de los 42 casos, la diferencia en la supervivencia de los pacientes con alta expresión comparada con los pacientes con baja expresión proteica, era significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 24).

## RESULTADOS



**Figura 24.** Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de 232 pacientes con cáncer de colon recolectados en la base de datos pública GSE17538. Se muestran las curvas Kaplan-Meier para 21 proteínas sobre-expresadas en las líneas celulares altamente metastásicas KM12SM y KM12L4 en comparación con las células poco metastásicas SW620. Los niveles de expresión para estas proteínas dentro de cada muestra (paciente) se transformaron a un valor z-score. Valores positivos y negativos del z-score indican alta o baja expresión de estas proteínas en cada paciente, respectivamente. Así, los pacientes se dividieron en pacientes con "baja expresión" (azul) y "alta expresión" (verde) proteica. La significancia se calculó mediante el *log-rank test* y se consideraron significativos los p valor < 0,05.

Dentro de los 21 candidatos seleccionados, proteínas como VEGFA, CLU, CD109, S100A6, QSOX1 o ERO1L habían sido relacionadas previamente con algunos tipos de cáncer. Sin embargo, otras como PLOD1, nunca antes se habían descrito como proteínas relacionadas con esta enfermedad. De hecho, únicamente ULBP2, CLU (204), HSP90B1, ADAM10, LAMB1, VEGFA y IGFBP3 (205, 206) se habían relacionado con anterioridad con el CCR y dentro de ellas, CLU (207-210), LAMB1(211, 212) y VEGFA (213, 214) se habían sugerido como posibles

biomarcadores de la enfermedad. En resumen, encontramos una serie de candidatos proteicos susceptibles de utilizarse como biomarcadores de la metástasis del CCR.

#### **24.2. Proteómica cuantitativa *label free* de 42 muestras pareadas de secretoma soluble de tejido de colon humano normal y tumoral**

El objetivo de este segundo experimento de proteómica cuantitativa fue validar los biomarcadores seleccionados en el experimento de proteómica cuantitativa *label free* de la fracción del secretoma de las líneas celulares de CCR SW620, KM12SM y KM12L4. El procesamiento y análisis de las muestras, así como el procesado de los datos se realizó durante la estancia predoctoral desarrollada en el laboratorio de la Dra Connie Jimenez (VUcm-Cancer Center. Amsterdam. Países Bajos).

##### **24.2.1. Flujo de trabajo**

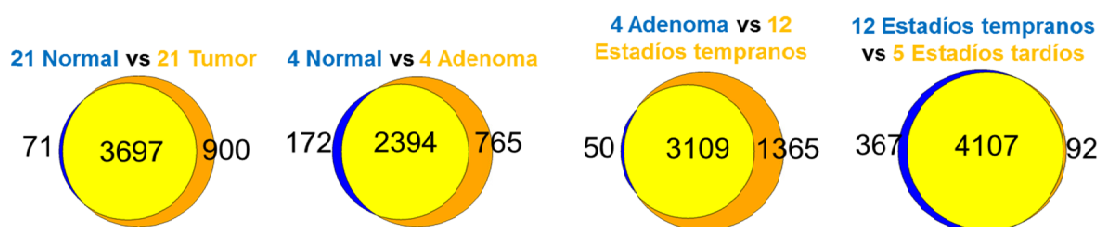
Se analizó la fracción del secretoma soluble de 42 muestras humanas de tejido de cáncer colorrectal normal y tumoral, correspondientes a 21 pacientes con CCR. La fracción del secretoma soluble se obtuvo como se detalló en el apartado 6.1.2. Cada muestra se separó, por SDS-PAGE, en 5 fracciones. Las fracciones resultantes se digirieron en gel con tripsina, para posteriormente ser analizadas en el espectrómetro de masas Q-Exactive, como se describió en los apartados 20.3, 20.5 y 20.6.

En el análisis de los datos obtenidos por espectrometría de masas, en primer lugar, se definieron los grupos de muestras en función del estadio de CCR. En segundo lugar, se establecieron los grupos de interés a comparar: normales vs tumorales; normales vs adenoma; adenoma vs estadios tempranos y estadios tempranos vs estadios tardíos. En tercer lugar, se analizó mediante el contaje del

número de espectros, la diferencia de expresión de cada proteína identificada, en cada grupo. Por último, para calcular la significatividad de la desregulación de una proteína entre dos grupos, se llevó a cabo el test beta-binomial.

#### 24.2.2. Resultados del análisis mediante espectrometría de masas

Se identificaron un total de 4678 proteínas no redundantes entre las 42 muestras. En la comparación del número de proteínas comúnmente identificadas entre cada grupo de comparación se observó que la mayoría de las proteínas identificadas eran comunes en ambos grupos de comparación (Figura 25).



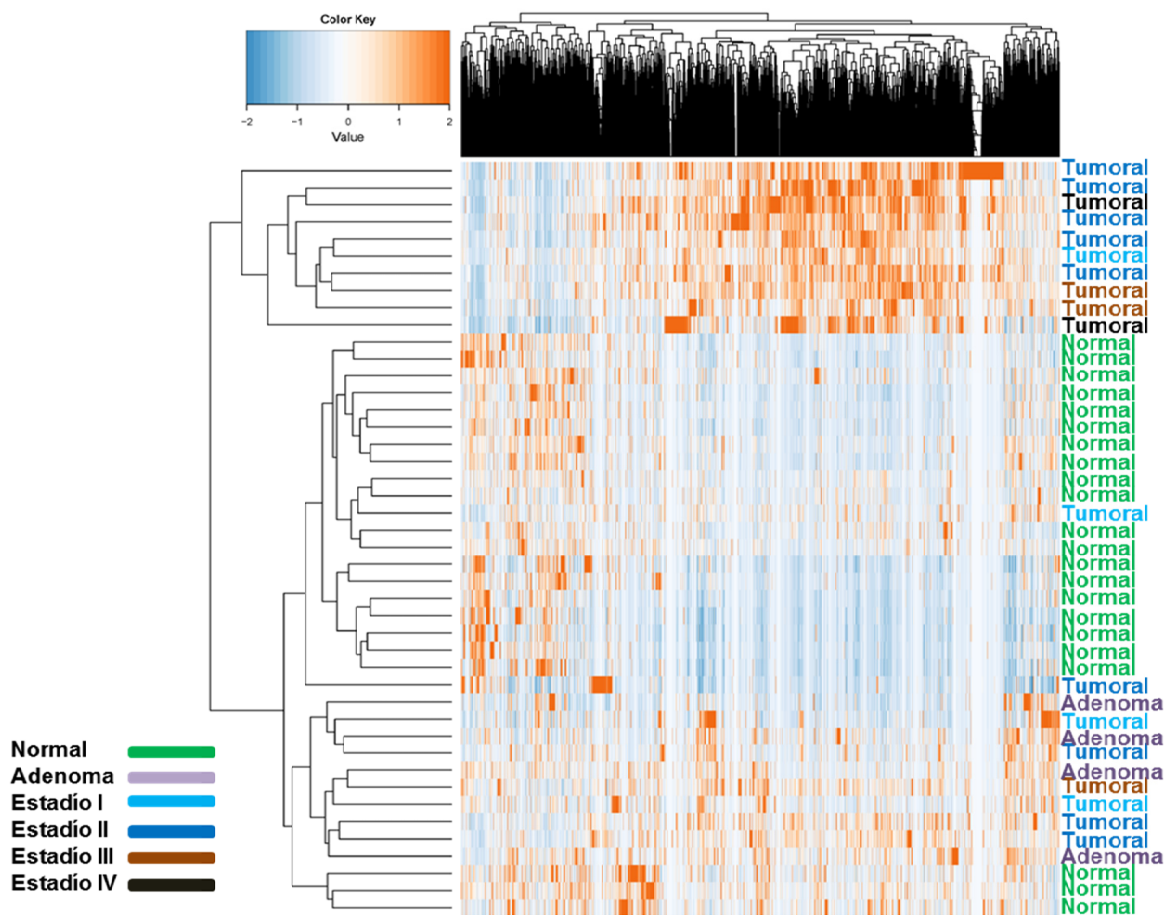
**Figura 25. Análisis general de los resultados de identificación proteica obtenidos por espectrometría de masas.** Representación mediante diagramas de Venn de las proteínas comúnmente identificadas en cada uno de los grupos de comparación establecidos: normales vs tumorales; normales vs adenoma; adenoma vs estadios tempranos y estadios tempranos vs estadios tardíos. Delante del nombre de cada grupo se representa con números el número de muestras que contiene cada grupo.

La cuantificación proteica reveló que 4342 de las 4678 proteínas identificadas, se habían cuantificado con dos o más espectros en al menos una de las 42 muestras analizadas.

El *clustering* no supervisado de todas las proteínas cuantificadas a lo largo de las 42 muestras logró separar tres grupos claramente diferenciados. El primero de ellos englobó a las muestras de CCR, el segundo a las muestras de tejido normal y a una muestra de CCR; y el tercero a muestras de CCR, a las cuatro muestras de adenoma y a tres muestras de tejido normal (Figura 26). Cabe destacar que las muestras de CCR en estadios tardíos se distribuyeron preferencialmente en el

primer grupo, separadas de las muestras normales y tumorales menos malignas (aquellas de CCR en estadios tempranos y adenomas).

En definitiva, los datos cuantitativos de las proteínas de las muestras de secretoma soluble de tejidos de colon permiten clasificar a las muestras en tres grupos, dos de los cuales separan claramente a los tejidos de colon normales y tumorales.



**Figura 26. Clustering no supervisado de las 4342 proteínas cuantificadas en las 42 muestras humanas de secretoma soluble de colon.** Se representan todas las proteínas cuantificadas en cada una de las muestras, a las que se les ha otorgado un color dentro del gradiente mostrado en la parte superior de la figura, de acuerdo con el número de espectros con la que fue cuantificada. El tipo de muestra se representa a la derecha, con un código de colores.

### 24.2.3. Proteínas desreguladas entre cada grupo de comparación

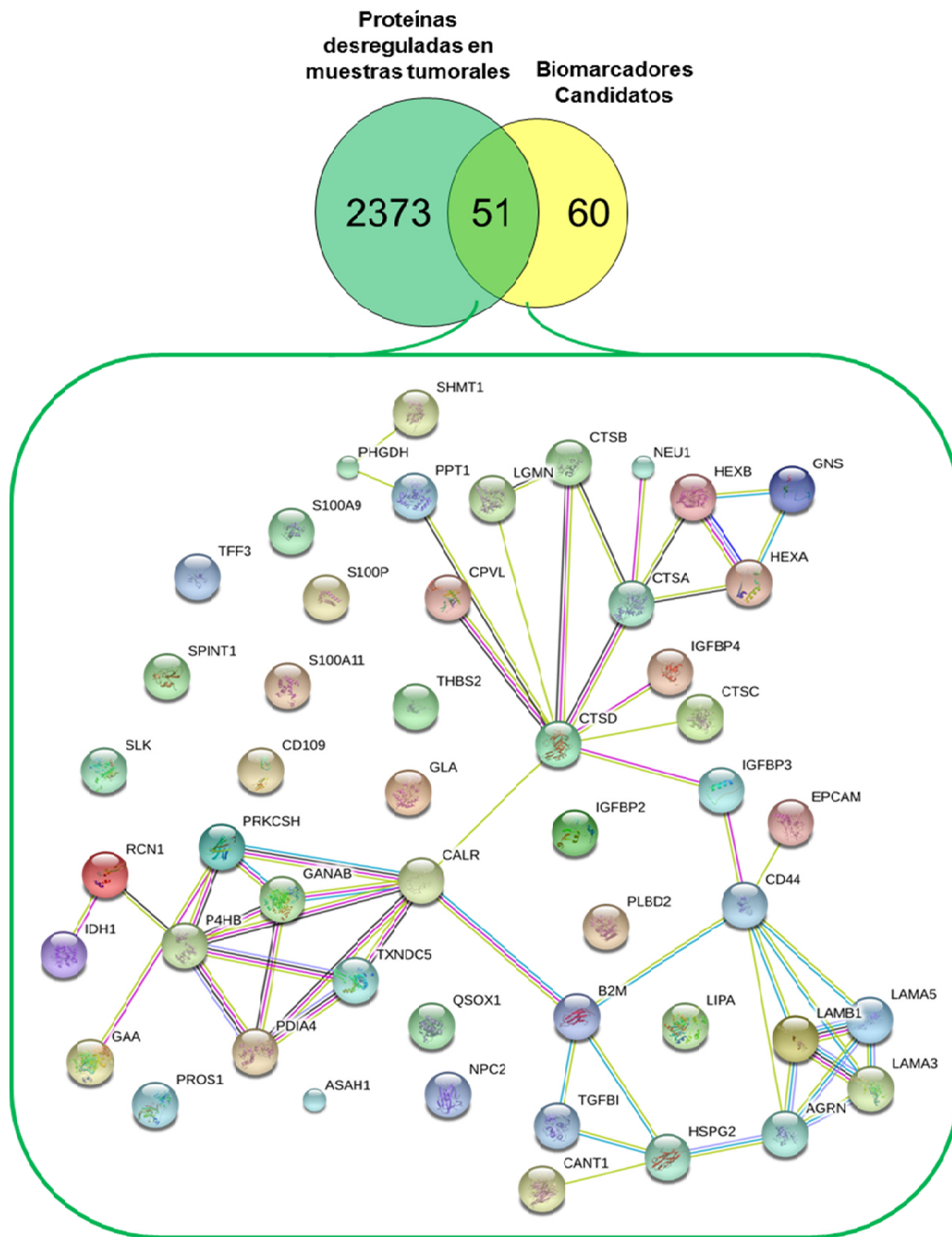
Para el análisis de las proteínas desreguladas, únicamente se tuvieron en cuenta aquellas proteínas cuya expresión era significativamente diferente ( $p$  valor <

0,05) entre dos grupos. De esta manera, se encontraron 2424 proteínas significativamente desreguladas en las muestras tumorales en comparación con las muestras normales (Tabla Suplementaria 13, anexo), 692 en las muestras de adenoma comparado con las muestras normales (Tabla Suplementaria 14, anexo), 823 en las muestras de estadios tempranos en comparación con las muestras de adenoma (Tabla Suplementaria 15, anexo) y 201 en las muestras de estadios tempranos comparado con las muestras de estadios tardíos (Tabla Suplementaria 16, anexo).

**24.3. Validación de los biomarcadores candidatos seleccionados en el experimento de proteómica cuantitativa label free de la fracción de secretoma de las células SW620, KM12SM y KM12L4 con los datos obtenidos en el experimento de proteómica cuantitativa label free del secretoma soluble de 42 muestras de tejidos normales y tumorales de CCR**

Por último, se compararon los datos obtenidos en el experimento del secretoma soluble de las 42 muestras de tejidos normales y tumorales de CCR con los datos obtenidos en el experimento de proteómica *label free* del secretoma de las líneas celulares KM12SM, KM12L4 y SW620.

De los 111 posibles biomarcadores seleccionados en el experimento de proteómica *label free* del secretoma de las líneas celulares KM12SM, KM12L4 y SW620, 51 de ellos se encontraban dentro de las 2424 proteínas significativamente desreguladas en las muestras normales respecto de las muestras tumorales (Figura 27).



**Figura 27. Diagrama de Venn e identificación de las proteínas seleccionadas como potenciales biomarcadores que se identificaron como proteínas desreguladas en las muestras de tejido humano de colon tumoral en comparación con las muestras normales.** De entre las 2424 proteínas identificadas como proteínas desreguladas en las muestras de tejido humano de colon tumoral en comparación con las muestras normales, 51 se encuentran entre las 111 proteínas seleccionadas como potenciales biomarcadores del CCR en el experimento de proteómica cuantitativa *label free* de la fracción del secretoma de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4. El análisis de las interacciones de estas proteínas mediante el programa STRING reveló interacciones significativas entre algunas de ellas.

Además, 14 de los 51 también aparecían como proteínas significativamente desreguladas en la muestras de adenoma en comparación con las muestras normales: SHMT1, S100A9, PDIA4, CD44, MESDC2, GANAB, TGFBI, CPVL, CALR, CDH1, CTSC, CTSD, DSG2, S100P. Otras proteínas como: PHGDH, CANT1, S100A9, TFF3, PRKCSH, HSPA5, GANAB, HSPG2, AGRN, LAMB1, CDH1, B2M, LSR, EPCAM, TPP1, DSG2, SPINT1 y IGFBP2, aparecieron como proteínas significativamente desreguladas en la muestras de estadios tempranos en comparación con las muestras de adenoma. Por último, 7 proteínas se encontraban significativamente desreguladas en la muestras de estadios tardíos en comparación con las muestras de estadios tempranos: LYZ, PLBD2, DNASE2, GNS, PPT1, CTSB, IDH1. En definitiva, algunos potenciales marcadores de la metástasis del CCR seleccionados en el experimento de proteómica cuantitativa de las líneas celulares de CCR, como CDH1, GANAB o LAMB1, podrían funcionar, no solo como biomarcadores de la metástasis de esta enfermedad sino también como marcadores de cada estadio del CCR. Otros como DNASE2, GNS, PPT1 o CTSB parecen ser específicos de la metástasis del CCR.

En resumen, en el primer bloque de esta Tesis Doctoral se identificaron una serie de nuevos potenciales biomarcadores de la metástasis del CCR. Algunos de ellos, como PLOD1 nunca habían sido relacionados con este tipo de cáncer. Otros, como CD109, sí se habían relacionado con este enfermedad, pero no de manera específica con CCR. La validación de los potenciales biomarcadores con muestras de secretoma soluble de tejido humano mostró que proteínas como LAMB1, podrían ser, no solo marcadores de la metástasis del CCR, sino también de la progresión tumoral en cualquiera de los estadios del CCR.

## **25. Análisis funcional de las proteínas LOXL1 y PAUF identificadas en los experimentos de proteómica cuantitativa *label free***

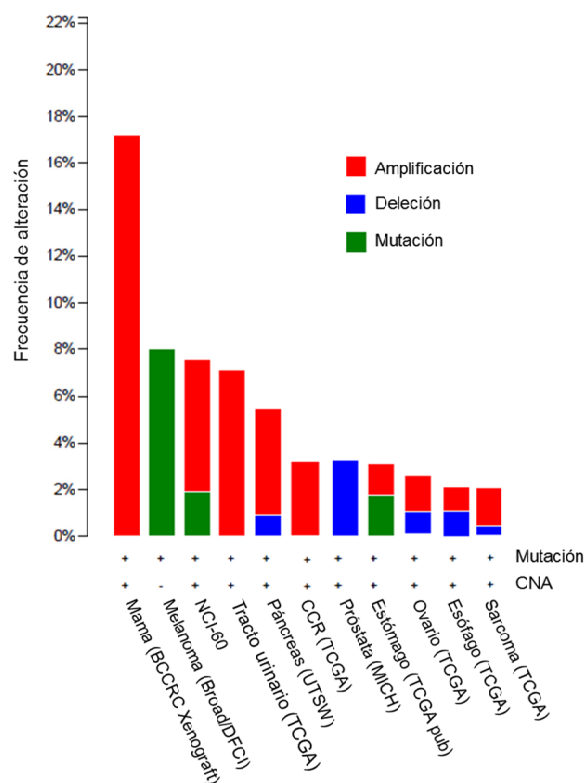
El objetivo del segundo bloque de esta Tesis Doctoral fue investigar el papel de LOXL1 y PAUF en el CCR, dos proteínas que habían sido identificadas en los experimentos de proteómica cuantitativa para la búsqueda de nuevos biomarcadores de pronóstico o diagnóstico, y de nuevas dianas terapéuticas de la metástasis del CCR. Además, PAUF, también conocida como ZG16B, se identificó previamente en el laboratorio (121) como una proteína sobre-expresada en las células KM12SM en comparación con la línea celular parental KM12C.

### **25.1.LOXL1**

LOXL1 se identificó en los dos experimentos de proteómica cuantitativa *label free*. Apareció como una de las proteínas exclusivamente identificadas en la fracción del secretoma de las células KM12L4, y se identificó como una proteína sobre-expresada en las muestras de secretoma soluble de tejido de tumor colorrectal en comparación con las muestras de tejido de colon normal, aunque no de manera significativa ( $p = 0.847$ ). LOXL1 se había descrito como una proteína cuya expresión se asociaba a la colonización metastásica pulmonar (171). Por esta razón, y porque que aquí se identificó a LOXL1 como una proteína exclusiva del secretoma de las células KM12L4 que metastatizan a pulmón, a continuación se caracterizó el papel de LOXL1 en el CCR y su metástasis.

#### **25.1.1. Análisis *in silico* del estado de LOXL1 en diferentes tipos de cáncer**

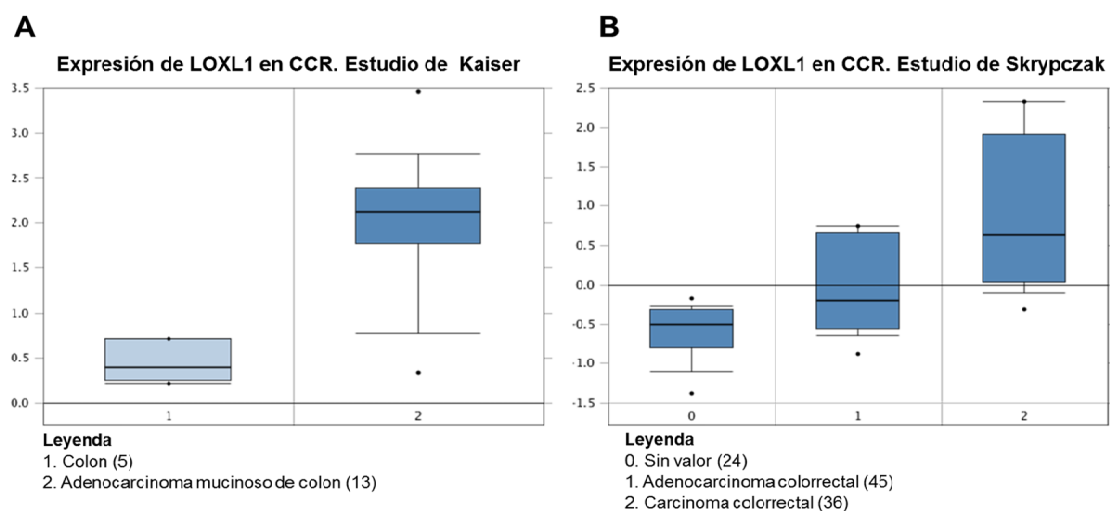
Se analizó el estado de LOXL1 a nivel génico, de mRNA y de proteína en diversos tipos de cáncer. En primer lugar, se analizó, mediante la base de datos CBioportal (190, 215), el estado del gen *LOXLI* en diversos tipos de cáncer (Figura 28).



**Figura 28. Análisis del estado del gen *LOXL1* en diferentes tipos de cáncer mediante la base de datos Cbioportal.** Se muestran los datos de presencia o ausencia de mutación génica y alteración en el número de copias (CNA); así como la frecuencia de amplificación y delección génica de *LOXL1* en cada uno de los cánceres analizados. Entre paréntesis se representa el repositorio de datos utilizado para cada tipo de cáncer analizado.

Se observó que *LOXL1* aparece mutado de manera frecuente en varios tipos de cáncer, como el de mama, melanoma, páncreas, estómago u ovario, entre otros. En todos los casos analizados, salvo en melanoma, el gen *LOXL1* presenta alteraciones en el número de copias (CNA). *LOXL1* está amplificado en el 17% de los casos de cáncer de mama, en el 7% de los cánceres de útero y en el 4% de los casos de cáncer de páncreas. Sin embargo, en otros tipos de cáncer, como el de próstata, *LOXL1* aparece regulado a la baja (con una frecuencia del 3% aproximadamente). Cabe destacar que *LOXL1* está alterado en el panel de células tumorales humanas NCI-60, compuesto por líneas celulares de cáncer de mama, ovario, colon, renal, de pulmón, etc. (216, 217). En cuanto al CCR, según la base de datos de Adenocarcinoma Colorrectal (TCGA, Nature 2012) (218), *LOXL1* aparece amplificado en el 5% de los pacientes con CCR.

En segundo lugar, se realizó un meta-análisis de los niveles de expresión de LOXL1 a nivel de mRNA utilizando la base de datos Oncomine (187, 188) y a nivel de proteína utilizando datos de inmunohistoquímica del Human Protein Atlas (HPA) (219). Con la base de datos Oncomine (estudios de Kaiser (220) y de Skrypczak (221)), se analizaron los niveles de expresión de mRNA de LOXL1 en la mucosa normal de colon, y en adenocarcinoma y carcinoma de colon (Figura 29).



**Figura 29. Análisis de los niveles de mRNA de LOXL1 en CCR.** Los niveles relativos de expresión génica de *LOXL1* en tejidos de colon normal y de adenocarcinoma y carcinoma colorrectal se analizaron mediante un meta-análisis basado en los datos recogidos en las bases de datos Oncomine y Cancer Genome Atlas (TCGA), estudios de Kaiser (A) (220) y de Skrypczak (B) (221).

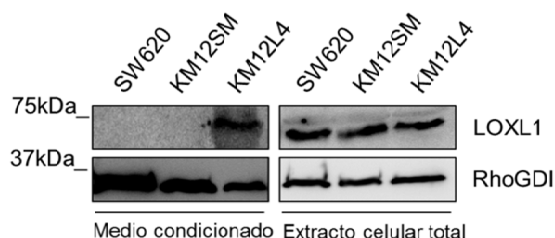
Se observó que los niveles de mRNA de LOXL1 eran claramente superiores en el tejido de adenocarcinoma de colon, respecto de la mucosa normal de colon. Además, los niveles de mRNA fueron superiores en el carcinoma colorrectal en comparación con el adenocarcinoma de colon, según los datos recogidos en el estudio de Skrypczak (221).

En tercer lugar, se analizó el nivel de expresión de LOXL1 en CCR a nivel de proteína, mediante los datos recogidos en HPA. LOXL1 mostró una tinción media y/o fuerte en el 36% de los tejidos de CCR analizados (datos no mostrados).

En resumen, LOXL1 presenta alteraciones a nivel génico, de mRNA y de proteína, en varios tipos de cáncer, entre los que se encuentra el CCR. En CCR, los datos de abundancia de LOXL1 a nivel génico, transcriptómico y proteómico están en concordancia y muestran que LOXL1 se regula al alza en el tumor de colon en comparación con el tejido sano.

### 25.1.2. Análisis de la expresión y secreción de LOXL1 en las células SW620, KM12SM y KM12L4

LOXL1 se identificó, mediante espectrometría de masas, de manera exclusiva en el secretoma de las células KM12L4. Para corroborar la secreción exclusiva de LOXL1 por parte de las células KM12L4, en comparación con las células SW620 y KM12SM, se testó la expresión de LOXL1 en esta fracción celular por WB. Como control, se analizó además la presencia de LOXL1 en el extracto celular total de estas tres líneas celulares (Figura 30).



**Figura 30. Análisis de los niveles de expresión de LOXL1 en tres líneas celulares de CCR mediante WB.** Los niveles de expresión de LOXL1 en el medio condicionado y en el extracto celular total de las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4 se testaron por WB. La proteína RhoGDI, previamente detectada en el medio condicionado celular (121), se utilizó como control de carga en las dos fracciones analizadas.

LOXL1 se expresa de manera equitativa en las tres líneas celulares analizadas. Sin embargo, LOXL1 se secreta exclusivamente (al menos a unos niveles detectables por espectrometría de masas y WB) por las células KM12L4. Estos datos sugieren que la secreción de LOXL1 está regulada al alza en las células KM12L4 en comparación con las células SW620 y KM12SM, lo que podría ser importante para la colonización metastásica pulmonar.

### 25.1.3. Localización celular de LOXL1

Alguno de los miembros de la familia LOX, como LOXL2, no solo son proteínas de matriz extracelular, sino que también son proteínas con una función transcripcional (222), por lo que además de tener localización citosólica y extracelular, presentan una localización nuclear (28).

Por esta razón, se analizó la localización celular de LOXL1 mediante inmunofluorescencia, en las células SW620, KM12SM y KM12L4 (Figura 31).

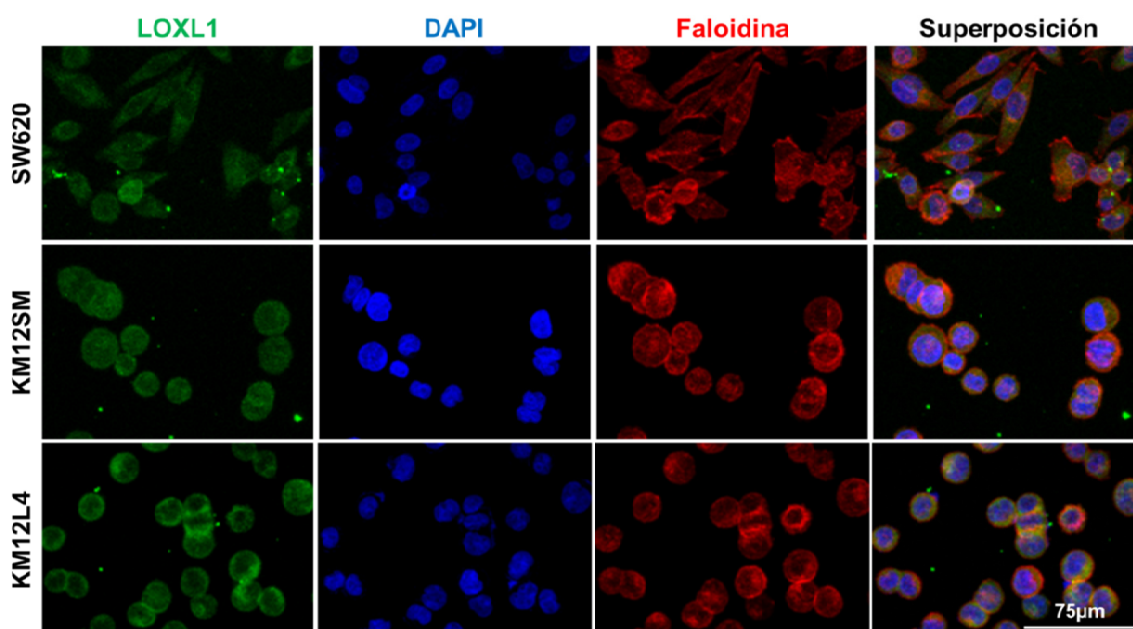


Figura 31. Análisis de la localización celular de LOXL1 en tres líneas celulares de CCR mediante inmunofluorescencia. Las células SW620, KM12SM y KM12L4 se fijaron y se incubaron con el anticuerpo anti-LOXL1, con faloidina (rojo) para detectar la actina y DAPI (azul) para detectar los núcleos celulares. Se utilizó un anticuerpo secundario marcado con fluoróforo verde para detectar el anticuerpo anti-LOXL1.

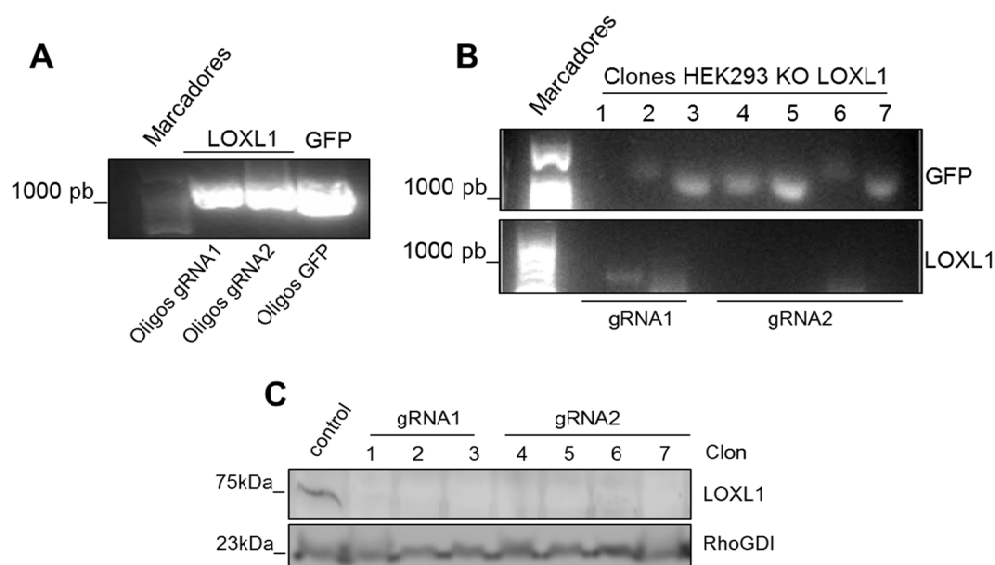
LOXL1 mostró una tinción citosólica, sin tinción nuclear, en las tres líneas celulares analizadas, lo que sugiere que el papel de LOXL1 en estas líneas celulares de CCR no tiene que ver con una posible función transcripcional.

#### **25.1.4. Estudio del papel de LOXL1 en la metástasis del CCR**

Para estudiar el papel de LOXL1 en la metástasis del CCR, se valoró el efecto de su silenciamiento en las líneas celulares HEK293 y KM12L4, sobre algunos procesos alterados en la metástasis como la invasión y la adhesión celular.

##### **25.1.4.1. Generación de la línea celular HEK293 establemente silenciada en LOXL1 mediante el sistema CRISPR/Cas9**

En esta Tesis Doctoral se utilizó el sistema CRISPR/Cas9 (Origene) para conseguir el silenciamiento estable de LOXL1 en la línea celular HEK293. Los clones de las células HEK293 establemente silenciados en LOXL1 se obtuvieron como se detalla en el apartado 11.2.2. Brevemente, las células HEK293, después de la transfección doble con los vectores donador y pCas-Guide gRNA, se diluyeron en placas de 10 cm hasta obtener colonias (clones) simples. Las colonias se seleccionaron con puromicina, se amplificaron y se congelaron, antes de ser analizadas. Se testaron para su contenido en *LOXL1* y GFP un total de 8 clones, uno de ellos el clon control (Figura 32A). Los clones 1, 2 y 3 se obtuvieron por la transfección doble del vector pCas-Guide gRNA 1, que contiene un RNA guía (gRNA) para la secuencia génica TGCCTGTGCGTGCTGGTGCA de *LOXL1*, y el vector donador, que contiene el gen de Cas9, un casete de resistencia a puromicina y GFP. Por otro lado, los clones 4, 5, 6 y 7 se obtuvieron por la co-transfección del vector pCas-Guide gRNA 2, que contiene otro gRNA para otra parte diferente de la secuencia génica de *LOXL1*: ACACCAGGGCCCCCAGCTGC, y el vector donador. Se analizó la presencia de la secuencia génica de *LOXL1* y de GFP mediante PCR en cada uno de los 7 clones (Figura 32B).



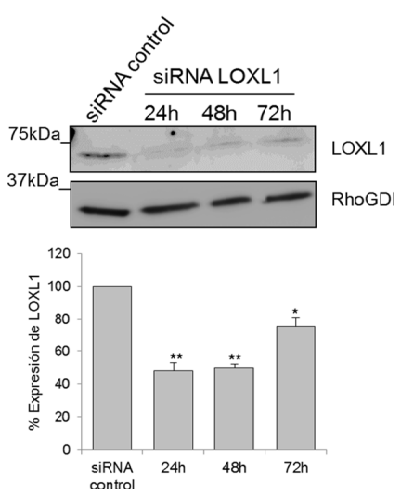
**Figura 32. Análisis mediante PCR y WB de los clones celulares silenciados en LOXL1 con el sistema CRISPR/Cas9.** (A y B) Un total de 8 clones de células HEK293 transfectadas con el sistema CRISPR/Cas9 para el silenciamiento estable de LOXL1 se analizaron por PCR A) En primer lugar se valoró la presencia de *LOXL1* y GFP en un clon transfectado con el gRNA control. Para amplificar *LOXL1* se utilizaron dos pares de oligonucleótidos (oligos gRNA 1 y 2), cuya secuencia se detalla en el apartado 6.2.1. B) En segundo lugar, se valoró la presencia de *LOXL1* y GFP en 7 clones de células HEK293 transfectadas con los vectores pCas-Guide gRNA 1 y 2. Los productos de amplificación de GFP (arriba) y de *LOXL1* (abajo) por PCR de cada uno de estos clones, se cargaron en un gel de agarosa al 1,8% en TAE en presencia de Gel Red. C) Los niveles de expresión de LOXL1 en el extracto celular total de los 7 clones de las células HEK293 establemente transfectadas con los vectores del sistema CRISPR/Cas9 se testaron por WB. La proteína RhoGDI se utilizó como control de carga.

En ambos casos, se utilizaron oligos para amplificar 1.000 pares de bases de las secuencias génicas de *LOXL1* y GFP, por lo que el tamaño del fragmento génico amplificado por PCR debía ser de este tamaño. En el clon control se detectó la presencia de GFP y LOXL1, lo que sugiere la inserción de GFP en el genoma de las células, sin delección del gen *LOXL1*. En cuanto a los clones transfectados con los vectores pCas-Guide gRNA para silenciar LOXL1, se detectó la presencia de GFP en 6 de los 7 clones analizados, mientras que en ninguno de ellos se observó la presencia de la secuencia génica de LOXL1. Cabe destacar que en el caso del clon 2, aparece una banda amplificada a una altura aproximada de 700 pares de bases. En resumen, en todos los clones analizados se amplificaron bandas a la altura de GFP (salvo el número 1) y no se amplificaron bandas a la altura de LOXL1, lo que

podría indicar la correcta edición genómica de las células HEK293 mediante el sistema CRISPR/Cas9. Para corroborarlo, posteriormente se realizó un WB para detectar la presencia de LOXL1 a nivel de proteína en cada uno de estos clones (Figura 32C). Las células HEK293 control (transfectadas doblemente de manera estable con el vector pCas-Guide gRNA control, que contiene un gRNA inespecífico, y el vector donador) mantuvieron la expresión de LOXL1, mientras que en ninguno de los clones HEK293 editados para LOXL1 se detectó la presencia de LOXL1 en el extracto celular total. Por tanto, cualquiera de estos clones fueron los que se utilizaron en posteriores experimentos.

#### 25.1.4.2. Silenciamiento transitorio de LOXL1 en la línea celular KM12L4

El sistema CRISPR/Cas9 (Origene) para conseguir el silenciamiento estable de LOXL1 en las células KM12L4 no funcionó, debido a la dificultad de obtener colonias aisladas de esta línea celular. Por esta razón, el silenciamiento de LOXL1 en las células KM12L4 se llevó a cabo mediante siRNAs. Las células transfectadas se mantuvieron en cultivo durante 24, 48 o 72 antes de ser recogidas, procesadas y analizadas por WB para testar la bajada de expresión de LOXL1 (Figura 33).



**Figura 33. Análisis del silenciamiento transitorio de LOXL1 en las células KM12L4 mediante siRNAs.** Las células KM12L4 se transfectaron de manera transitoria con siRNAs específicos para LOXL1 y se obtuvo el extracto proteico celular total 24, 48 y 72 h después de la transfección. 30µg de cada extracto se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se sometieron a transferencia utilizando anti-LOXL1 o anti-RhoGDI como control de carga. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se representa, mediante un diagrama de barras, en la parte inferior de la figura. Se refleja la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

La cuantificación del WB mediante densitometría óptica mostró que la mayor bajada de la expresión de LOXL1 (un 50%) se obtuvo a las 24 h de la

transfección. La disminución de la expresión de LOXL1 se perdía al cabo del tiempo, siendo únicamente de un 20% después de 72 h de la transfección.

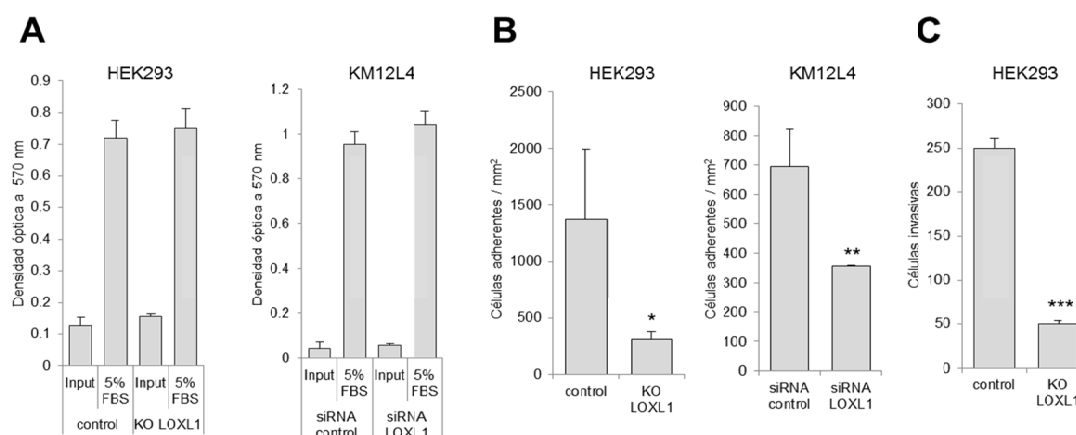
De esta manera, los experimentos en los que se llevó a cabo el silenciamiento transitorio de LOXL1 en las células KM12L4, se realizaron a las 24 h de la transfección.

**25.1.4.3. El silenciamiento de LOXL1 en las células HEK293 y KM12L4 disminuye la capacidad de adhesión en invasión celular, pero no altera la viabilidad celular**

Tras confirmar el silenciamiento estable y transitorio de LOXL1 en las líneas celulares HEK293 y KM12L4, respectivamente, se analizó su efecto en la capacidad tumorigénica de dichas células, mediante ensayos de adhesión, invasión y viabilidad celular.

La viabilidad celular se valoró mediante ensayos de MTT. Las células HEK293 y LOXL1 silenciadas en LOXL1 no mostraron cambios significativos en la proliferación en comparación con las células control (Figura 34A).

Para el estudio de la adhesión celular se utilizaron placas recubiertas de Matrigel. La adhesión de las células silenciadas en LOXL1 fue significativamente menor que la de las células control (Figura 34B). El silenciamiento estable de LOXL1 en las células HEK293 disminuyó más de 3,5 veces la adhesión celular, mientras que en el caso de las células KM12L4, el silenciamiento transitorio de LOXL1 disminuyó la adhesión celular un 50%, en comparación con las células control.



**Figura 34. Análisis del efecto del silenciamiento de LOXL1 sobre algunas propiedades tumorigénicas en las líneas celulares HEK293 y KM12L4.** A) La proliferación se monitorizó mediante un ensayo de MTT donde las células silenciadas en LOXL1 se cultivaron durante 72 h. Tras este tiempo se valoró la densidad óptica a 570 nm. B) La adhesión a Matrigel de las células silenciadas en LOXL1 y control se determinó después de mantener a las células en medio sin suero durante 5 h. Tanto en las células HEK293 como en las KM12L4, se observó una disminución significativa de la adhesión celular por la pérdida de LOXL1. C) Estudio de la capacidad de invasión, mediante cámaras “Transwell” con Matrigel, de las células HEK293 control y establemente silenciadas en LOXL1. La capacidad de invasión se redujo más de 5 veces en las células silenciadas en LOXL1 con respecto a las células control. Los datos representan la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Para el estudio del efecto del silenciamiento estable de LOXL1 sobre la invasión de las células HEK293 se utilizaron cámaras “Transwell” con Matrigel. El silenciamiento estable de LOXL1 redujo hasta 5 veces la capacidad de invasión de las células HEK293, en comparación con las células control (Figura 34C).

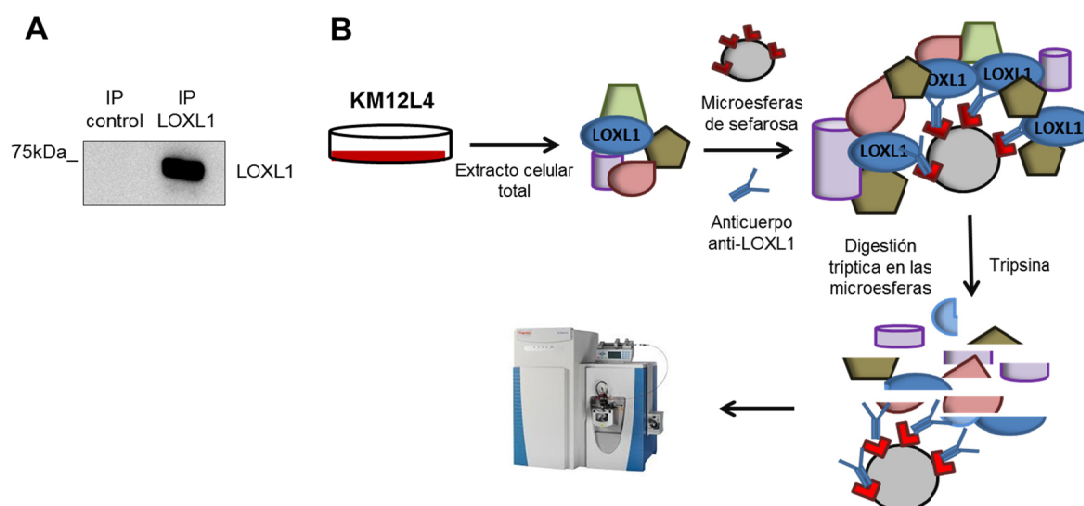
En conjunto, estos datos indican un papel clave de LOXL1 en la adhesión e invasión de las células HEK293 y, probablemente, de las células altamente metastásicas KM12L4.

#### 25.1.4.4. Análisis del interactoma de LOXL1 mediante inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas

Para identificar los mediadores a través de los cuales LOXL1 podría llevar a cabo sus efectos sobre la adhesión e invasión de las células KM12L4, se llevó a cabo la inmunoprecipitación (IP) de LOXL1 en 500  $\mu\text{g}$  de un extracto proteico total de células KM12L4, con un anticuerpo monoclonal anti-LOXL1 acoplado a

microesferas de sefarosa. Como control, y con el objetivo de descartar las proteínas que se unen de manera inespecífica a las cadenas pesadas de los anticuerpos, se realizó en paralelo la incubación de 500 µg del mismo extracto proteico con una IgG inespecífica.

En primer lugar, se valoró por WB el enriquecimiento significativo de la proteína LOXL1 en la IP de LOXL1 en comparación con la IP control (Figura 35A). En segundo lugar, las muestras de IP de LOXL1 y control, se sometieron a digestión con tripsina en las propias microesferas y los péptidos tripticos resultantes se identificaron mediante su análisis por LC-MS/MS en el espectrómetro de masas Q-Exactive (Figura 35B).



**Figura 35. IP de LOXL1 acoplada a espectrometría de masas.** A) Comprobación de la capacidad de IP de LOXL1 del anticuerpo anti-LOXL1 en el extracto celular total de las células KM12L4. 500 µg de extracto celular total se incubaron con un anticuerpo de ratón inespecífico (que sirvió de control) (IP control) y con el anticuerpo anti-LOXL1 (IP LOXL1). El resultado de la IP se resolvió por SDS-PAGE y se realizó un WB frente a LOXL1. B) Protocolo de IP de LOXL1, digestión triptica de las proteínas de su interactoma e identificación de los péptidos tripticos resultantes por espectrometría de masas.

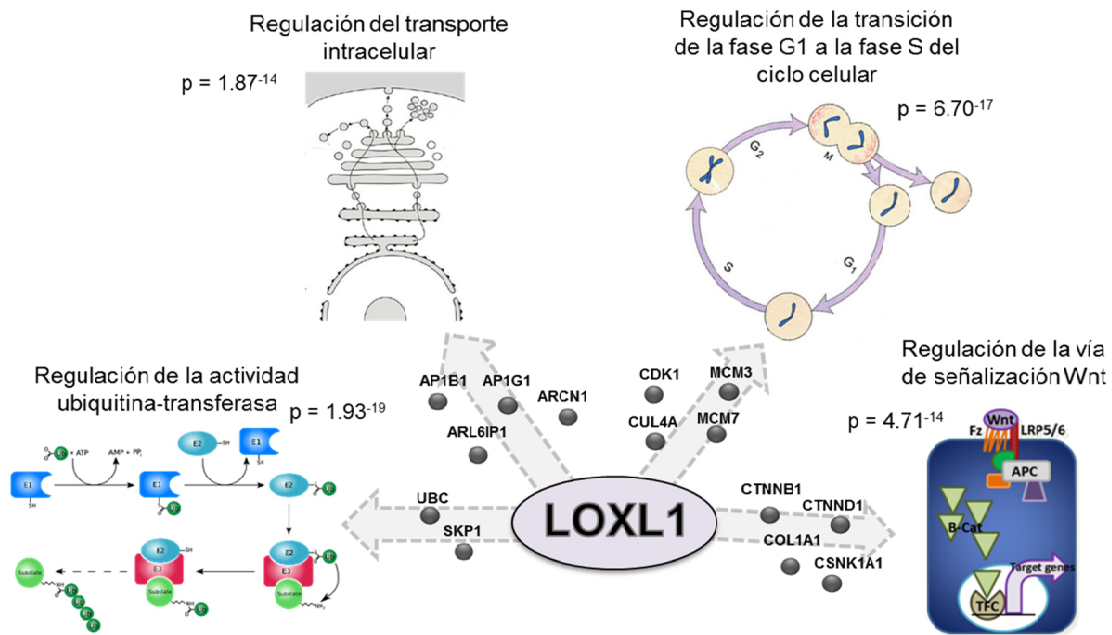
#### 25.1.4.4.1. Proteínas que forman parte del interactoma de LOXL1

Se identificaron un total de 355 proteínas que aparecían exclusivamente identificadas en la IP de LOXL1. Con el fin de obtener la lista definitiva de

proteínas pertenecientes al interactoma de LOXL1 para realizar su análisis funcional, las 355 proteínas se filtraron con la base de datos Crapome (223), un repositorio de contaminantes que contiene listas de proteínas identificadas en los controles negativos de experimentos de purificación por afinidad acoplados a espectrometría de masas (AP-MS). De las 355 proteínas, únicamente 24 aparecían como proteínas contaminantes en la base de datos Crapome. De esta manera, el análisis funcional de las proteínas pertenecientes al interactoma de LOXL1 se llevó a cabo con la lista definitiva de 331 proteínas (Tabla Suplementaria 17, anexo).

#### **25.1.4.4.2. Análisis *in silico* del proceso biológico en el que están implicadas las proteínas del interactoma de LOXL1**

El análisis funcional de las proteínas identificadas en el interactoma de LOXL1 utilizando STRING y GO reveló que algunas proteínas, como CALM2 y NFKB2, estaban implicadas de manera significativa en la estimulación de la vía de señalización del receptor de lectina tipo C ( $p = 2.32^{-18}$ ) y en la transición G1 / S de las fases del ciclo celular ( $p = 6.70^{-17}$ ) (CDK1, CUL4A, MCM3 y MCM7 entre otras). Otras proteínas del interactoma de LOXL1, como: AP1B1, AP1G1, ARCN1 y ARL6IP1, están implicadas en transporte intracelular de proteínas ( $p = 1.87^{-14}$ ); COL1A1, CSNK1A1, CTNNB1 y CTNND1 participan en la regulación de la vía de señalización canónica Wnt ( $p = 4.71^{-14}$ ), o SKP1 y UBC, están implicadas en la regulación positiva de la actividad transferasa de ubiquitina ( $p = 1.93^{-19}$ ) (Tabla Suplementaria 18, anexo y Figura 36).



**Figura 36. Resumen de los procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas que forman parte del interactoma de LOXL1.** La imagen muestra alguna de las proteínas identificadas en el interactoma de LOXL1, agrupadas de acuerdo con su función biológica analizada por GO y STRING. Los términos GO tienen un p-valor asociado que se calcula en base al enriquecimiento de cada término, considerando el total de términos GO registrados, mediante una prueba hipergeométrica corregida por el método de Benjamini y Hochberg.

Las proteínas específicas de la IP de LOXL1 pueden ser claves para determinar el papel de LOXL1 en los procesos de invasión y adhesión celular en los que participa. Por ello, estas proteínas y su interacción con LOXL1 abren vías de estudio novedosas para comprender el papel de LOXL1 en CCR.

En resumen, en esta parte de la Tesis Doctoral se caracterizó el interactoma de LOXL1, una proteína desregulada en el secretoma de la línea celular de CCR KM12L4 que metastatiza a pulmón, y cuyo papel en CCR parece estar relacionado con la regulación de los procesos de adhesión e invasión celular. El análisis de su interactoma mediante espectrometría de masas ha permitido identificar otros procesos en los que está implicada LOXL1, así como las proteínas a través de las cuales participa en dichos procesos.

## 25.2.PAUF

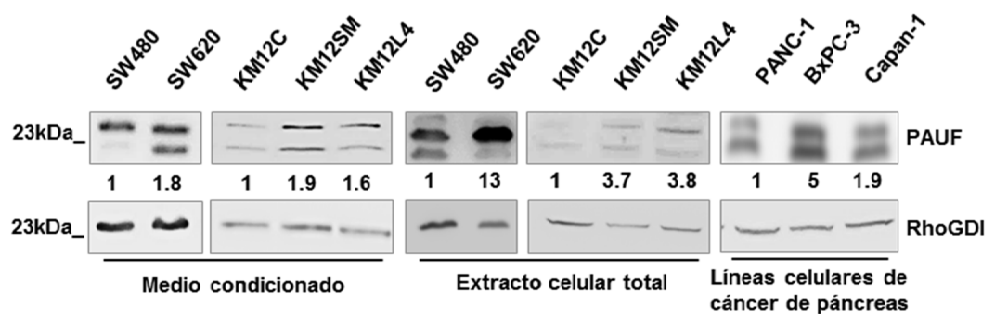
PAUF se había identificado previamente en el laboratorio como una proteína sobre-expresada en las células KM12SM altamente metastásicas en comparación con las células parentales KM12C pobremente metastásicas (121). Además, PAUF se identificó como una proteína significativamente regulada a la baja ( $p < 0,02$ ) en las muestras tumorales respecto de las muestras normales, en el experimento de proteómica cuantitativa *label free* de las 42 muestras de tejidos normales y tumorales de colon de 21 pacientes con CCR.

### 25.2.1. Estudio de la expresión de PAUF en CCR

En primer lugar, se analizó la expresión de PAUF a nivel de proteína, en el extracto celular total y en el medio condicionado de diferentes líneas celulares de CCR así como en diferentes muestras de tejidos de un total de 13 pacientes con CCR. En segundo lugar, se analizó el nivel de expresión de mRNA de PAUF en diferentes tejidos de colon y recto, utilizando la base de datos de Oncomine.

#### 25.2.1.1. **El nivel de expresión de PAUF es mayor en el extracto celular total y en el medio condicionado de las líneas celulares de CCR altamente metastásicas en comparación con las líneas parentales pobremente metastásicas**

Se analizó la expresión de PAUF, mediante WB, en un panel de líneas celulares de CCR así como en tres líneas celulares de cáncer de páncreas que sirvieron de control (Figura 37).



**Figura 37. Análisis de la expresión de PAUF en varias líneas celulares de CCR y de cáncer de páncreas.** El nivel de expresión de PAUF se analizó en el medio condicionado y en el extracto celular total de un panel de líneas celulares de CCR y en tres líneas celulares de cáncer de páncreas. Se resolvieron 30  $\mu$ g de proteína en SDS-PAGE al 12,5% y se sometieron a transferencia utilizando anti-rhPAUF y anti-RhoGDI, que se utilizó como control de carga. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría óptica y el incremento en la intensidad de las bandas de las muestras SW620 respecto de las SW480; de las KM12SM y KM12L4 respecto de las KM12C; y de las BxPC-3 y Capan-1 respecto de las PANC-1 se muestra con números en la parte inferior del WB de PAUF.

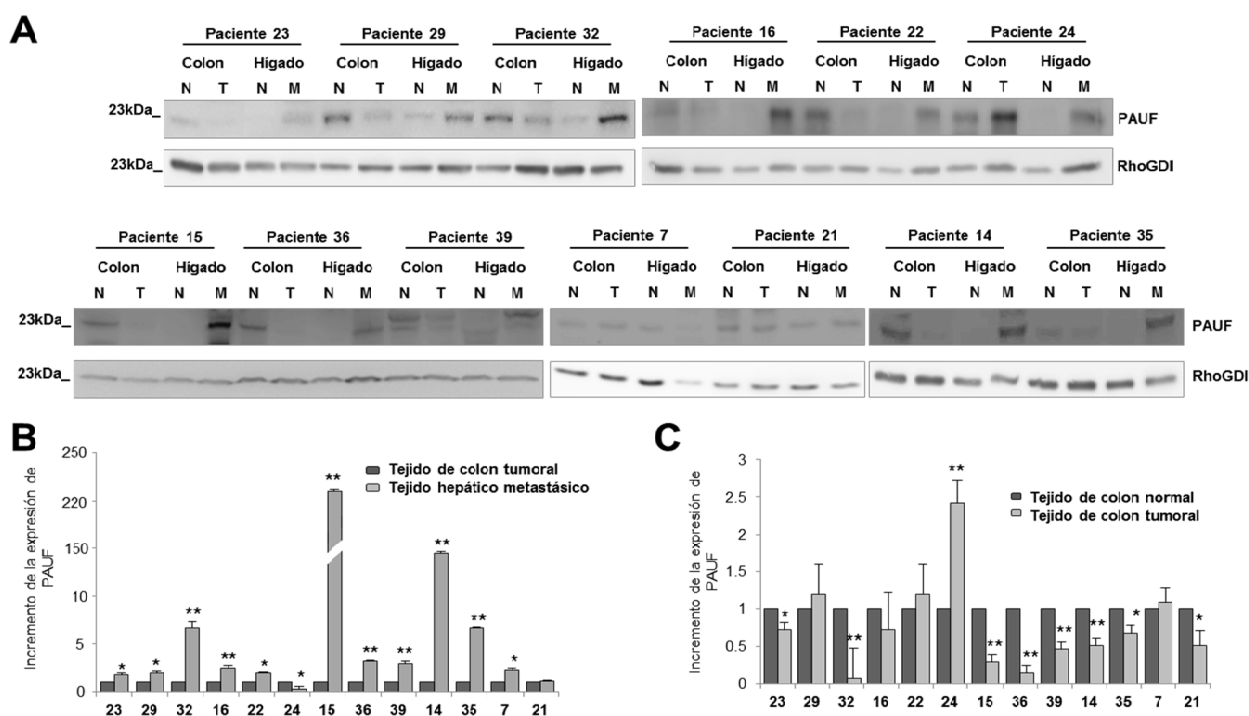
Como líneas de CCR se utilizaron el par isogénico SW480 y SW620, y las líneas celulares también isogénicas KM12C, KM12SM y KM12L4. La expresión de PAUF se analizó tanto en el medio condicionado (para detectar a PAUF secretado) como en el extracto celular total de estas líneas celulares. Como control de carga, para ambas fracciones, se utilizó la proteína RhoGDI. Se observó una doble banda para PAUF, posiblemente correspondiente a las formas N-glicosiladas y no glicosiladas de PAUF, descritas previamente (143). La cuantificación del nivel de expresión de PAUF mediante densitometría óptica reveló que la expresión de PAUF era mayor en las líneas celulares altamente metastásicas (SW620, KM12SM y KM12L4) en comparación con sus respectivas líneas celulares parentales pobremente metastásicas (SW480 y KM12C, respectivamente).

#### 25.2.1.2. La expresión de PAUF disminuye en el tejido tumoral primario para luego aumentar en la metástasis hepática del CCR

A continuación, se valoró la expresión de PAUF en una serie de muestras de extractos proteicos de piezas de tejido de pacientes con CCR. De estos pacientes se

## RESULTADOS

disponía de tejido de colon normal y tumoral, así como de tejido hepático normal y metastásico. Como control de carga se utilizó RhoGDI. Se observó distinto patrón de glicosilación de PAUF en las distintas muestras analizadas (Figura 38A). La cuantificación de la expresión de PAUF mediante densitometría óptica reveló que la expresión de PAUF en el tejido hepático metastásico era mayor que en el tejido tumoral de colon, en prácticamente todos los pacientes analizados (Figura 38B). Además, la expresión de PAUF fue mayor en la mucosa normal de colon comparado con el tejido tumoral (pacientes 23, 32, 15, 36, 39, 14, 35, 21) (Figura 38C).

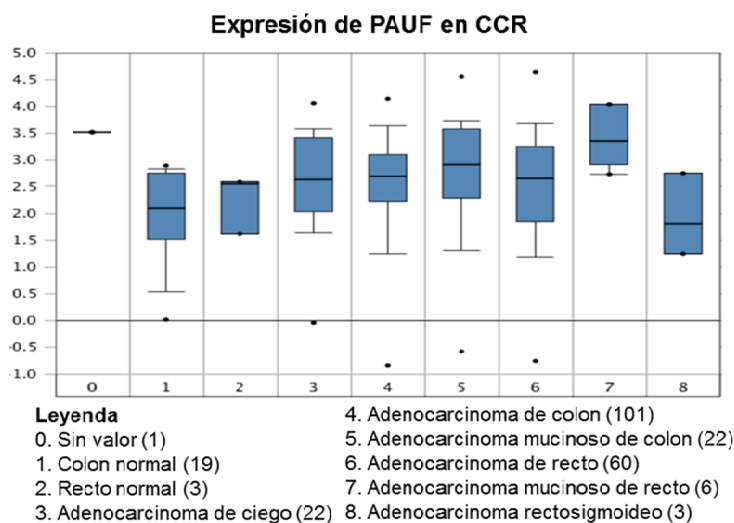


**Figura 38. Análisis de la expresión de PAUF en tejidos de pacientes con CCR.** A) El nivel de expresión de PAUF en colon normal (N), colon tumoral (T), hígado normal (N) y metástasis hepática (M) de 13 pacientes con CCR fue examinado por WB. Para ello, 30  $\mu$ g de extracto tisular proteico se resolvieron en SDS-PAGE al 12,5% y se sometieron a transferencia utilizando anti-rhPAUF o anti-RhoGDI como control de carga. (B y C) La intensidad de las bandas se cuantificó mediante densitometría óptica y el incremento del nivel de expresión de PAUF entre el tejido de colon tumoral y el tejido de hígado metastásico (B), y entre el tejido de colon normal y tumoral (C) se representó mediante diagramas de barras. La significatividad de los datos se calculó mediante una prueba de ANOVA (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

En conjunto, estos resultados sugieren una pérdida inicial de la expresión de PAUF en el tumor primario, seguida de una recuperación en la metástasis hepática.

### 25.2.1.3. Expresión del mRNA de PAUF en CCR

En segundo lugar, se realizó un meta-análisis de los niveles de expresión de PAUF a nivel de mRNA en distintos tipos de cánceres de colon y recto, utilizando las bases de datos Oncomine (187, 188). Los niveles de mRNA de PAUF fueron superiores en los tejidos tumorales de colon y recto, respecto de la mucosa normal (Figura 39).



**Figura 39. Análisis de los niveles de mRNA de PAUF en CCR.** Los niveles relativos de expresión génica de PAUF en distintos tejidos normales y tumorales de cáncer de colon y recto se analizaron mediante un meta-análisis basado en los datos recogidos en las bases de datos Oncomine y Cancer Genome Atlas (TCGA).

Estos datos transcriptómicos están en desacuerdo con el nivel de expresión de la proteína PAUF, lo que puede deberse a diferencias entre la estabilidad del mRNA y de la proteína, a la existencia de modificaciones pos-traduccionales (por ejemplo, glicosilación) o a la distinta ubicación celular de estas moléculas.

### 25.2.2. Silenciamiento de PAUF en distintas líneas celulares de CCR

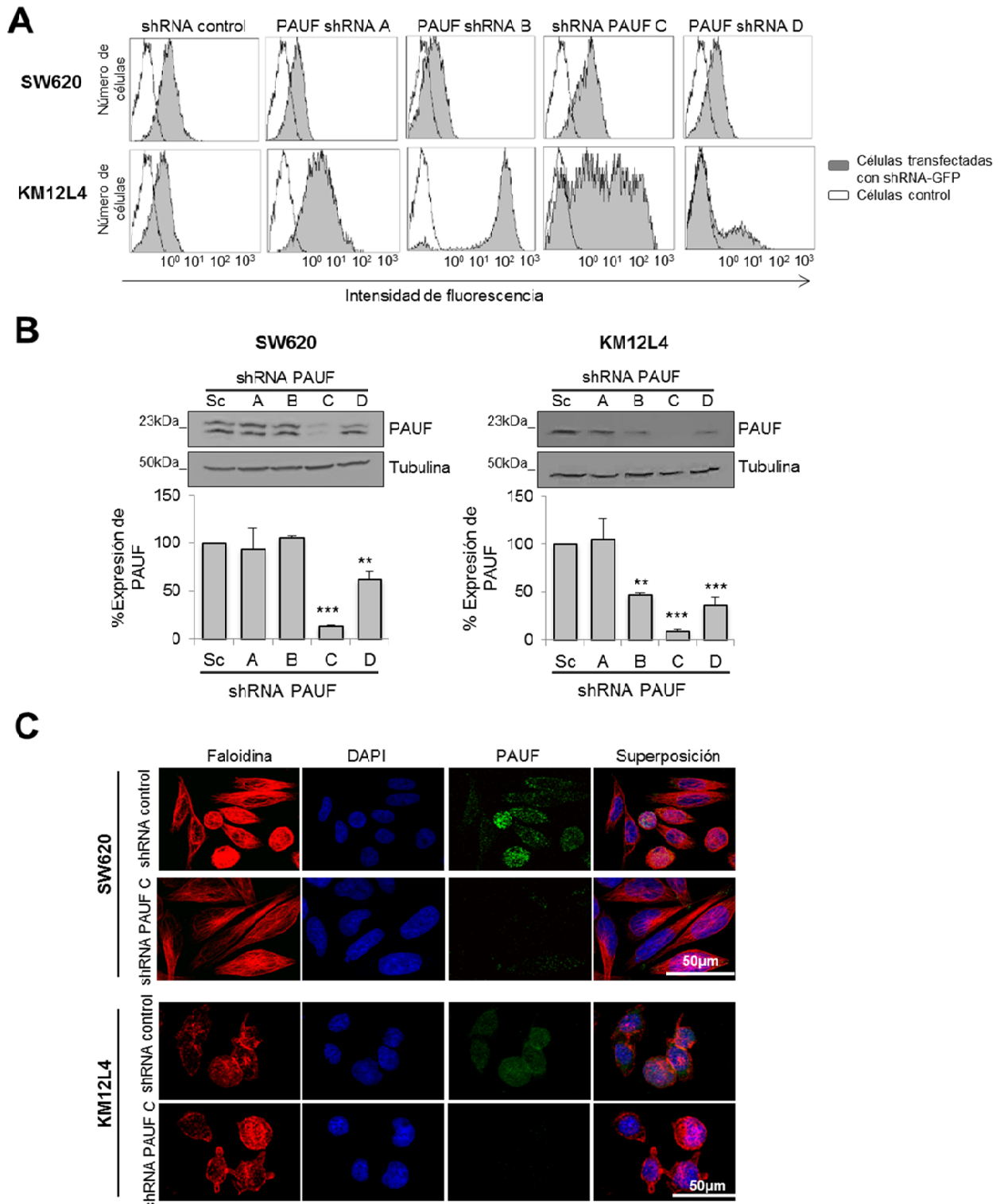
A continuación, se llevó a cabo el silenciamiento de PAUF en las líneas celulares metastásicas de CCR donde aparece sobre-expresada, además de en otras líneas celulares de CCR.

### **25.2.2.1. Silenciamiento estable de PAUF en las líneas celulares SW620 y KM12L4**

Para silenciar de manera estable a PAUF en las líneas celulares SW620 y KM12L4 se realizó la infección lentiviral en ambas líneas celulares con vectores pGFP-C-shLenti conteniendo 4 shRNAs diferentes: A, B, C y D que reconocen distintas secuencias de PAUF humano, y un shRNA control. La infección celular con cada uno de los vectores pGFP-C-shLenti se confirmó valorando la intensidad de GFP de las células infectadas, por citometría de flujo (Figura 40A). En todos los casos, las poblaciones de células infectadas tuvieron mayores niveles de GFP en comparación con las células SW620 y KM12L4 sin infectar. La bajada de la expresión de PAUF se valoró por WB (Figura 40B). Tanto en las células SW620 como en las KM12L4, los clones C y D, que contienen shRNAs frente a las secuencias de PAUF ACTGAGCCACCAGTTAATCTCACATACTC y ATGGAATTATCCACTAGAGGAGCCGACCA, respectivamente, fueron los que mostraron mayor bajada de la expresión de PAUF. La cuantificación del nivel de expresión de PAUF por densitometría óptica reveló que la bajada de expresión de PAUF fue de aproximadamente un 90% en el clon C y un 50% en el clon D, respecto de las células establemente transfectadas con el shRNA control, en ambas líneas celulares. Por último, la bajada del nivel de expresión de PAUF en los clones C respecto de los controles se corroboró mediante inmunofluorescencia (Figura 40C).

Por tanto, los clones C y D, así como los controles, fueron los clones seleccionados para ser utilizados en posteriores experimentos.

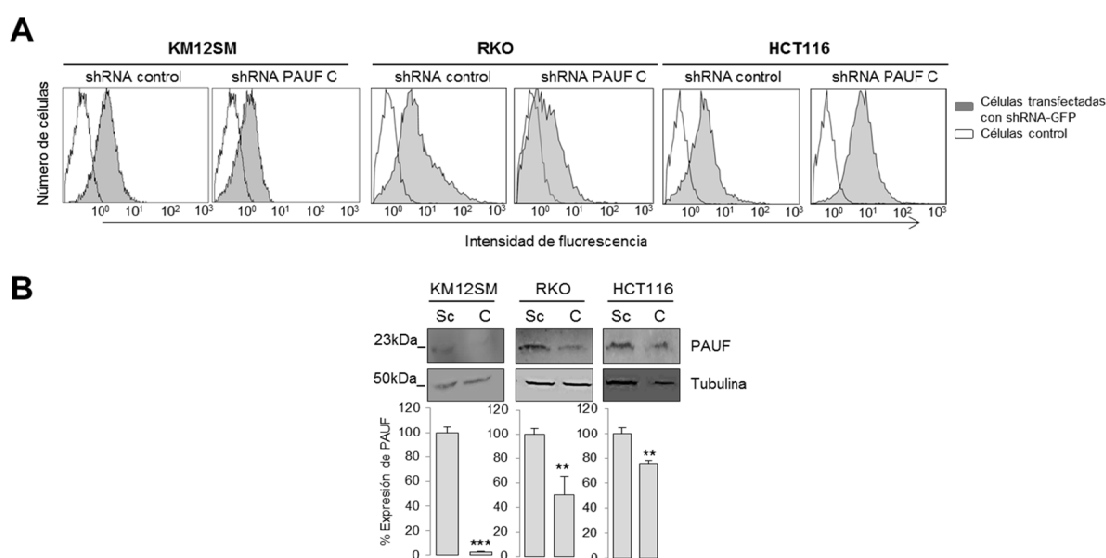
## RESULTADOS



**Figura 40. Silenciamiento estable de PAUF en las líneas celulares SW620 y KM12L4.** A) Análisis, mediante citometría de flujo, del contenido en GFP de las líneas celulares SW620 y KM12L4 infectadas con vectores pGFP-C-shLenti conteniendo 4 shRNAs diferentes (A, B, C y D) para la proteína PAUF, además del shRNA control. B) Los extractos proteicos totales de estas células se analizaron por WB para evaluar el nivel de expresión de PAUF. El nivel de expresión de PAUF disminuyó significativamente en las células SW620 shRNA PAUF C (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) y D (\*\*  $p < 0,01$ ) y en las células KM12L4 shRNA PAUF B (\*\*  $p < 0,01$ ), C y D (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) con respecto de las células control (Sc). El porcentaje de expresión de PAUF se midió por densitometría óptica usando el programa Multi Gauge v. 3. C) Las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF (shRNA PAUF C) así como las células control (shRNA control) se analizaron mediante inmunofluorescencia. Se detectaron los núcleos celulares con DAPI (azul), la actina con faloidina (rojo) y a PAUF (verde).

### 25.2.3. Silenciamiento transitorio de PAUF en las líneas celulares KM12SM, RKO y HCT116 mediante shRNAs

Las líneas celulares KM12SM, RKO y HCT116 se transfectaron de manera transitoria con los vectores pGFP-C-shLenti conteniendo los shRNA PAUF C y control. 48 h después se confirmó la eficacia de la transfección valorando la intensidad de GFP de las células por citometría de flujo (Figura 41A). A continuación, la bajada de expresión de PAUF se testó por WB (Figura 41B). La cuantificación del WB mediante densitometría óptica mostró que en las células KM12SM, la transfección del vector pGFP-C-shLenti shRNA PAUF C disminuía la expresión de PAUF un 90%, mientras que en las células RKO y HCT116 bajaba un 50% y un 30%, respectivamente, en comparación con las células transfectadas con el vector pGFP-C-shLenti shRNA control.

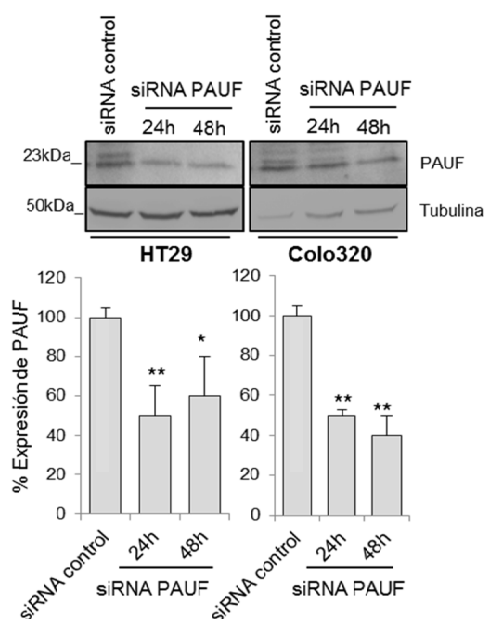


**Figura 41. Silenciamiento transitorio de PAUF mediante shRNAs.** (A y B) Las células KM12SM, RKO y HCT116 se transfectaron de manera transitoria con los vectores pGFP-C-shLenti-shRNA PAUF C y control y a las 48 h se valoró la eficacia de la transfección (A) y la disminución de la expresión de PAUF (B). A) Análisis, mediante citometría de flujo, del contenido en GFP de las líneas celulares KM12SM, RKO y HCT116 transfectadas de manera transitoria con los vectores pGFP-C-shLenti-shRNA PAUF C y control. B) Los extractos proteicos totales de estas células se analizaron por WB para evaluar el nivel de expresión de PAUF. El nivel de expresión de PAUF disminuyó significativamente en células KM12SM, RKO y HCT116 transfectadas con el vector pGFP-C-shLenti-shRNA PAUF C (C) en comparación con las células transfectadas con el vector control (Sc). Los datos del porcentaje de expresión de PAUF representan la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes (\*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001).

Así, los experimentos en los que se llevó a cabo el silenciamiento transitorio de PAUF en estas líneas celulares se realizaron a las 48 h de la transfección.

### 25.2.2.3. Silenciamiento transitorio de PAUF en las líneas celulares HT29 y Colo320 mediante siRNAs

Con el objetivo de ampliar el panel de líneas celulares de CCR silenciadas en PAUF, así como para utilizar otro método de silenciamiento diferente a la utilización de shRNAs frente a PAUF, se llevó a cabo el silenciamiento transitorio de PAUF en las líneas celulares HT29 y Colo320 mediante siRNAs. Las células se incubaron durante 24 y 48 h con el siRNA específico frente a PAUF o con el siRNA control y se lisaron para obtener el extracto celular total. A continuación se realizó un WB para analizar la bajada del nivel de expresión de PAUF (Figura 42). La mayor bajada del nivel de expresión de PAUF en la línea celular HT29 se observó a las 24 h de la transfección. Por otro lado, en las células Colo320, la mayor bajada del nivel de expresión de PAUF, cerca de un 60%, se produjo a las 48 h de la transfección.

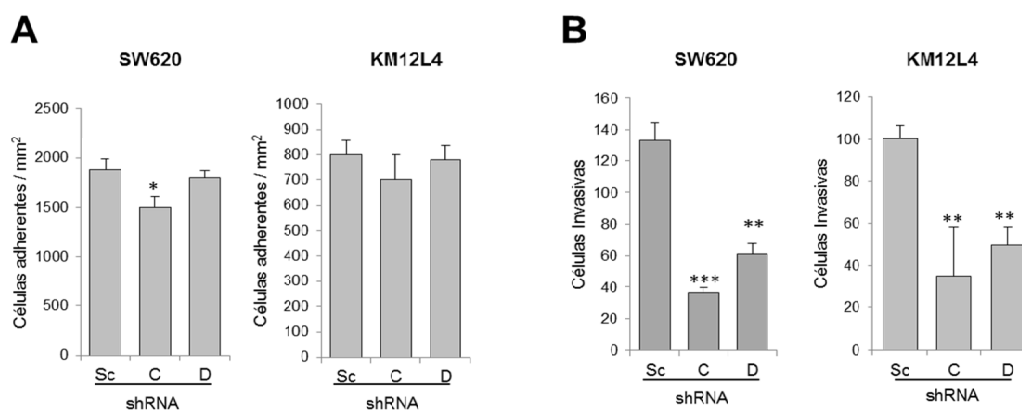


**Figura 42. Silenciamiento transitorio de PAUF mediante siRNAs.** Las células HT29 y Colo320 se transfectaron de manera transitoria con siRNAs específicos para PAUF y se obtuvo el extracto proteico celular total a las 24 y 48 h después de la transfección. 30  $\mu$ g de cada extracto se resolvieron en SDS-PAGE al 12,5% y se sometieron a transferencia utilizando anti-rhPAUF o anti-tubulina como control de carga. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante densitometría óptica y se representa mediante diagramas de barras. En ellos se refleja la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

De esta manera, los experimentos en los que se llevó a cabo el silenciamiento transitorio de PAUF en las líneas celulares HT29 y Colo320 se realizaron a las 24 y 48 h de la transfección, respectivamente.

### **25.2.3. El silenciamiento estable de PAUF provoca un descenso en la adhesión e invasión de las células SW620 y KM12L4**

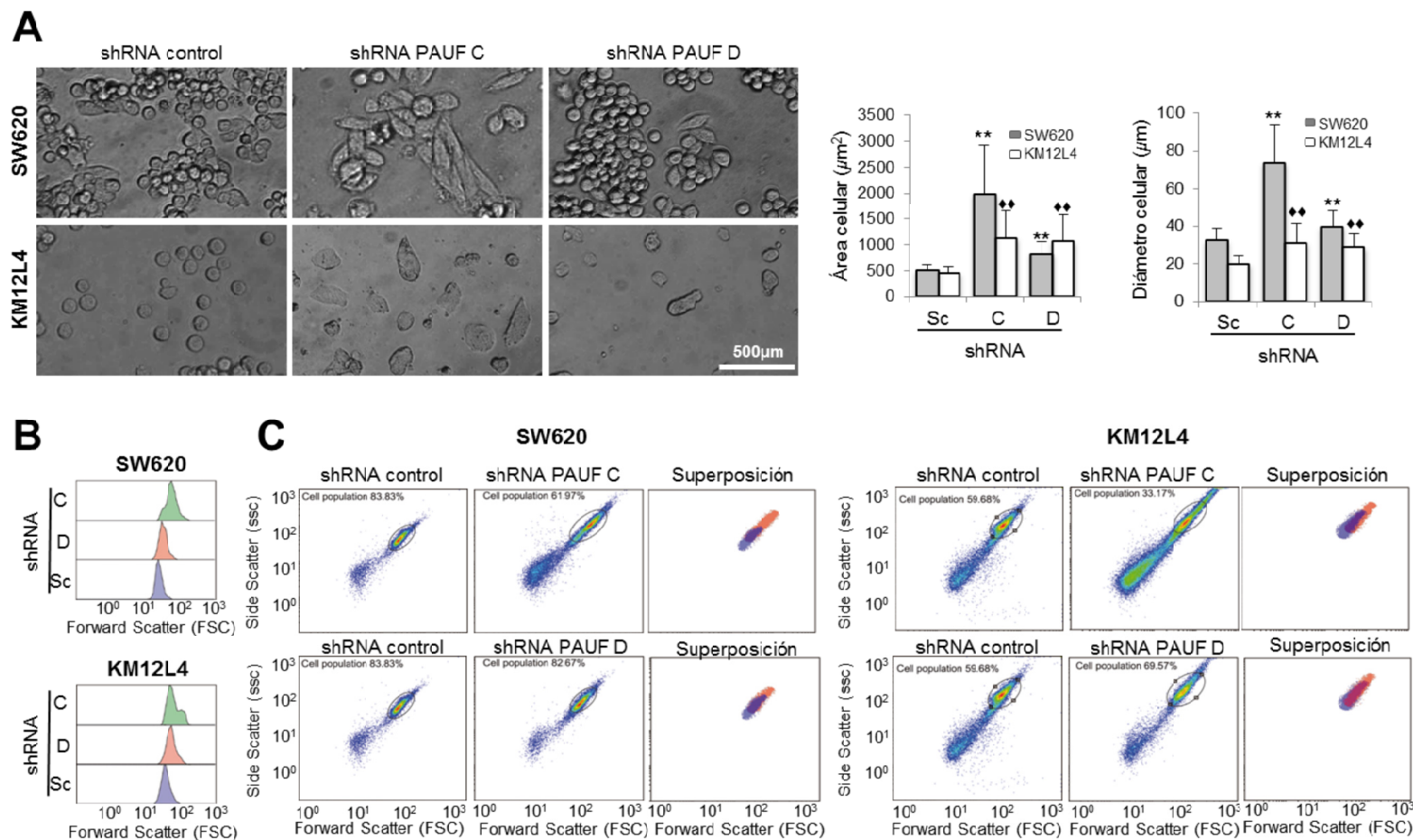
Previamente nuestro laboratorio describió que el silenciamiento transitorio de PAUF con siRNAs, así como su bloqueo con un anticuerpo específico bloqueante, disminuía la capacidad de adhesión e invasión de las células KM12SM (121). Por ello, en primer lugar se corroboró el efecto que tiene el silenciamiento de PAUF sobre las capacidades de invasión y adhesión de las células SW620 y KM12L4 (Figura 43). El silenciamiento estable de PAUF disminuyó significativamente la capacidad de adhesión de las células SW620 (Figura 43A). Aunque el silenciamiento de PAUF en las células KM12L4 también disminuyó la adhesión celular, no lo hizo de manera significativa. Por otro lado, el silenciamiento estable de PAUF disminuyó significativamente la capacidad de invasión de ambas líneas celulares (Figura 43B).



**Figura 43. Análisis del efecto del silenciamiento estable de PAUF sobre la adhesión y la invasión celular.** A) La adhesión a Matrigel de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF se determinó después de mantener a éstas células en medio sin suero durante 5 h. Se observó una disminución significativa de la adhesión en las células SW620 establemente infectadas con el vector pGFP-C-shLenti-shRNA PAUF C en comparación con las células control. La tendencia fue la misma en las células KM12L4. Sin embargo, la diferencia en la adhesión de las células establemente silenciadas en PAUF respecto de las células control no fue significativa. B) Estudio de la capacidad de invasión, mediante cámaras “Transwell” con Matrigel, de las células SW620 (izquierda) y KM12L4 (derecha) control y establemente silenciadas en PAUF. La capacidad de invasión se redujo más del doble en las células silenciadas en PAUF con respecto a las células control en ambas líneas celulares. Los datos representan la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

#### 25.2.4. El silenciamiento estable de PAUF aumenta el tamaño y la complejidad de las células SW620 y KM12L4

A continuación, se investigaron los efectos del silenciamiento estable de PAUF sobre el fenotipo de las células SW620 y KM12L4. Mediante microscopía óptica y posterior cuantificación de las imágenes con el programa ImageJ, se observó que las líneas celulares SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF tenían un incremento significativo en el área y en el diámetro celular en comparación con las células control (Figura 44A).



**Figura 44. Análisis fenotípico de las células establemente silenciadas en PAUF.** Los cambios sobre la morfología y el tamaño celular producidos por el silenciamiento de PAUF se analizaron mediante microscopía de campo claro y citometría de flujo. (A) Las imágenes de campo claro, obtenidas a la misma escala, de las células SW620 y KM12L4 control y establemente transfectadas con los vectores pGFP-C-shLenti-shRNA PAUF C y D se utilizaron para cuantificar el diámetro celular (en  $\mu\text{m}$ ) y el área (en  $\mu\text{m}^2$ ) con el programa ImageJ. Los p-valor se calcularon usando una prueba de ANOVA (\*\*  $p < 0,01$  para las células SW620; ♦♦  $p < 0,01$  para las células KM12L4). (B) El tamaño celular de todas las poblaciones celulares estudiadas se midió por citometría mediante el Forward Scatter (FSC). (C) Análisis conjunto del tamaño y la complejidad celular mediante el Side Scatter (SSC) de todas las poblaciones celulares estudiadas.

Cabe destacar que este aumento fue directamente proporcional a la bajada del nivel de expresión de PAUF, de tal manera que los clones C, en los que la expresión de PAUF disminuye un 90% con respecto a las células control, fueron los que tuvieron mayor incremento en el área y en el diámetro celular. Posteriormente, se corroboró el aumento en el tamaño celular de estas células por citometría de flujo (Figura 44B). Las poblaciones celulares establemente silenciadas en PAUF mostraron, además de un aumento en el tamaño celular, un aumento en la complejidad y en la granularidad celular en comparación con las poblaciones de células control (Figura 44C). De nuevo, los cambios observados fueron directamente proporcionales a la bajada de expresión de PAUF.

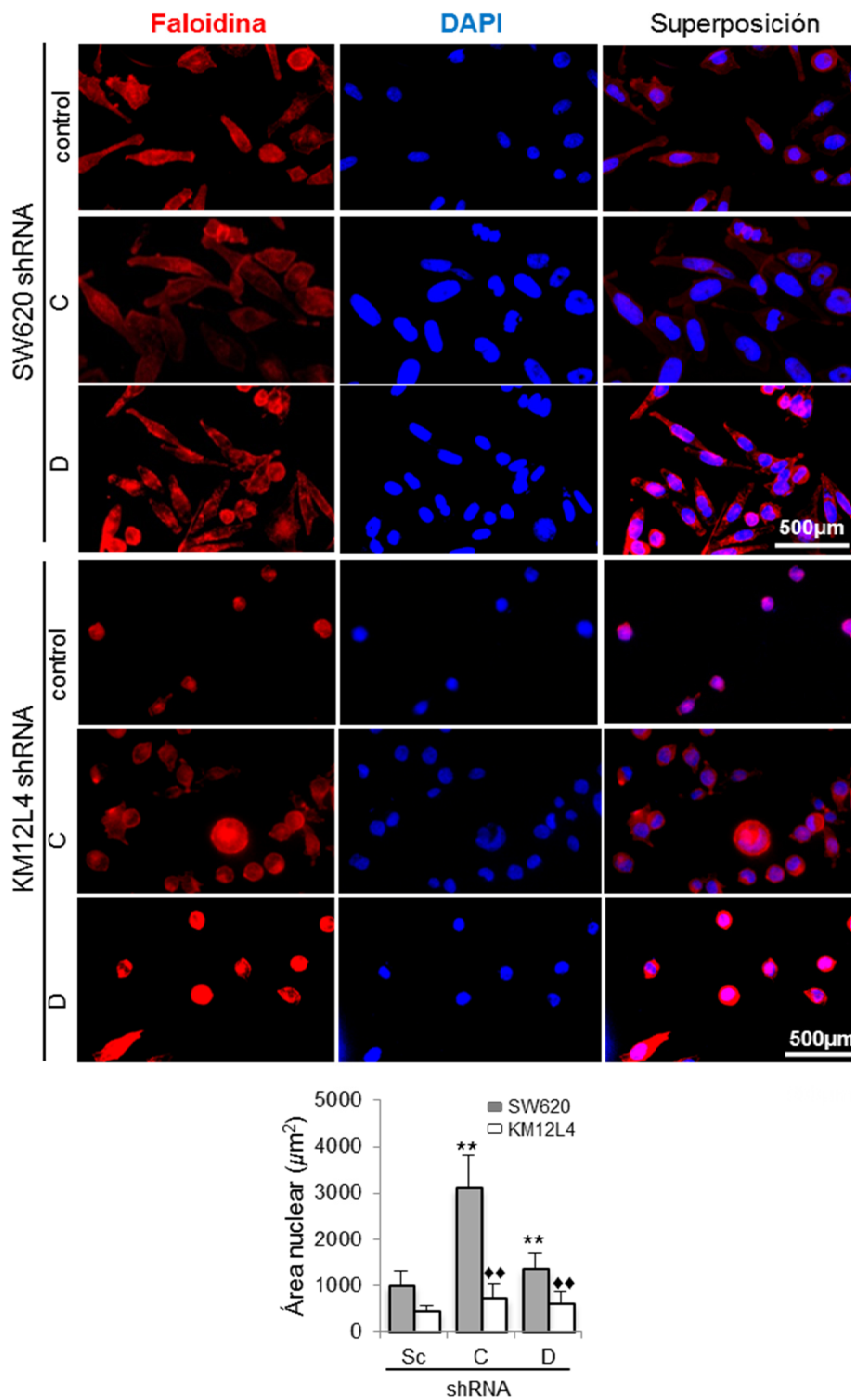
En resumen, el silenciamiento estable de PAUF en las células SW620 y KM12L4 provoca cambios en el tamaño y en la complejidad celular. A continuación, se investigaron las razones de estos cambios.

#### **25.2.5. El silenciamiento estable de PAUF aumenta el tamaño nuclear de las células SW620 y KM12L4**

Puesto que un aumento en el tamaño celular puede ser debido a un incremento en el tamaño nuclear (224), se analizó el tamaño nuclear de las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF mediante microscopía confocal. Se detectó la actina con faloidina y el núcleo celular con DAPI y se observó que las células silenciadas en PAUF tenían un núcleo de mayor tamaño que las células control (Figura 45).

La cuantificación del área nuclear de estas células reveló que el incremento en el tamaño nuclear era directamente proporcional a la bajada del nivel de expresión de PAUF. Así, los clones C mostraron un aumento del área nuclear con

respecto a las células control de un 300% en el caso de la línea celular SW620 y de un 100% en las células KM12L4.

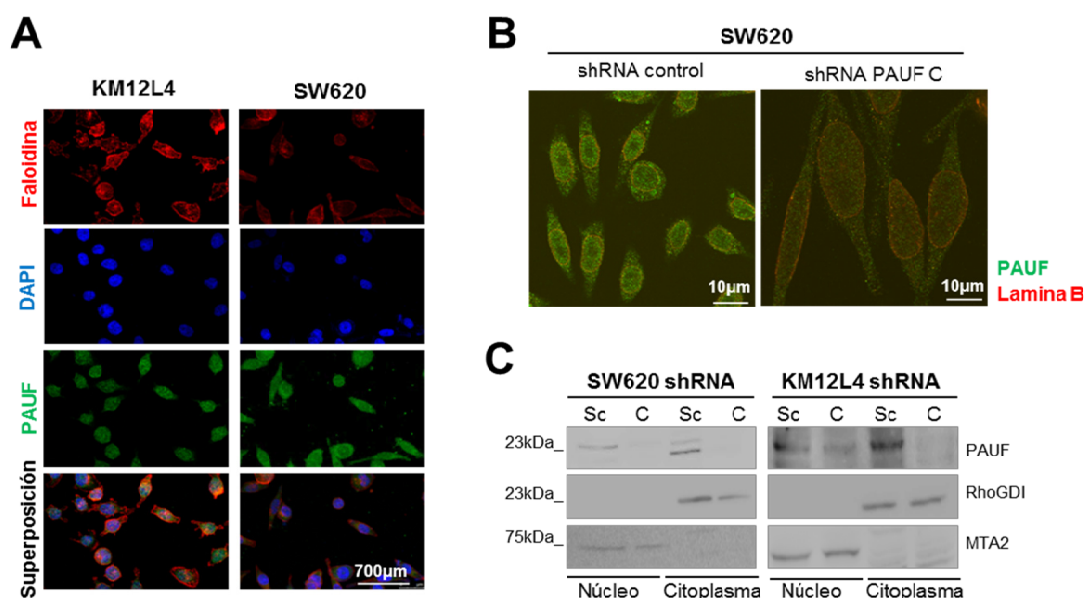


**Figura 45. Análisis del tamaño nuclear de las células establemente silenciadas en PAUF.** Los cambios sobre el tamaño nuclear producidos por el silenciamiento de PAUF se analizaron mediante microscopía confocal. Los transfectantes estables SW620 y KM12L4 se tiñeron con DAPI (azul) y faloidina (rojo) y se cuantificó el área nuclear (en  $\mu\text{m}^2$ ), de al menos 300 células por condición, con el programa ImageJ. Los p-valor se calcularon usando una prueba ANOVA (\*\*  $p < 0,01$  para las células SW620; ♦♦  $p < 0,01$  para las células KM12L4).

Las células SW620 mostraron, en general, núcleos de mayor tamaño que los de las células KM12L4, y además con una morfología fusiforme.

### 25.2.6. Análisis de la localización celular de PAUF

Hasta el comienzo de esta Tesis Doctoral, PAUF se había descrito como una proteína secretada, que parecía estar involucrada principalmente en procesos de adhesión e invasión celular (143, 151), no en el incremento de la complejidad y el tamaño celular y nuclear. Por ello, posteriormente se estudió la localización celular de PAUF en las líneas celulares parentales SW620 y KM12L4, mediante microscopía confocal (Figura 46A).

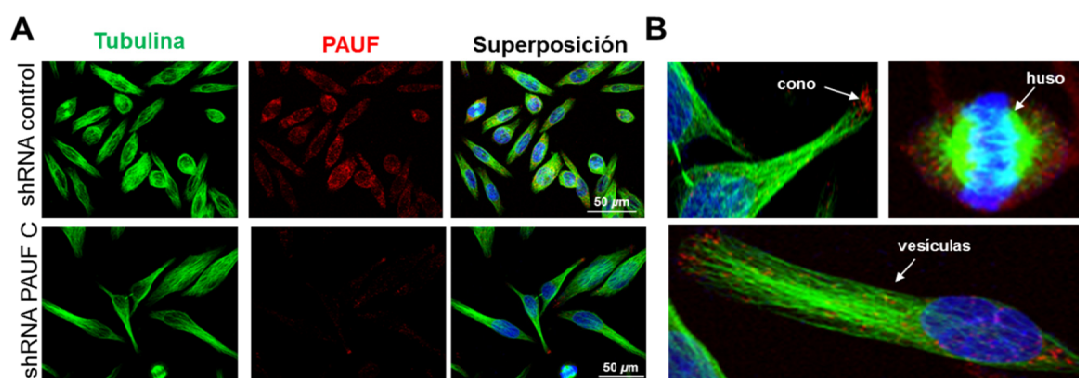


**Figura 46. Análisis de la localización nuclear de PAUF.** La localización nuclear de PAUF se analizó por microscopía confocal y se confirmó por WB. A) Las células SW620 y KM12L4 parentales se tiñeron con DAPI (azul), faloidina (rojo) y con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con fluoróforo verde para detectar al anticuerpo primario anti-rhPAUF y se analizaron por microscopía confocal. B) La localización nuclear de PAUF se corroboró mediante otro experimento de microscopía confocal, donde en las células SW620 control y silenciadas en PAUF se detectó a la proteína de la periferia nuclear lamina B (rojo) y a PAUF (verde). C) 30  $\mu$ g de extracto nuclear y citoplasmático de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF se sometieron a un ensayo de WB, utilizando anti-RhoGDI como control de carga citoplasmático y anti-MTA2 como control de carga nuclear.

PAUF presentó una tinción tanto citoplasmática como nuclear en ambas líneas celulares. Para profundizar en el análisis de la localización celular de PAUF,

se realizó otro experimento de microscopía confocal con las células SW620 control (SW620 shRNA control) y establemente silenciadas en PAUF (SW620 shRNA PAUF C), donde se detectó a PAUF en verde y a lámina B (marcador de la envuelta nuclear) en rojo (Figura 46B). PAUF mostró una fuerte tinción nuclear, no homogénea, sin tinción nucleolar. Finalmente, para corroborar la localización nuclear de PAUF, se realizó un WB de las fracciones citosólica y nuclear de las células SW620 y KM2L4 control y silenciadas en PAUF. PAUF se detectó tanto en la fracción citosólica como en la nuclear de las células control, no así de las células establemente silenciadas en PAUF (Figura 46C). Estos resultados demostraron que, además de ser una proteína secretada, PAUF tiene una localización celular citosólica y nuclear en estas líneas de CCR.

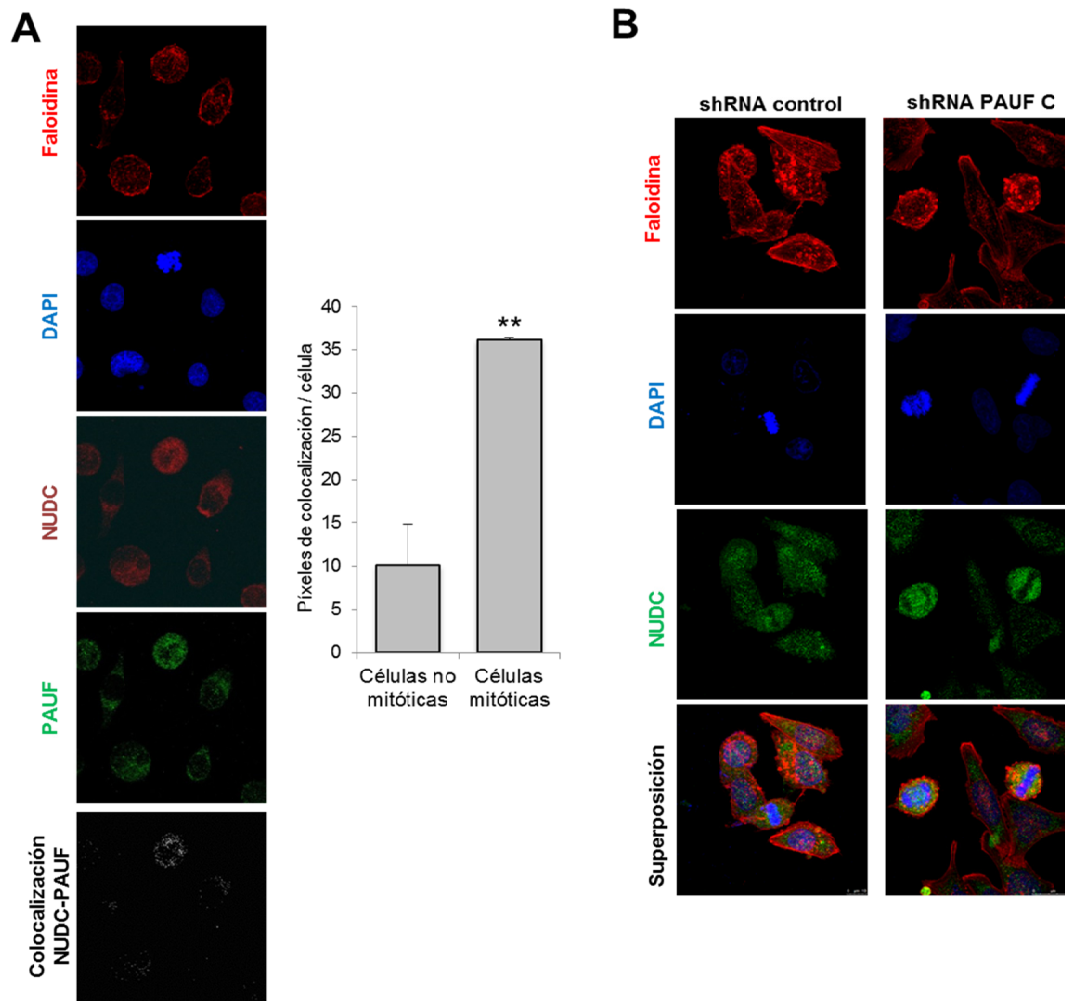
Por otro lado, la tinción doble de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF, con tubulina (en verde) y PAUF (en rojo) reveló una asociación entre la distribución celular de PAUF y el típico patrón de localización celular de tráfico vesicular asociado a los microtúbulos (Figura 47A).



**Figura 47. Análisis de la localización celular de PAUF.** A) El estudio de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF mediante microscopía confocal permitió observar la asociación de PAUF (rojo) con tubulina (verde). B) La ampliación y el análisis en detalle de estas imágenes reveló que PAUF se asocia al tráfico vesicular asociado a microtúbulos, a los conos de crecimiento y a los microtúbulos del huso mitótico. Los núcleos de las células se detectaron con DAPI (azul).

Esta distribución celular de PAUF está de acuerdo con su asignación como proteína secretada. Además, se observó que PAUF se concentra principalmente en la punta de los conos de crecimiento y se asocia con el huso mitótico (Figura 47B).

Para corroborar la localización de PAUF en el huso mitótico, se realizó la tinción doble de las células parentales SW620 con PAUF y NUDC (Figura 48A), una proteína que se localiza en el huso mitótico y es clave en la mitosis y la citoquinesis celular (225). Ambas proteínas mostraron el mismo patrón de localización celular: presentaron tinción citoplasmática y se localizaron en los microtúbulos del huso mitótico. De hecho, la colocalización de NUDC y PAUF fue mayor en las células en mitosis, como así lo revela el análisis de los píxeles de colocalización por célula mediante el programa ImageJ. A continuación se comprobó si la localización en el huso mitótico de NUDC dependía de la presencia de PAUF. Para ello, se analizó la expresión de NUDC en las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF mediante inmunofluorescencia (Figura 48B). NUDC se localizó correctamente en el huso mitótico de células en mitosis en ambos tipos celulares, por lo que su distribución en las células mitóticas es independiente de la presencia de PAUF.



**Figura 48. Comparación de la distribución celular de PAUF y NUDC.** A) Las células SW620 parentales se analizaron por inmunofluorescencia para detectar la actina con faloidina (rojo), los núcleos celulares con DAPI (azul), NUDC (rojo lejano) y PAUF (verde). Las imágenes se analizaron con el *plugin* “Leica” del programa ImageJ para detectar y cuantificar los píxeles coincidentes de las imágenes obtenidas para PAUF y NUDC. Los puntos blancos de la imagen de colocalización de PAUF y NUDC hacen referencia a los puntos donde colocalizan dichas proteínas. A la derecha, se representa, en un diagrama de barras, el incremento en el número de píxeles de colocalización de ambas proteínas en las células en mitosis comparado con las células que no están en mitosis. B) Las células SW620 control y silenciadas en PAUF se analizaron por inmunofluorescencia para estudiar la distribución de NUDC en ambos tipos celulares. Se detectó a la actina con faloidina (rojo), al núcleo celular con DAPI (azul) y a NUDC en verde.

En resumen, PAUF muestra una distribución ubicua dentro de la célula. Se encuentra en el núcleo celular y en el citosol, asociándose a microtúbulos y a los conos de crecimiento. La distribución de PAUF en la célula recuerda enormemente a la localización celular de APC, una proteína asociada a microtúbulos con presencia en las puntas del cono de crecimiento y en el huso mitótico. La capacidad de unión de APC a los microtúbulos parece ser responsable de su papel en

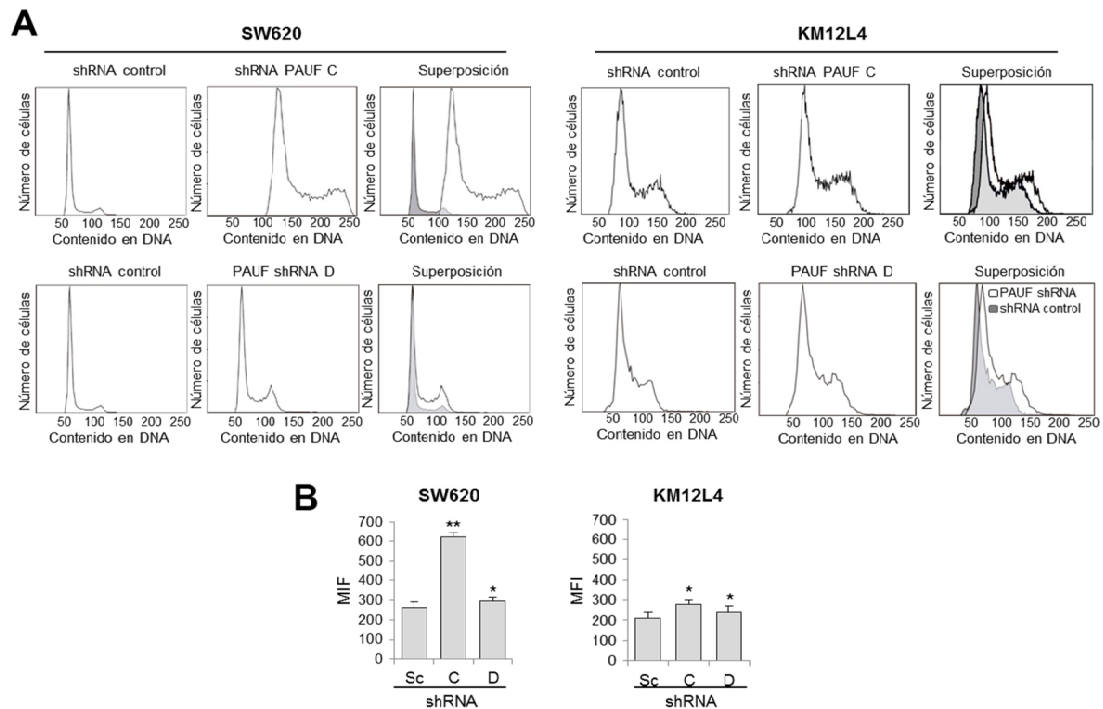
migración celular y en la formación de huso mitótico (226, 227). Este último papel de APC es clave para el mantenimiento de la integridad celular, ya que la pérdida de APC promueve desregulación cromosómica (50, 63), lo que conduce a aneuploidía e inestabilidad cromosómica (CIN).

#### **25.2.7. Análisis del perfil de ciclo celular de las células de CCR silenciadas en PAUF**

Se estudiaron los efectos del silenciamiento de PAUF en el ciclo celular. Para ello, se llevó a cabo el análisis, mediante citometría de flujo, del perfil del ciclo celular de las células de CCR control y silenciadas en PAUF.

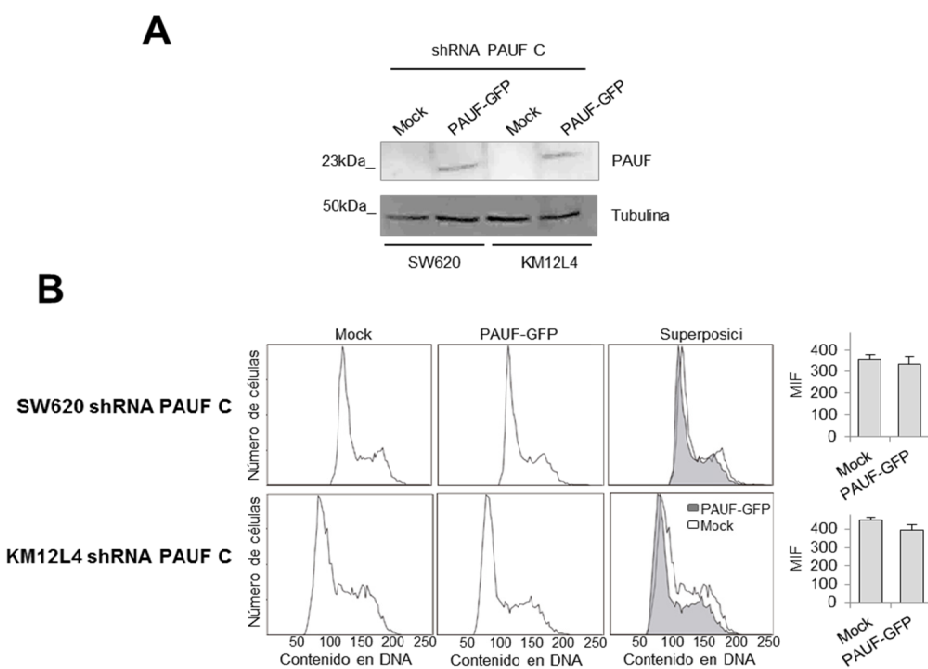
##### **25.2.7.1. El silenciamiento estable de PAUF modifica el perfil de ciclo celular de las células SW620 y KM12L4**

Para analizar el perfil de ciclo celular de las células SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas en PAUF, las células se fijaron, se incubaron con yoduro de propidio y se valoró su contenido en DNA por citometría de flujo, tal y como se detalla en el apartado 14.1. El perfil del ciclo celular de las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF estaba desplazado a la derecha en comparación con las células control (Figura 49), lo que indica que las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF tenían mayor contenido de DNA que las células control. El incremento en el contenido de DNA de las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF se corroboró cuantificando la media de la intensidad de fluorescencia (MIF) del yoduro de propidio (Figura 49B). La MIF de las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF fue significativamente mayor que la de las células control. Este efecto fue particularmente drástico en las células SW620, las cuales se volvieron tetraploides. El silenciamiento estable de PAUF en estas líneas celulares produjo, además, una ampliación de la fase G1 del ciclo celular.



**Figura 49. Análisis del perfil de ciclo celular de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF.** A) El análisis del contenido en DNA de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF mediante citometría de flujo y su representación en forma de histograma donde el eje y hace referencia al número de células y el eje x al contenido en DNA, permitió observar el desplazamiento hacia la derecha del perfil de ciclo de las células establemente silenciadas en PAUF comparado con las células control. Se muestra el perfil de ciclo de un experimento representativo. B) El incremento en el contenido en DNA de las células silenciadas en PAUF se corroboró valorando la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) para el canal FL3 (yoduro de propidio). Los datos representan la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

A continuación, con el objetivo de valorar si la re-expresión de PAUF revertía el efecto que causaba su silenciamiento estable sobre el perfil de ciclo celular de las células SW620 y KM12L4, se reintrodujo la expresión de PAUF en las células establemente silenciadas. En primer lugar, se analizó la expresión de PAUF en las SW620 y KM12L4 células establemente silenciadas en PAUF transfectadas con el vector pCMV-A6-GFP-PAUF o con el vector vacío pCMV-A6-GFP mediante WB (Figura 50A).



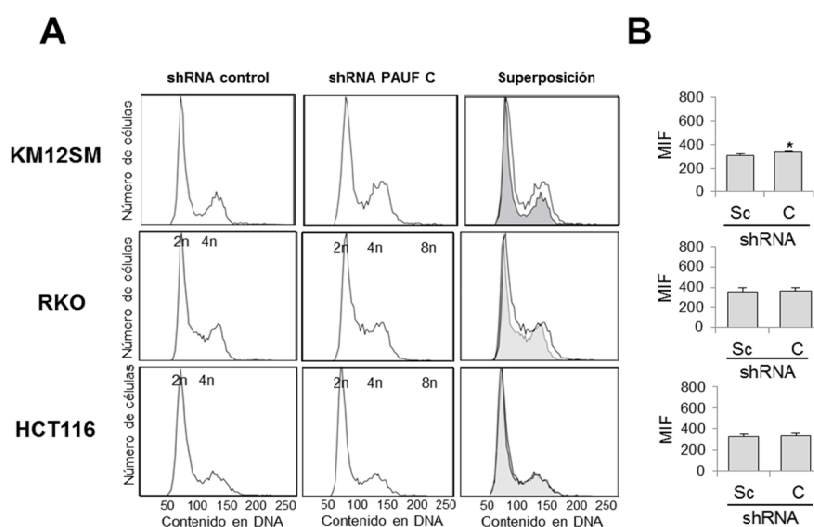
**Figura 50. Análisis de la sobre-expresión de PAUF en las células silenciadas en PAUF y de su efecto sobre el perfil de ciclo celular de estas células.** A ) Las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF se transfectaron con el vector pCMV-A6-GFP-PAUF o con el vector vacío pCMV-A6 (mock) y 48 h después se recogieron los extractos proteicos totales para testar los niveles de expresión de PAUF. 30µg de estos extractos se resolvieron en SDS-PAGE al 12,5% y se sometieron a transferencia a transferencia utilizando anti-rhPAUF o anti-tubulina como control de carga. B) Los mismos transfectantes de (A) fueron sometidos a análisis del perfil de ciclo celular. La re-expresión de PAUF invirtió parcialmente los efectos sobre el perfil del ciclo celular después de 48 h de sobre-expresión (izquierda). La reversión parcial del perfil de ciclo celular se corroboró mediante el cálculo de la MIF del canal para yoduro de propidio FL3, de cada una de las poblaciones (derecha).

En segundo lugar, después de corroborar la expresión de PAUF en las células establemente silenciadas en PAUF, se valoró por citometría de flujo el perfil de ciclo celular de estas células transfectadas con el vector de sobre-expresión de PAUF o con el vector vacío. Tanto las células SW620 como las KM12L4 mostraron una reversión parcial en el contenido de DNA y en la actividad poliploídica (Figura 50B).

En resumen, estos datos sugieren que el silenciamiento de PAUF podría provocar alteraciones extensas en los puntos de control del ciclo celular que controlan la poliploidia de la célula.

### 25.2.7.2. Análisis del efecto del silenciamiento transitorio de PAUF sobre el perfil de ciclo celular de las líneas celulares KM12SM, RKO y HCT116

Con el objetivo de ampliar el panel de líneas celulares de CCR analizadas, se estudió el efecto del silenciamiento transitorio de PAUF sobre el perfil de ciclo celular de las células KM12SM, RKO y HCT116. Las líneas celulares KM12SM, RKO y HCT116 se transfectaron de manera transitoria con el vector pGFP-shPAUF C o con el vector control y 48 h después se valoró el perfil del ciclo celular (Figura 51).



**Figura 51. Análisis del perfil de ciclo celular de las células KM12SM, RKO y HCT116 control y silenciadas en PAUF.** A) Histogramas del número de células y contenido en DNA de las células KM12SM, RKO y HCT116 control y transitoriamente silenciadas en PAUF, analizadas mediante citometría de flujo. Se muestra el perfil de ciclo de un experimento representativo. B) Se representa la MIF para yoduro de propidio de cada una de las poblaciones celulares estudiadas. Los datos representan la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes (\* p<0.05).

El silenciamiento transitorio de PAUF en las células KM12SM aumentó sutilmente, aunque de manera significativa, su contenido en DNA y produjo un aumento del número de células en la fase G2 del ciclo celular (Figura 51A). Por el contrario, en el caso de las células RKO y HCT116, el silenciamiento transitorio de

PAUF no produjo alteraciones significativas en el perfil de ciclo celular. De nuevo, estos datos se corroboraron analizando la MIF para el canal FL3 (yoduro de propidio) de cada una de las poblaciones a comparar (Figura 51B). En resumen, el efecto del silenciamiento transitorio de PAUF sobre el perfil de ciclo celular es dependiente de la línea celular.

### 25.2.8. Análisis del estatus de APC Y P53 en líneas celulares de CCR

Puesto que el efecto del silenciamiento de PAUF sobre el perfil de ciclo celular varía dependiendo de la línea celular estudiada, a continuación se analizó el estatus de los supresores tumorales *APC* y *P53* en las líneas celulares de CCR SW620, KM12L4, HT29, Colo320, RKO y HCT116. *APC* y *p53* son proteínas alteradas en CCR (228-230) que se han descrito como proteínas clave para el correcto funcionamiento del ciclo celular y la estabilidad cromosomal (231).

El análisis *in silico* del estatus de estas dos proteínas en el panel de líneas de CCR utilizadas mostró que *p53* aparece mutado en las líneas celulares SW620, KM12L4, HT29 y Colo320; y mantiene su forma *wild type* en las líneas RKO y HCT116 (232, 233) (Tabla 7).

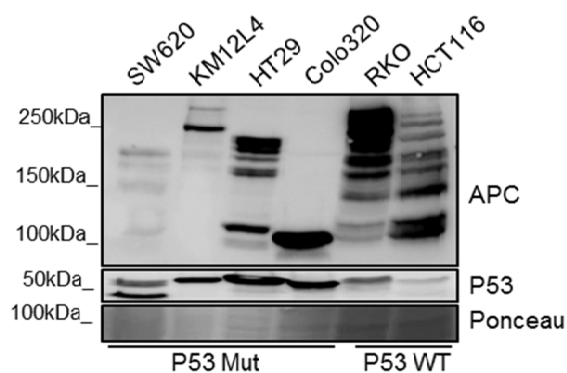
Tabla 7. Estatus de P53 y APC en las líneas celulares de CCR.

Línea celular	Estatus de P53	Estatus de APC
<b>SW620</b>	R273H;P309S	Mut
<b>KM12L4</b>	H179R	wt
<b>HT29</b>	R273H	Mut
<b>Colo320</b>	R248W	Mut
<b>RKO</b>	wt	
<b>HCT116</b>	wt	wt

Por otro lado, se conoce que *APC* aparece mutado en las líneas celulares SW620, HT29 y Colo320 (234, 235) y conserva su forma *wild type* en las líneas

celulares KM12L4 y HCT116 (236). No se encontraron referencias acerca del estado de *APC* en la línea celular RKO.

A continuación, se realizó un WB para corroborar estos datos y detectar las formas truncadas de APC y p53 en este panel de líneas celulares de CCR (Figura 52).



**Figura 52. Análisis del estatus de APC y p53 en un panel de líneas celulares de CCR.** Los extractos proteicos totales de las células SW620, KM12L4, HT29, Colo320, RKO y HCT116 se recogieron y procesaron para resolverse mediante SDS-PAGE al 7%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectó a APC y P53 mediante inmunoblot. Como control de carga se utilizó el rojo ponceau.

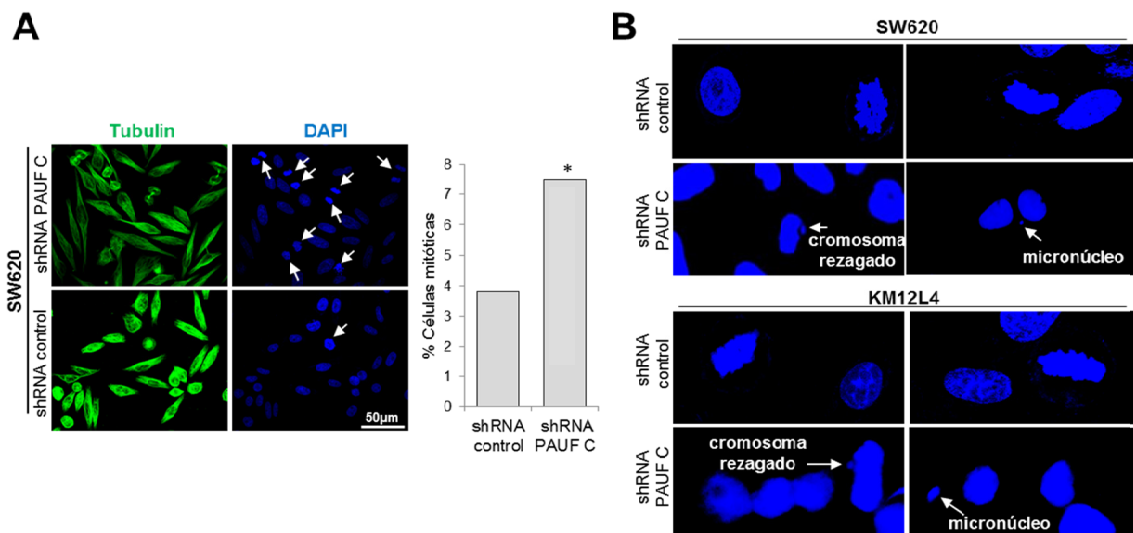
Se observó que las células KM12L4, RKO y HCT116 tienen la forma predominante *wild type* de APC mientras que en las células SW620, HT29 y Colo320 la forma *wild type* es indetectable por WB y abundan las formas truncadas. Por otra parte, el análisis del estatus de p53 mediante WB reveló la presencia de una doble banda en la línea celular SW620, posiblemente correspondiente a una forma truncada. El resto de líneas celulares con p53 mutado, así como las líneas celulares con p53 *wild type* RKO y HCT116, presentaron una única banda con diferente intensidad.

### 25.2.9. El silenciamiento de PAUF provoca arresto mitótico y errores en las mitosis de las células SW620 y KM12L4

Debido a que el silenciamiento de PAUF provoca un aumento en el tamaño celular, distorsiones en el perfil de ciclo celular, tetraploidía, y que la localización

celular de PAUF en el huso mitótico es similar a la de APC, en las células SW620 y, en menor medida, en las células KM12L4, se planteó la hipótesis de que PAUF estuviese implicado en el *checkpoint* mitótico. Por ello, a continuación se trató de esclarecer el papel de PAUF en la mitosis.

Se analizó si el silenciamiento de PAUF provocaba arresto mitótico. Para ello, se contabilizó y comparó el número de células en mitosis en los cultivos celulares de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF, mediante microscopía confocal (Figura 53A).



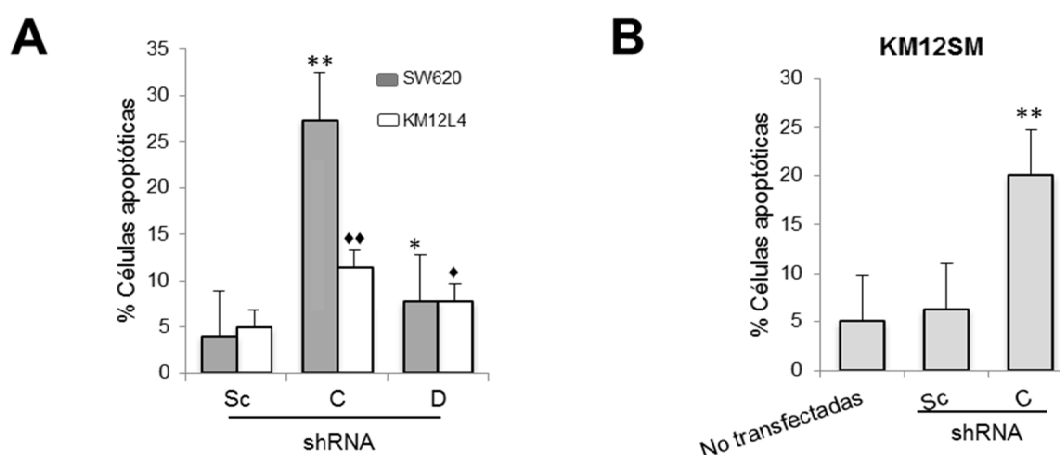
**Figura 53. Análisis del efecto del silenciamiento de PAUF sobre las mitosis celulares.** A) Las células SW620 control y silenciadas en PAUF se marcaron de DAPI para detectar el núcleo celular y con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con un fluoróforo verde para detectar el anticuerpo primario anti-tubulina, y se analizaron por inmuno-fluorescencia (izquierda). Se contabilizaron las células con el núcleo condensado o los cromosomas ya visibles (señaladas en la imagen con las flechas blancas) y se calculó el porcentaje de estas células mitóticas respecto del total de células, para cada condición (derecha). Se contabilizaron al menos 300 células por condición, con el *plugin* de conteo celular del programa ImageJ. Los p-valor se calcularon mediante el test  $\chi^2$  (\*  $p < 0,05$ ). B) Las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF se tiñeron con DAPI (azul) y se analizaron al microscopio para estudiar en detalle el tipo de mitosis. Las flechas blancas señalan aquellas mitosis aberrantes donde aparecen cromosomas rezagados así como la presencia de micro-núcleos.

El número de células que presentaban un núcleo condensado o los cromosomas visibles era mayor en el cultivo de células SW620 silenciadas en PAUF comparando con el de las células control.

El análisis en detalle de las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF en mitosis reveló que muchas de estas mitosis eran aberrantes (Figura 40B). Estas células presentan errores en la segregación de cromosomas y en ocasiones, presencia de micronúcleos.

### 25.2.10. El silenciamiento de PAUF provoca un aumento de la apoptosis celular

La presencia de micronúcleos está asociada a alteraciones en el huso mitótico, como consecuencia de la inestabilidad cromosómica. Además, defectos en el ciclo celular o en la mitosis desencadenan en una segregación cromosómica aberrante que activa el programa apoptótico celular (237). Por todo ello, a continuación se evaluó el efecto del silenciamiento de PAUF sobre la apoptosis celular. Mediante un ensayo de citometría de flujo, se observó que las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF tenían mayor apoptosis que las células control (Figura 54A).

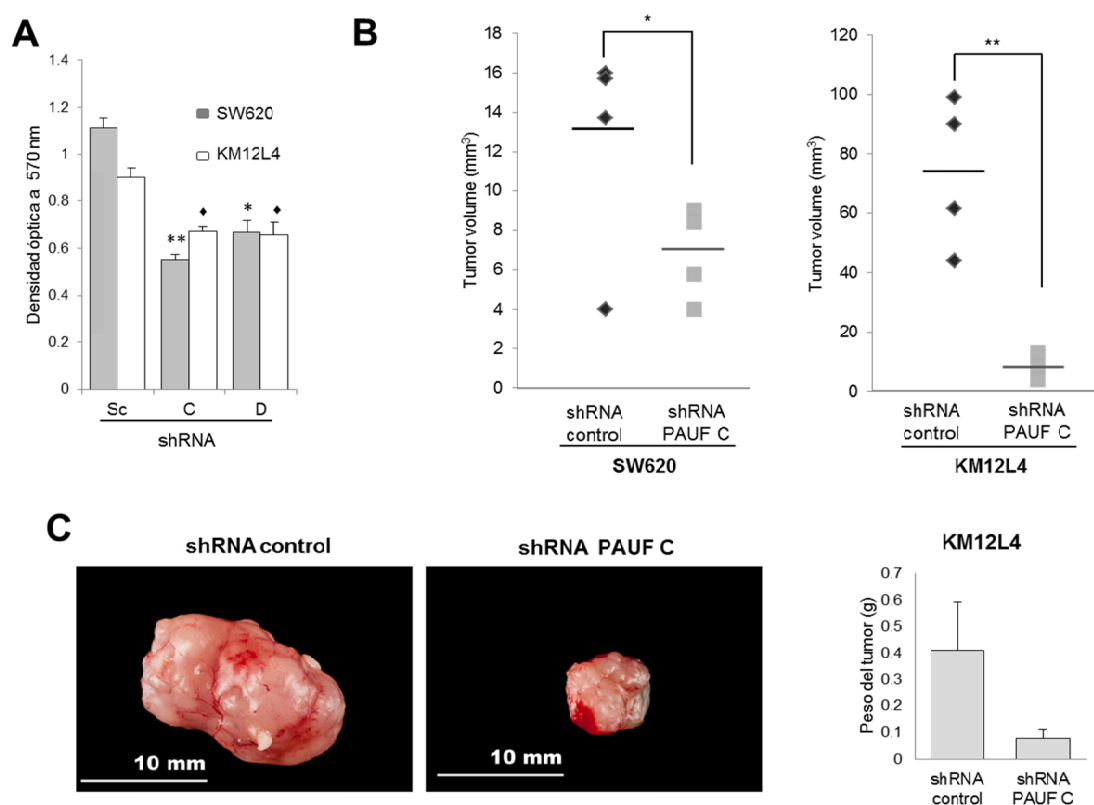


**Figura 54. Análisis del efecto del silenciamiento de PAUF sobre la apoptosis de líneas celulares de CCR.** (A y B) La apoptosis celular se evaluó recogiendo a las células adherentes en cultivo, fijándolas con etanol al 70% e incubándolas durante 15 min con una solución de yoduro de propidio y RNAsa. Se evaluó el porcentaje de células cuyo contenido en DNA estaba por debajo del contenido que marca la fase G1 del ciclo celular y se representó en gráficos de barras como se muestra en la figura. A) Análisis del porcentaje de apoptosis de las células SW620 y KM12L4 control (Sc) y establemente infectadas con los vectores pGFP-C-shLenti-shRNA PAUF C (C) y D (D). B) Estudio del porcentaje de apoptosis de las células KM12SM sin transfectar, transfectadas transitoriamente con el vector pGFP-C-shLenti-shRNA control (Sc) o con el pGFP-C-shLenti-shRNA PAUF C (C). Los p-valor se calcularon usando una prueba de ANOVA (\* p <0,05, \*\* p <0,01 para las SW620; ♦ p <0,05, ♦♦ p <0,01 para las KM12L4).

Además, el silenciamiento transitorio de PAUF en la línea celular KM12SM también provocó un incremento en la apoptosis celular (Figura 54B).

### 25.2.11. El silenciamiento de PAUF provoca una menor proliferación de las células SW620 y KM12L4 tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*

A continuación, se analizó el efecto del silenciamiento estable de PAUF sobre la viabilidad y la proliferación celular. Mediante un ensayo de MTT, se observó que las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF tenían menor proliferación que las células control, de manera proporcional al nivel de silenciamiento de PAUF (Figura 55A).



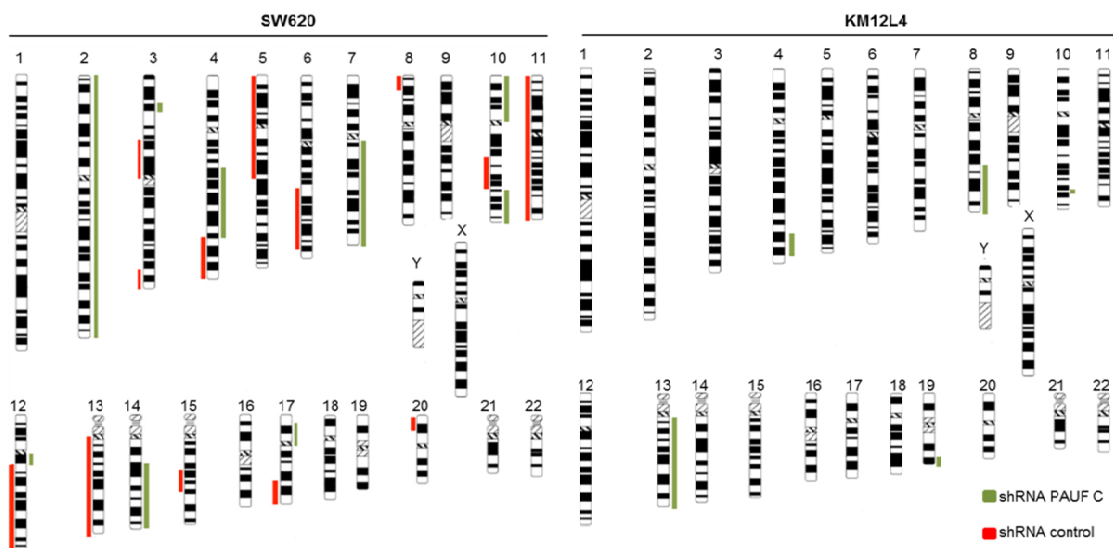
**Figura 55. Análisis *in vitro* e *in vivo* del efecto del silenciamiento de PAUF sobre la viabilidad celular y la proliferación.** A) La proliferación se monitorizó mediante un ensayo de MTT donde se cultivaron las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF durante 72h. La densidad óptica fue significativamente más baja en las células silenciadas en PAUF respecto de las células control (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  para las SW620; ♦  $p < 0.05$ , ♦♦  $p < 0.01$  para las KM12L4). B) Las células SW620 (izquierda) y KM12L4 (derecha) control y silenciadas en PAUF se inyectaron subcutáneamente en ratones desnudos y se monitorizó el crecimiento del tumor cada dos días para cada población celular. La comparación final de los tumores originados entre ambas cohortes fue estadísticamente significativa (\*\*  $p < 0.05$  para las SW620 y \*\*  $p < 0.01$  para las KM12L4). C) Imágenes y datos del peso (en g) de los tumores, después de sacrificar a los ratones 20 días después de la inyección de las células KM12L4.

Para corroborar el descenso en la proliferación celular de las células establemente silenciadas en PAUF, se llevaron a cabo ensayos in vivo en ratones desnudos. Se inyectaron  $1 \times 10^7$  células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF de manera subcutánea en ratones desnudos y se valoró el volumen de los tumores formados. Las células SW620 control formaron tumores fácilmente cuantificables en el 100% de los ratones inyectados, mientras que las células SW620 establemente silenciadas en PAUF formaron tumores de volumen muy inferior, difícilmente cuantificable (Figura 55B). Por otro lado, tanto las células KM12L4 control como las silenciadas en PAUF formaron tumores en todos los ratones inyectados, pero de diferente tamaño. Los tumores formados por las células KM12L4 silenciadas en PAUF tenían menos de la mitad de volumen que los tumores formados por las células KM12L4 control, en la mayoría de los casos (Figura 55B). De manera concordante a lo anterior, el peso de los tumores formados por las células KM12L4 control era significativamente superior al peso de los tumores formados por las células KM12L4 silenciadas en PAUF (Figura 55C).

En resumen, el silenciamiento de PAUF provoca arresto mitótico y alteraciones en las mitosis celulares que se traducen en un descenso en la viabilidad celular y en la ejecución de un programa apoptótico. Todos estos datos apoyan la hipótesis de que PAUF podría estar implicado en el *checkpoint* del ciclo celular. Si esta hipótesis fuese cierta, la ausencia de PAUF conduciría a una desregulación cromosómica, con la consiguiente aneuploidía e inestabilidad cromosómica, como sucede con la ausencia de APC (50, 63).

### 25.2.12. El silenciamiento estable de PAUF desencadena inestabilidad genómica en las células SW620 y KM12L4

Para investigar los efectos del silenciamiento de PAUF a nivel genómico, se llevó a cabo un análisis de hibridación comparada CGH (aCGH) en las células SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas en PAUF. El aCGH de alta resolución es una técnica que permite la detección de alteraciones en el número de copias de regiones cromosómicas concretas o de cromosomas enteros, a lo largo de todo el genoma. Como resultado de este análisis se encontraron grandes alteraciones cromosómicas en ambas líneas celulares establemente silenciadas en PAUF con respecto de las células control (Figura 56 y Tablas 8 y 9).



**Figura 56. Análisis del array CGH de la células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF.** Vista genómica de las variaciones del número de copias (CNV) detectadas en las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF en comparación con las células SW620 y KM12L4 control. Las barras verdes indican ganancias y las barras rojas indican pérdidas por parte de las células silenciadas en PAUF en comparación con las células control. El perfil resultante muestra ganancias y pérdidas de grandes regiones cromosómicas, incluso de cromosomas enteros en la línea celular SW620. En las KM12L4 también se observa cierta inestabilidad cromosómica aunque en menor grado que en las SW620.

**Tabla 8. Resultados del array de CGH de las células SW620 silenciadas en PAUF respecto de las células SW620 control**

SW620 shRNA PAUF C				
arr[hg19]	Aberración	Comienzo	Fin	Citobanda
2p25.3p11.1(17.019-92.027.940)x3	Ganancia	17.019	92.027.940	2p25.3-p11.1
2p25.1(10.930.789-12.130.071)x3	Ganancia	10.930.789	789-12.130.071	2p25.1
2p16.3p16.2(50.031.790-53.614.293)x3	Ganancia	50.031.790	53.614.293	2p16.3-p16.2
2q11.1q37.3(95.344.257-243.068.396)x3	Ganancia	95.344.257	243.068.396	2q11.1-q37.3
2q24.3q31.1(168.542.992-176.996.671)x3	Ganancia	168.542.992	176.996.671	2q24-3q31.1
3p22.1(40.581.497-43.492.517)x3	Ganancia	40.581.497	43.492.517	3p22.1
3p14.2p12.1(60.941.845-86.082.500)x1	Pérdida	60.941.845	86.082.500	3p14.2-p12.1
3p12.1p11.1(86.897.832-88.195.510)x3	Ganancia	86.897.832	88.195.510	3p12.1-p11.1
3q27.1q29(184.457.639-197.837.049)x1	Pérdida	184.457.639	197.837.049	3q27.1-q29
4q22.3q31.21(97.800.235-143.435.349)x3	Ganancia	97.800.235	143.435.349	4q22.3-q31.21
4q28.3q31.21(134.635.512-143.140.754)x3	Ganancia	134.635.512	143.140.754	4q28.3-q31.21
4q31.21q35.2(144.347.286-187.333.475)x1	Pérdida	144.347.286	187.333.475	4q31.21-q35.2
5p15.33p11(22.149-46.115.086)x1	Pérdida	22.149	46.115.086	5p15.33-p11
5p15.33(499.318-1.159.917)x1	Pérdida	499.318	1.159.917	5p15.33
5p15.33(1.286.297-1.292.983)x1	Pérdida	1.286.297	1.292.983	5p15.33
5q11.1q15(49.584.189-92.806.898)x1	Pérdida	49.584.189	92.806.898	5q11.1-q15
5q11.1q13.2(50.066.157-68.791.331)x1	Pérdida	50.066.157	68.791.331	5q11.1-q13.2
5q13.2q15(70.959.314-92.528.869)x1	Pérdida	70.959.314	92.528.869	5q13.2-q15
5q15(93.277.550-93.789.795)x1	Pérdida	93.277.550	93.789.795	5q15
6q21q26(112.918.692-161.365.600)x1	Pérdida	112.918.692	161.365.600	6q21-q26
7q11.21(61.831.840-66.709.382)x3	Ganancia	61.831.840	66.709.382	7q11.21
7q11.21q11.23(66.887.942-73.683.437)x3	Ganancia	66.887.942	73.683.437	7q11.21-q11.23
7q11.21q36.1(66.887.942-148.341.344)x3	Ganancia	66.887.942	148.341.344	7q11.21-q36.1
7q21.11q32.1(77.809.501-127.859.371)x3	Ganancia	77.809.501	127.859.371	7q21.11-q32.1
7q31.1(109.689.504-110.360.720)x3	Ganancia	109.689.504	110.360.720	7q31.1
7q32.3q36.1(132.534.956-148.341.344)x3	Ganancia	132.534.956	148.341.344	7q32.3-q36.1
7q36.1q36.3(148.630.241-159.125.464)x3	Ganancia	148.630.241	159.125.464	7q36.1-q36.3
8p23.3p23.1(191.530-8.753.293)x1	Pérdida	191.53	8.753.293	8p23.3-p23.1
8q24.3(142.308.295-142.448.084)x1	Pérdida	142.308.295	142.448.084	8q24.3
10p15.2p11.1(3.145.278-38.408.609)x3	Ganancia	3.145.278	38.408.609	10p15.2-p11.1
10q11.21q22.1(44.537.209-72.929.387)x3	Ganancia	44.537.209	72.929.387	10q11.21-q22.1
10q22.1q23.31(73.001.620-92.264.113)x1	Pérdida	73.001.620	92.264.113	10q22.1-q23.31
10q22.1q22.3(73.141.577-77.796.165)x1	Pérdida	73.141.577	77.796.165	10q22.1-q22.3
10q23.31q26.3(92.322.382-135.434.178)x3	Ganancia	92.322.382	135.434.178	10q23.31-q26.3
10q24.31(102.986.715-102.987.927)x1	Pérdida	102.986.715	102.987.927	10q24.31
10q25.1(106.828.013-110.440.774)x3	Ganancia	106.828.013	110.440.774	10q25.1
11p15.5p11.2(200.222-48.664.555)x1	Pérdida	200.222	48.664.555	11p15.5-p11.2
11p15.4p15.1(6.628.642-20.603.120)x1	Pérdida	6.628.642	20.603.120	11p15.4-p15.1
11q11q25(55.091.265-134.768.316)x1	Pérdida	55.091.265	134.768.316	11q11-q25
11q13.2(67.378.557-67.379.159)x3	Ganancia	67.378.557	67.379.159	11q13.2
12q12(38.805.636-45.187.359)x3	Ganancia	38.805.636	45.187.359	12q12
12q12q24.33(46.013.502-133.732.062)x1	Pérdida	46.013.502	133.732.062	12q-12q24.33
13q14.11q14.2(41.431.155-49.324.027)x1	Pérdida	41.431.155	49.324.027	13q14.11-q14.2
14q21.1q32.33(39.960.187-107.287.505)x3	Ganancia	39.960.187	107.287.505	14q21.1-q32.33
14q24.3q31.3(78.589.017-88.258.612)x3	Ganancia	78.589.017	88.258.612	14q24.3-q31.3
14q32.2(101.291.985-101.292.949)x1	Pérdida	101.291.985	101.292.949	14q32.2
14q32.33(106.665.119-107.287.505)x3	Ganancia	106.665.119	107.287.505	14q32.33
15q14q21.1(40.027.204-45.319.237)x1	Pérdida	40.027.204	45.319.237	15q14-q21.1
15q21.2q23(51.910.891-71.081.022)x1	Pérdida	51.910.891	71.081.022	15q21.2-q23
15q25.3q26.1(88.891.744-93.506.948)x1	Pérdida	88.891.744	93.506.948	15q25.3-q26.1
17p12p11.2(11.886.469-22.154.574)x3	Ganancia	11.886.469	22.154.574	17p12-p11.2
17q11.1q11.2(25.300.199-26.006.192)x3	Ganancia	25.300.199	26.006.192	17q11.1-q11.2
17q21.33(48.261.448-48.262.760)x1	Pérdida	48.261.448	48.262.760	17q21.33
17q23.2q25.3(58.332.553-81.029.941)x1	Pérdida	58.332.553	81.029.941	17q23.2-q25.3
17q24.3(70.117.219-70.118.366)x3	Ganancia	70.117.219	70.118.366	17q24.3
18q21.1(46.704.780-47.118.587)x1	Pérdida	46.704.780	47.118.587	18q21.1
20p13p12.1(65.043-17.626.433)x1	Pérdida	65.043	17.626.433	20p13-p12.1
22q11.21(19.752.537-19.752.711)x1	Pérdida	19.752.537	19.752.711	22q11.21

**Tabla 9. Resultados del array de CGH de las células KM12L4 silenciadas en PAUF respecto de las células KM12L4 control**

KM12L4 shRNA PAUF C				
arr[hg19]	Aberración	Comienzo	Fin	Citobanda
4q32.3q34.3(167.282.122-178.829.254)x3	Ganancia	167.282.122	178.829.254	q32.3 - q34.3
4q34.1q34.3(175.897.368-178.829.254)x3	Ganancia	175.897.368	178.829.254	q34.1 - q34.3
8q22.3q24.3(101.728.831-145.225.218)x3	Ganancia	101.728.831	145.225.218	q22.3 - q24.3
10q25.2(114.186.528-114.428.032)x3	Ganancia	114.186.528	114.428.032	q25.2
13q11q34(19.463.637-115.059.020)x3	Ganancia	19.463.637	115.059.020	q11 - q34
19q13.42q13.43(53.642.531-59.077.930)x3	Ganancia	53.642.531	59.077.930	q13.42 - q13.43

Las alteraciones cromosómicas fueron particularmente drásticas en las células SW620 silenciadas en PAUF, donde se observó trisomía del cromosoma 2 y pérdida total del cromosoma 11, además de muchos otros cambios, dispersos a lo largo de otros cromosomas. Cabe destacar que el cromosoma 16, donde está localizado PAUF, permaneció inalterado. También se observaron alteraciones cromosómicas en las células KM12L4 silenciadas en PAUF en comparación con las células control, pero en menor medida y diferentes que en las células SW620, lo que indica que los puntos de ruptura de los cromosomas se distribuyen al azar. Sin embargo, algunos cromosomas (el 4, 8 o 13) parece que son más propensos a la inestabilidad.

En conjunto, estos datos sugieren que la expresión de PAUF parece importante para mantener la estabilidad genómica.

### **25.2.13. Análisis del interactoma de PAUF mediante las técnicas de biotilación por proximidad y purificación por afinidad, acopladas a espectrometría de masas**

Para aclarar los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos del silenciamiento de PAUF sobre la inestabilidad cromosómica, se llevó a cabo el análisis proteómico del interactoma de PAUF utilizando las técnicas de BioID (141, 142) y purificación por afinidad (142), ambas integradas en el sistema de inducción de la expresión génica mediante tetraciclina o doxiciclina denominado Flp- In™ T-

REx™ en la línea celular HEK293. El análisis del interactoma de una proteína utilizando la técnica de purificación por afinidad permite la identificación de grandes complejos macromoleculares que forman parte de dicho interactoma. En cambio, utilizando la técnica BioID se identifica el interactoma biotinilado más próximo de la proteína de interés.

#### **25.2.13.1. Expresión de PAUF mediante tetraciclina o doxiciclina en Flp-In™ 293 T-REx™**

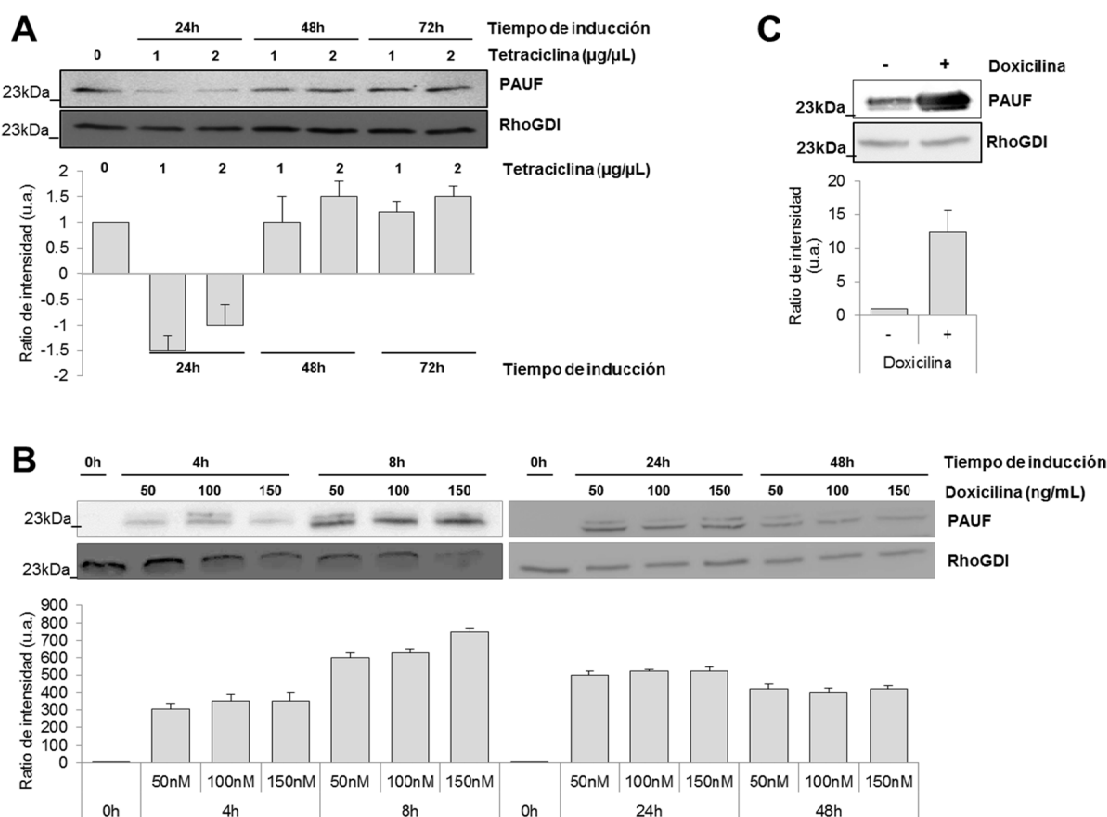
En primer lugar, se llevó a cabo la obtención de las líneas celulares estables Flp-In™ 293 T-REx™ FLAG-PAUF y Flp-In™ 293 T-REx™ BirA\*-FLAG-PAUF tal y como se detalla en el apartado 11.2.3. Brevemente, las células parentales Flp-In™ 293 T-REx™ se transfectaron doblemente con el vector pOG44 y el vector de expresión pcDNA5/FRT/TO y se seleccionaron con puromicina. Como resultado se obtuvieron estas líneas celulares conteniendo en su genoma una secuencia génica que codifica para una proteína de fusión con PAUF, que se expresa de manera inducible con tetraciclina o doxiciclina. Una de estas proteínas de fusión es FLAG-PAUF y la otra es BirA\*-FLAG-PAUF, donde BirA\* es una ligasa de biotina mutada, que constitutivamente biotiniliza a las proteínas que se encuentren en su entorno más próximo.

En segundo lugar, una vez obtenidas las líneas celulares estables Flp-In™ 293 T-REx™ FLAG-PAUF y Flp-In™ 293 T-REx™ BirA\*-FLAG-PAUF, se analizó la inducción de la expresión de PAUF por tetraciclina y doxiciclina a diferentes dosis y tiempos de incubación (Figura 57). Estas células se incubaron durante 24, 48 y 72 h con dos concentraciones diferentes de tetraciclina (1 y 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), se lisaron y se analizó la expresión de PAUF mediante WB (Figura 57A). La inducción con tetraciclina no produjo el aumento de la expresión de PAUF

esperado, razón por la cual a continuación se valoró la inducción de la expresión de PAUF por doxiciclina, un derivado sintético de la tetraciclina con mayor estabilidad y rapidez de acción. Para ello, los transfectantes estables de PAUF en la línea celular Flp- In™ 293 T-REx™ se incubaron durante 4, 8, 24 y 48 h con diferentes concentraciones de doxiciclina (50, 100 y 150 ng/mL) y se analizó la expresión de PAUF mediante WB (Figura 57B). En este caso, el mayor aumento de la expresión de PAUF se obtuvo al cabo de 8 h de inducción con 150 ng/mL de doxiciclina. Para corroborar la inducción de la expresión de PAUF bajo esas condiciones, se analizó el nivel de expresión de PAUF en el secretoma (Figura 57C). De nuevo, el nivel de expresión de PAUF fue mayor en las células Flp- In™ 293 T-REx™ con PAUF incubadas con 150 ng/mL de doxiciclina.

Por todo ello, la inducción de la expresión de PAUF para su posterior IP con FLAG se llevó a cabo en estas condiciones. En cambio, para analizar el interactoma de PAUF mediante la técnica BioID se indujo la expresión de PAUF con doxiciclina durante 24 h, pues es el tiempo necesario que deben incubarse las células con biotina para que la BirA\* lleve a cabo la correcta biotilación de su entorno.

## RESULTADOS



**Figura 57. Análisis de la inducción de la expresión de PAUF en las líneas celulares Flp- In™ 293 T-REx™ transfectadas de manera estable con distintas construcciones de PAUF mediante tetraciclina y doxiciclina.** (A, B y C) Se muestra únicamente la inducción de la expresión de PAUF en la línea celular Flp- In™ 293 T-REx™ BirA\*-FLAG-PAUF. A) Las células Flp- In™ 293 T-REx™ BirA\*-FLAG-PAUF se incubaron con 1 y 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de tetraciclina durante 24, 48 o 72 h, tiempo tras el cual se recogieron los extractos proteicos totales y se sometieron a un análisis WB para detectar a PAUF. B) Las células Flp- In™ 293 T-REx™ BirA\*-FLAG-PAUF se incubaron con 50, 100 y 150 ng/mL de doxiciclina durante 4, 8, 24 y 48 h, se recogieron los extractos proteicos totales y se sometieron a un análisis WB para detectar a PAUF. C) Comprobación de la inducción de la expresión de PAUF con 150ng/mL de doxiciclina durante 8 h en el medio condicionado de las células Flp- In™ 293 T-REx™ BirA\*-FLAG-PAUF. En todos los casos, 30  $\mu\text{g}$  de proteína se resolvieron en SDS-PAGE al 12,5%, se utilizó RhoGDI como control de carga, y el porcentaje de expresión de PAUF se midió por densitometría óptica usando el programa Multi Gauge v. 3.

A continuación, se llevó a cabo la obtención del interactoma de PAUF mediante las estrategias de BioID y purificación por afinidad. En la estrategia BioID, las células Flp- In™ 293 T-REx™ BirA\*-FLAG-PAUF y las Flp- In™ 293 T-REx™ FLAG-PAUF que se utilizaron como control, se incubaron con doxiciclina además de con biotina. Al cabo de 24 h, se recogieron los extractos celulares totales y se incubaron con microesferas de estreptavidina que unen biotina. De esa manera, se capturó el interactoma biotinilado más próximo de PAUF. La

muestra control, es decir, el extracto celular total de células Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> FLAG-PAUF incubadas con doxiciclina y biotina, sirvió para identificar las proteínas que se unen de manera inespecífica a las microesferas de estreptavidina.

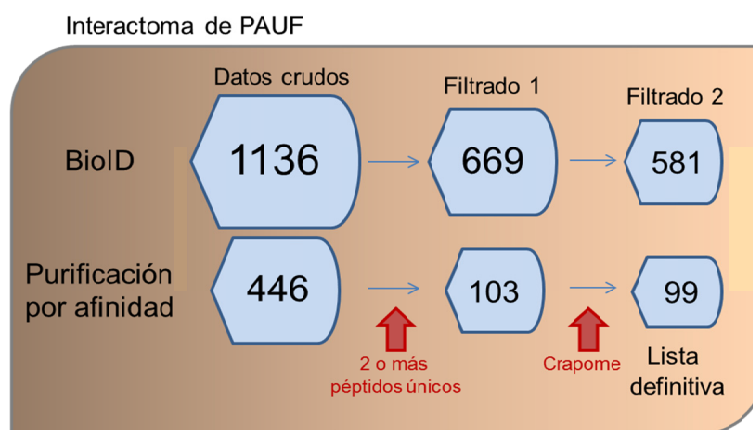
Por otro lado, en la estrategia de purificación por afinidad, las células Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> FLAG-PAUF se indujeron con doxiciclina y se obtuvo el extracto celular total, el cual se incubó con microesferas tapizadas con anticuerpos que unen la etiqueta FLAG. Como control se utilizó extracto celular total de células Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> FLAG-PAUF sin incubar con doxiciclina. Todas las muestras se procesaron como se detalla en 12 y 13.1 para ser analizadas en el espectrómetro de masas Q-Exactive (Figura 11C y D). En resumen, después de la captura de PAUF y su interactoma mediante los dos tipos de microesferas, las proteínas se digirieron con tripsina en las propias microesferas y los péptidos tripticos resultantes se analizaron por espectrometría de masas.

### **25.2.13.2. Análisis de las proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF**

Como resultado del análisis del interactoma de PAUF por BioID, se identificaron 1136 proteínas en la muestra de las células Flp- In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> BirA\*-FLAG-PAUF que no estaban presentes en la muestra de las células control (Tabla Suplementaria 19, anexo). De ellas, 669 proteínas se identificaron con al menos 2 péptidos únicos. Con el fin de obtener la lista definitiva de proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF para realizar su análisis funcional, las 669 proteínas se filtraron con la base de datos Crapome (223) y la lista se redujo a 581 proteínas (Tabla Suplementaria 20, anexo) (Figura 58).

Por otro lado, como resultado del análisis del interactoma de PAUF siguiendo la estrategia de purificación por afinidad se identificaron un total de 446

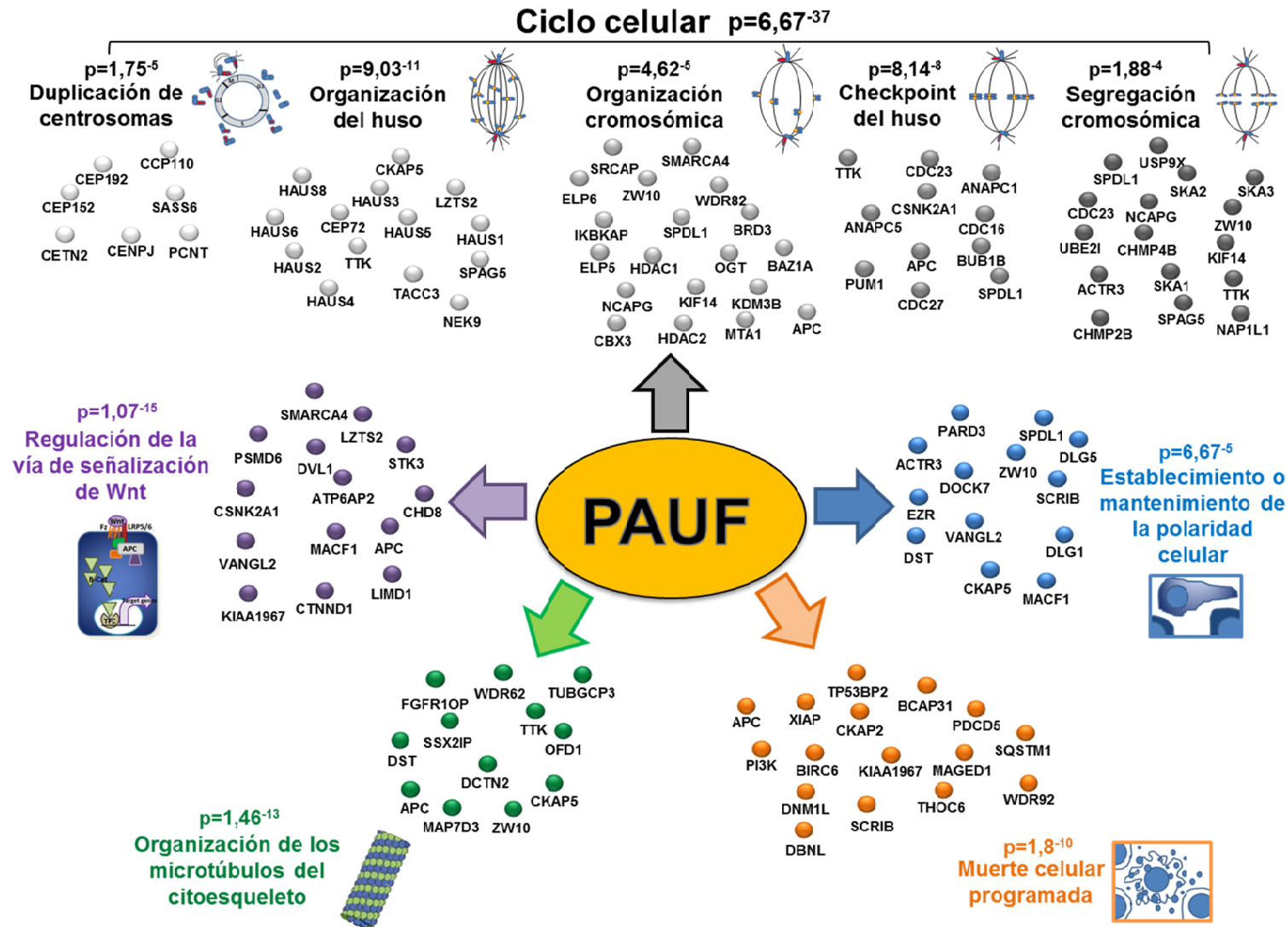
proteínas en la muestra problema que no estaban en la muestra control (Tabla Suplementaria 21, anexo). De ellas, 103 se identificaron con al menos 2 péptidos únicos. Tras el filtrado de estas proteínas con la base de datos Crapome, la lista se redujo a 99 proteínas (Tabla Suplementaria 22, anexo) (Figura 58).



**Figura 58. Esquema de las etapas del filtrado de los datos obtenidos por espectrometría de masas del interactoma de PAUF mediante las técnicas de BioID y purificación por afinidad.** Las proteínas exclusivamente identificadas en el interactoma de PAUF que no estaba presentes en las muestras control (datos crudos) se filtraron teniendo en cuenta únicamente aquellas que se habían identificado con 2 o más péptidos únicos. A continuación, para obtener la lista definitiva de proteínas del interactoma de PAUF, se retiraron aquellas que aparecen descritas como proteínas contaminantes en la base de datos Crapome. En el interior de las cajas se representa el número de proteínas resultante de cada etapa.

### 25.2.13.3. Análisis funcional de las proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF identificadas mediante el sistema BioID

El análisis funcional de las proteínas identificadas en el interactoma de PAUF mediante el sistema BioID utilizando la herramienta web STRING y el algoritmo GO reveló que estas proteínas estaban implicadas de manera significativa en funciones celulares clave, como es el ciclo celular, y en particular, en la duplicación de los centrosomas, en la organización del huso mitótico, en la organización de los cromosomas, en el *checkpoint* de mitosis, así como en la correcta segregación cromosómica (Tabla Suplementaria 23, anexo y Figura 59).



**Figura 59. Resumen de parte de las proteínas que forman parte del interactoma de PAUF identificado mediante BioID y del proceso biológico en el que están implicadas.** La imagen muestra alguna de las proteínas identificadas en el interactoma de PAUF mediante la técnica BioID acoplada a espectrometría de masas, agrupadas de acuerdo con su función biológica utilizando los términos de GO y el programa STRING. Los términos GO tienen un p-valor asociado que se calcula en base al enriquecimiento de cada término considerando el total de términos GO registrados, mediante una prueba hipergeométrica, y se corrige mediante el método de Benjamini y Hochberg

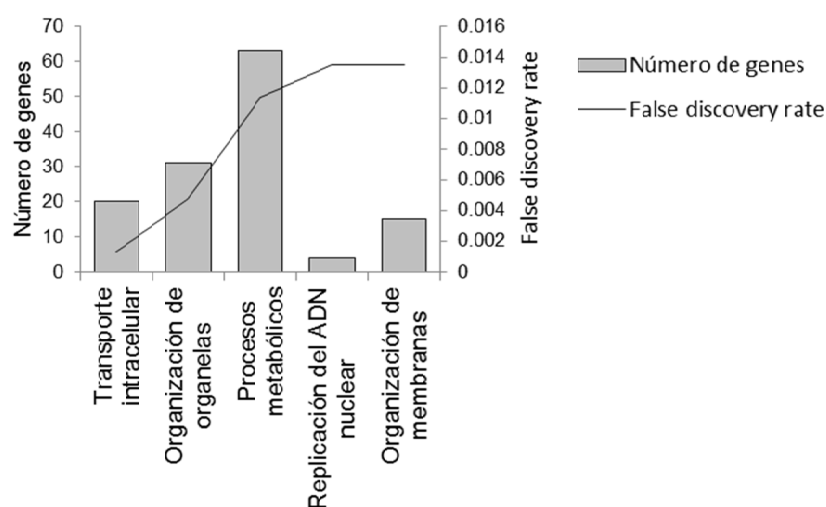
Además, las proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF participan significativamente en otras funciones celulares como la regulación de la vía de señalización de Wnt, la organización de los microtúbulos del citoesqueleto, la muerte celular programada y el establecimiento o mantenimiento de la polaridad celular. Entre las proteínas del interactoma de PAUF relacionadas con el *checkpoint* de mitosis se encuentra APC, junto con las proteínas del complejo promotor de la anafase ANAPC1 y ANAPC5; las proteínas 2 y 3 asociadas al cinetocoro y al huso mitótico (SKA2/3), la proteína quinasa en serina/treonina NEK9, PUM1 (una proteína PUMILIO) y las proteínas del complejo augmin (1-8). Además, dentro de las proteínas implicadas en la duplicación de los centrosomas y en la transición G2/M destacan CENPJ, CETN2, CEP192 o PCNT. También forman parte del interactoma de PAUF las proteínas ZW10, CDC23, NCAPG y NAP1L1 relacionadas con la segregación cromosómica y la organización de los cromosomas; la proteína relacionada con la muerte celular PI3K subunidad 85, y las proteínas relacionadas con la polaridad celular: SCRIB o la vía de señalización de Wnt: APC, p120 catenina, MACF1 o DVL1 / 2.

En resumen, estos resultados sugieren que PAUF podría llevar a cabo su papel en CCR a través de la participación, junto con estas proteínas, en procesos celulares clave como ciclo celular, regulación de la vía de señalización de Wnt o muerte celular programada, entre otros.

#### **25.2.13.4. Análisis funcional de las proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF identificadas mediante el sistema de purificación por afinidad**

El análisis del interactoma de PAUF mediante la técnica de purificación por afinidad permitió identificar numerosas proteínas que no habían sido identificadas con el sistema BioID. La utilización de esta técnica facilitó la identificación de proteínas mayoritarias que forman parte de grandes complejos proteicos que interaccionan con

PAUF. Así, las proteínas identificadas por este método participan de manera mayoritaria en procesos biológicos muy diferentes a los que participan las proteínas del interactoma de PAUF identificadas mediante BioID, como por ejemplo: transporte intracelular, organización de organelas y de membranas, determinados procesos metabólicos y replicación del ADN nuclear (Tabla Suplementaria 24, anexo y Figura 60).

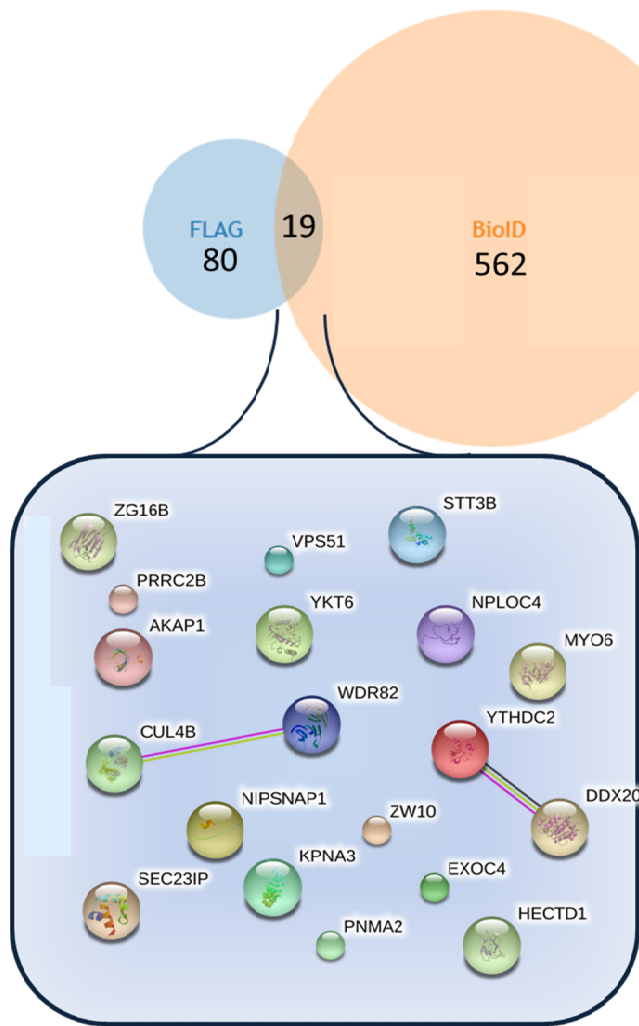


**Figura 60. Análisis del proceso biológico en el que están implicadas las proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF detectadas mediante purificación por afinidad acoplada a espectrometría de masas.** El proceso biológico en el que participan las proteínas del interactoma de PAUF identificadas mediante la técnica de purificación por afinidad se analizó mediante el programa STRING usando los términos GO.

En resumen, el estudio del interactoma de PAUF mediante la combinación de las técnicas BioID y purificación por afinidad, acopladas a espectrometría de masas, permitió identificar el amplio rango de proteínas que interaccionan con PAUF, ya formen parte de su interactoma más próximo o de grandes complejos macromoleculares.

**25.2.13.5. Estudio de las proteínas del interactoma de PAUF comúnmente identificadas por los métodos BioID y purificación por afinidad**

El análisis del interactoma de PAUF por espectrometría de masas utilizando dos tipos de métodos de captura del interactoma de PAUF permitió aumentar el número de identificaciones y abarcar una mayor cantidad de proteínas. A pesar de ello, el análisis conjunto de las proteínas filtradas e identificadas por los métodos BioID y purificación por afinidad reveló que 19 proteínas, entre ellas PAUF, se habían identificado comúnmente por ambos métodos (Figura 61).



**Figura 61. Diagrama de Venn e identificación de las proteínas del interactoma de PAUF identificadas en común mediante las técnicas de purificación por afinidad y BioID acopladas a espectrometría de masas.** De entre las 581 proteínas identificadas y filtradas como proteínas del interactoma de PAUF mediante el sistema BioID y las 99 proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF identificadas mediante purificación por afinidad, 19 se han identificado comúnmente por ambos métodos y se muestran en el cuadro inferior. De las 19 proteínas comunes, una es la propia PAUF (ZG16B). El análisis de las interacciones de estas proteínas mediante la herramienta web STRING revela interacciones significativas (representadas con líneas) entre 4 de ellas.

El análisis funcional de las 18 proteínas no reveló un enriquecimiento significativo en ninguna función biológica, pero sí la relación entre las proteínas CUL4B y WDR82, y entre YTHDC2 y DDX20, a nivel experimental, de mención en artículos, así como de coexpresión en otros organismos.

De entre las 18 proteínas comúnmente identificadas, cabe destacar a ZW10, una proteína muy similar a PAUF, en cuanto a distribución celular, pues se localiza en el huso mitótico (238, 239) y se asocia al tráfico vesicular (240), y en cuanto a función, ya que está implicada en la correcta formación del cinetocoro durante la mitosis (241), así como en el mantenimiento de la estabilidad cromosomal (238, 242). La interacción entre PAUF y ZW10 se corroboró inmunoprecipitando a ZW10 en el extracto proteico total de las células HEK293 y detectando a PAUF mediante WB (Figura 62).



**Figura 62. Inmunoprecipitación de ZW10 y detección de PAUF mediante WB.** 500  $\mu$ g de extracto proteico total de las células HEK293 se incubaron con un anticuerpo de ratón inespecífico (IP control) y con el anticuerpo anti-ZW10 (IP ZW10). El resultado de la inmunoprecipitación se resolvió por SDS-PAGE y se realizó un WB frente a ZW10, para corroborar la capacidad del anticuerpo anti-ZW10 de inmunoprecipitar ZW10, y frente a PAUF.

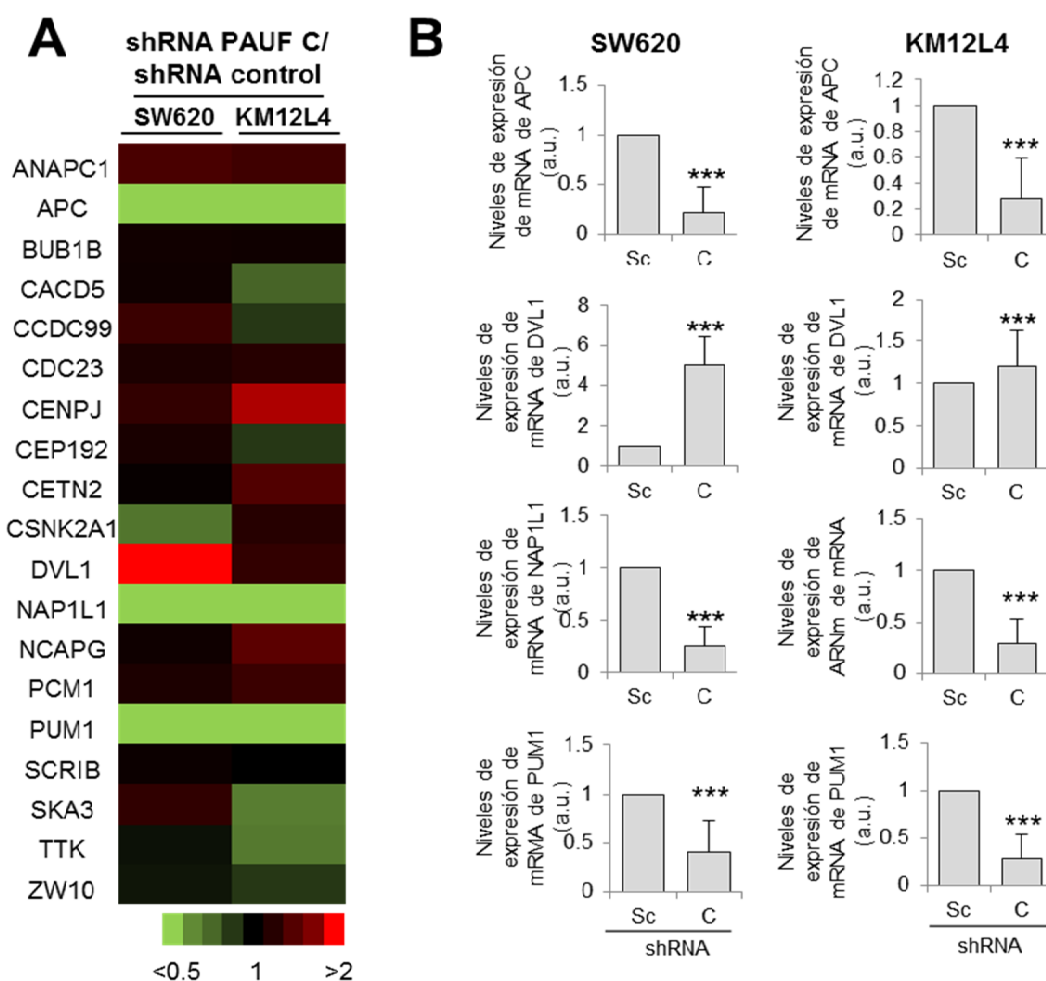
En resumen, la semejanza funcional y de localización entre PAUF y ZW10 podría indicar un papel conjunto y similar de estas proteínas en el mantenimiento de la estabilidad cromosomal.

#### **25.2.14. Análisis de la regulación de la expresión de algunas de las proteínas con las que interacciona PAUF**

Para determinar si PAUF regula la expresión de las proteínas con las que interacciona, se seleccionaron para su validación 21 proteínas del interactoma de PAUF que participan en la regulación del ciclo celular y el control mitótico, como APC, NAP1L1 o PUM1.

### 25.2.14.1. Análisis mediante qPCR del interactoma de PAUF en las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF

Mediante qPCR se analizó el nivel de mRNA de 21 proteínas en las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF (Figura 63A).



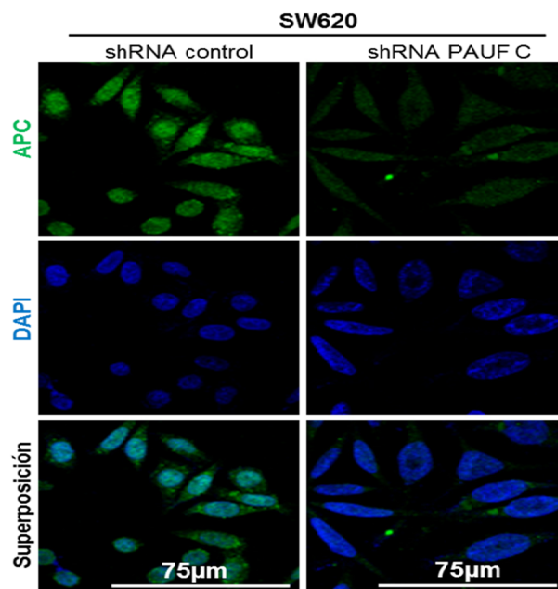
**Figura 63. Análisis del efecto del silenciamiento de PAUF sobre el nivel de expresión de mRNA de alguna de las proteínas con las que interactúa.** A) Mapa de calor del nivel de mRNA de 21 proteínas identificadas en el interactoma de PAUF. El color verde indica una regulación de la baja del nivel de mRNA en las células silenciadas en PAUF comparado con las células control, mientras que el color rojo hace referencia a una sobre-expresión del mRNA en células silenciadas en PAUF con respecto de las células control. Los colores oscuros cercanos al negro indican una no variación entre los niveles de mRNA de las células control y silenciadas en PAUF. B) Se muestran los diagramas de barras para la expresión del mRNA de las proteínas comúnmente desregulados en las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF respecto de las células control. Los p-valor se calcularon usando una prueba de ANOVA (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Los niveles de mRNA de algunas de estas proteínas, como ANAPC1, BUB1B y SCRIB, no cambiaban o lo hacían mínimamente entre las células control y silenciadas

en PAUF. En cambio, el nivel de mRNA de otras proteínas (DVL1, APC, NAP1L1 y PUM1) sí variaba de manera significativa (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) entre las células SW620 y KM12L4, control y establemente silenciadas en PAUF (Figura 63B). Por último, otras proteínas como SKA3 y TKK, variaban únicamente en las células KM12L4.

**25.2.15. El silenciamiento de PAUF provoca una disminución de los niveles de expresión de APC y E-cadherina, así como un aumento en los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina en células de CCR control y silenciadas en PAUF**

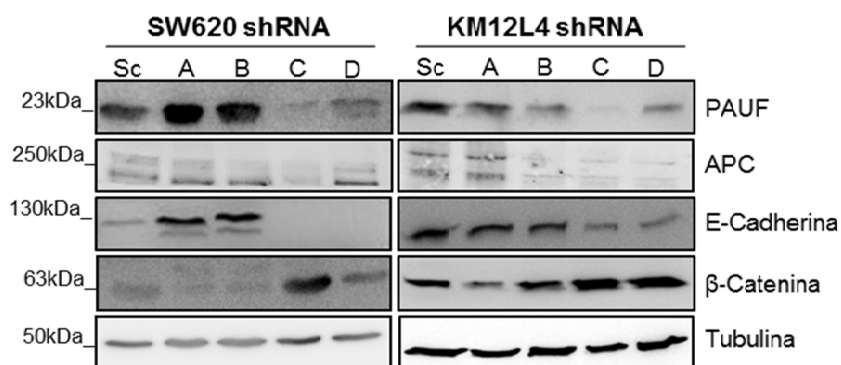
A continuación, se validó la bajada del nivel de expresión de APC a nivel de proteína mediante microscopía confocal (Figura 64).



**Figura 64. Análisis del efecto del silenciamiento estable de PAUF sobre los niveles de expresión de APC mediante inmunofluorescencia.** Las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF se analizaron por inmunofluorescencia, previo marcaje del núcleo celular con DAPI (azul) y APC en verde. Las células silenciadas en PAUF mostraron menores niveles de APC que las células control.

Las células SW620 silenciadas en PAUF mostraron menor intensidad de fluorescencia para APC que las células control, en imágenes obtenidas con la misma intensidad de láser.

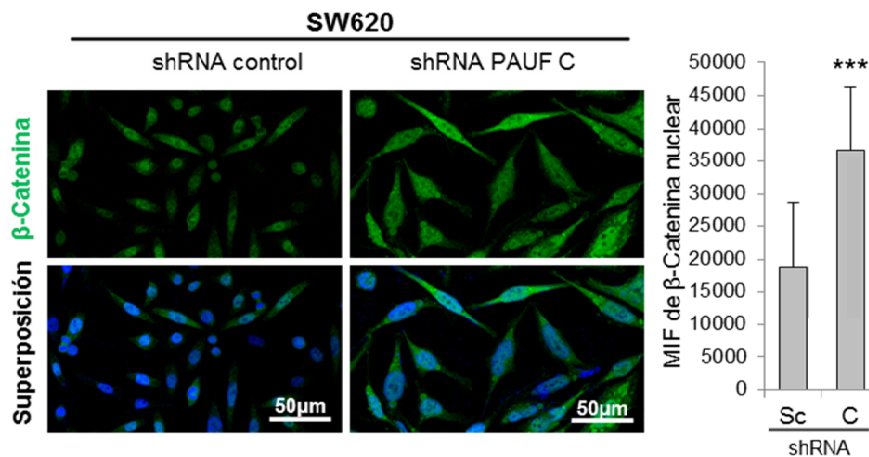
Dada la relación que existe entre la pérdida de APC y la vía de señalización de Wnt /  $\beta$ -catenina (243), se investigó el nivel de expresión de  $\beta$ -catenina y E-cadherina en las células de CCR silenciadas en PAUF. Se realizó un WB de los extractos proteicos totales de los transfectantes estables de PAUF y control de las células SW620 y KM12L4 y se observó de nuevo una disminución de los niveles de APC en las células silenciadas en PAUF, además de un aumento significativo de la expresión de  $\beta$ -catenina, lo que se acompañó de una disminución de la expresión de E-cadherina (Figura 65).



**Figura 65. Análisis del efecto del silenciamiento de PAUF en los niveles de expresión de APC, E-Cadherina y  $\beta$ -Catenina.** Los extractos proteicos totales de los transfectantes estables de PAUF en las líneas celulares SW620 y KM12L4 se recogieron y procesaron para resolverse mediante SDS-PAGE al 12,5% para detectar a PAUF y al 10% para detectar al resto de proteínas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectó a PAUF, APC, E-Cadherina y  $\beta$ -Catenina mediante inmunoblot. Como control de carga se utilizó tubulina.

Para confirmar el aumento de la expresión de  $\beta$ -catenina debido al silenciamiento de PAUF, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia, donde las células SW620 control y silenciadas en PAUF se tiñeron con DAPI y con un anticuerpo

anti-ratón marcado con un fluoróforo verde para detectar el anticuerpo anti-  $\beta$ -catenina (Figura 66).



**Figura 66. Análisis del efecto del silenciamiento estable de PAUF sobre los niveles de expresión de  $\beta$ -Catenina mediante inmunofluorescencia.** Las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF se analizaron por inmunofluorescencia, previo marcaje del núcleo celular con DAPI (azul) y  $\beta$ -Catenina en verde. B) Las células silenciadas en PAUF mostraron mayores niveles de  $\beta$ -Catenina totales que las células control (izquierda). El análisis de las imágenes obtenidas mediante el programa ImageJ permitió cuantificar la MIF de los píxeles correspondientes a  $\beta$ -Catenina nuclear, observándose que las células silenciadas en PAUF tienen mayores niveles de  $\beta$ -Catenina nuclear que las células control (derecha). El p-valor se calculó usando una prueba t de student (\*\* p <0,01).

Se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia para  $\beta$ -catenina en las células SW620 silenciadas en PAUF en comparación con las células control. Además, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de  $\beta$ -catenina nuclear en ambos tipos celulares a partir de estas imágenes utilizando el programa ImageJ reveló que los niveles de  $\beta$ -catenina nucleares eran mayores en las células silenciadas en PAUF con respecto de las células control.

En resumen, el silenciamiento de PAUF provoca una disminución de los niveles de expresión de APC y E-cadherina, mientras que conduce a un aumento de los niveles de  $\beta$ -catenina total y nuclear. Con estos datos, parece que la pérdida de PAUF podría promover la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la progresión tumoral en CCR.

### **25.2.16. Caracterización proteómica de la aneuploidía inducida por el silenciamiento de PAUF en las células SW620**

El silenciamiento estable de PAUF conduce a una aneuploidía en las células SW620, por lo que estas células son un buen modelo de tetraploidización inducida en CCR. El análisis en detalle los mecanismos implicados en esta tetraploidización inducida ayudará a conocer los mecanismos de las células de cáncer para tolerar la aneuploidía. Para ello, se llevó a cabo un experimento iTRAQ de proteómica cuantitativa. En este experimento se analizó la fracción nuclear de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF por ser la más representativa.

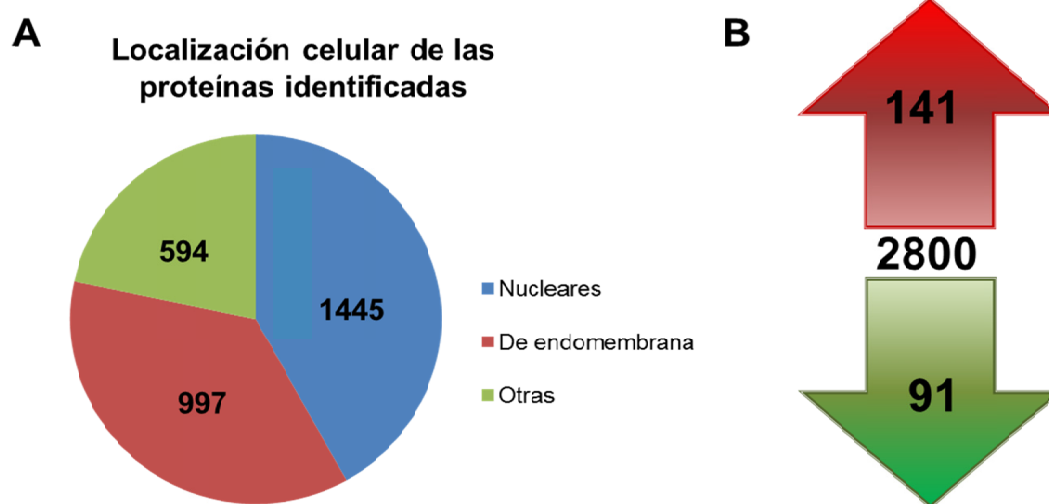
#### **25.2.16.1. Marcaje isotópico de los extractos nucleares de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF para su caracterización proteómica**

Primero se llevó a cabo la obtención del extracto nuclear de las células SW620 control y silenciadas en PAUF mediante un kit de fraccionamiento sub-celular de proteínas para cultivos celulares. El enriquecimiento en la fracción nuclear se confirmó previamente (Figura 10C) mediante WB, usando anticuerpos específicos frente a la proteína nuclear MTA2 y la proteína citoplasmática RhoGDI. Después, las proteínas nucleares se precipitaron con acetona y posteriormente se digirieron con tripsina un total de 100  $\mu\text{g}$  de extracto nuclear de cada tipo celular, separados en cuatro muestras de 50  $\mu\text{g}$ , para su posterior marcaje isobárico con los reactivos 114, 115, 116 y 117 de iTRAQ. Los péptidos trípticos marcados se mezclaron, se recogieron en un solo tubo, se secaron y se limpiaron mediante columnas de intercambio catiónico. Con el objetivo de aumentar el número de identificaciones, a continuación los péptidos se fraccionaron mediante OFFGEL en un total de 12 fracciones, las cuales se volvieron a limpiar

mediante OMIX C18 antes de ser analizadas en el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Figura 4).

### 25.2.16.2. Resultados de proteómica cuantitativa de la fracción nuclear de las células SW620 establemente silenciadas en PAUF y control

Se identificaron 3036 proteínas no redundantes, en la fracción nuclear de las células SW620 control y establemente silenciadas en PAUF. El análisis *in silico* de la localización celular de estas proteínas utilizando la base de datos de Uniprot (199) reveló que 1445 proteínas habían sido descritas previamente como proteínas nucleares. Además, de las 1591 proteínas restantes, 594 se habían descrito como proteínas pertenecientes a orgánulos como mitocondrias, aparato de Golgi, o retículo endoplasmático, fracciones sub-celulares que también se enriquecen junto con la nuclear utilizando el kit de fraccionamiento (Figura 67A).



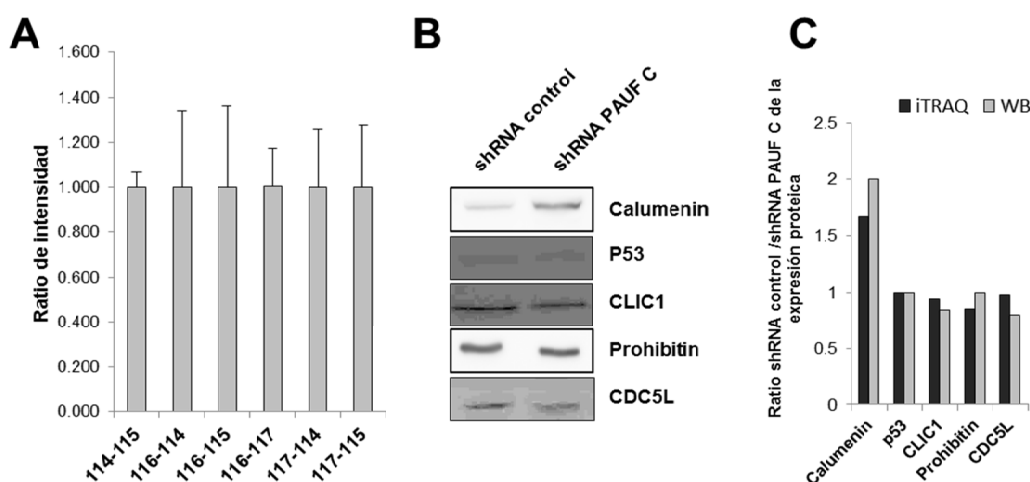
**Figura 67. Análisis general de los datos de cuantificación proteica relativa de los extractos nucleares de las células SW620 control y silenciadas en PAUF obtenidos por espectrometría de masas.** A) Gráfico que representa la localización celular de las 3036 proteínas identificadas. El análisis de la localización celular de estas proteínas se llevó a cabo mediante la base de datos de Uniprot. B) Representación de las proteínas sobre-expresadas (141), reguladas a la baja (91) y que no cambian (2800) en las células SW620 establemente silenciadas en PAUF con respecto de las células control.

Para conocer las proteínas significativamente desreguladas se realizó el análisis estadístico de los datos, basado en la permutación de los péptidos cuantificados (244).

De esta manera, se consideraron como significativas aquellas proteínas desreguladas en las células establemente silenciadas en PAUF cuya expresión se incrementaba  $\geq 1,5$  o se reducía  $\leq 0,67$  veces con respecto de las células control. Así, de las 3037 proteínas identificadas, 141 estaban sobre-expresadas en las células establemente silenciadas en PAUF (Tabla Suplementaria 25, anexo) y 91 estaban reguladas a la baja (Tabla Suplementaria 26, anexo) en comparación con las células control (Figura 67B).

### 25.2.16.3. Validación del método empleado

A continuación, se validaron los resultados obtenidos. En primer lugar, se verificó el semejante marcaje de los péptidos trípticos con los reactivos 114, 115, 116 y 117 de iTRAQ. Para ello, se analizó la media de la intensidad de los ratios 114/115, 116/114, 116/115, 116/117, 117/114 y 117/115 (Figura 68A). Se observó que la media de todos los ratios era similar y estaba en torno a 1.



**Figura 68. Validación del marcaje de los péptidos trípticos con los reactivos iTRAQ y de la cuantificación proteica por iTRAQ.** A) Representación de la media con la desviación estándar, de la intensidad de todos los ratios posibles. B) Análisis por WB de la expresión de alguna de las proteínas identificadas y cuantificadas iTRAQ. C) Comparación del ratio de expresión, mediante iTRAQ y WB, de las proteínas analizadas en B, en los extractos nucleares de las células SW620 silenciadas en PAUF/SW620 control.

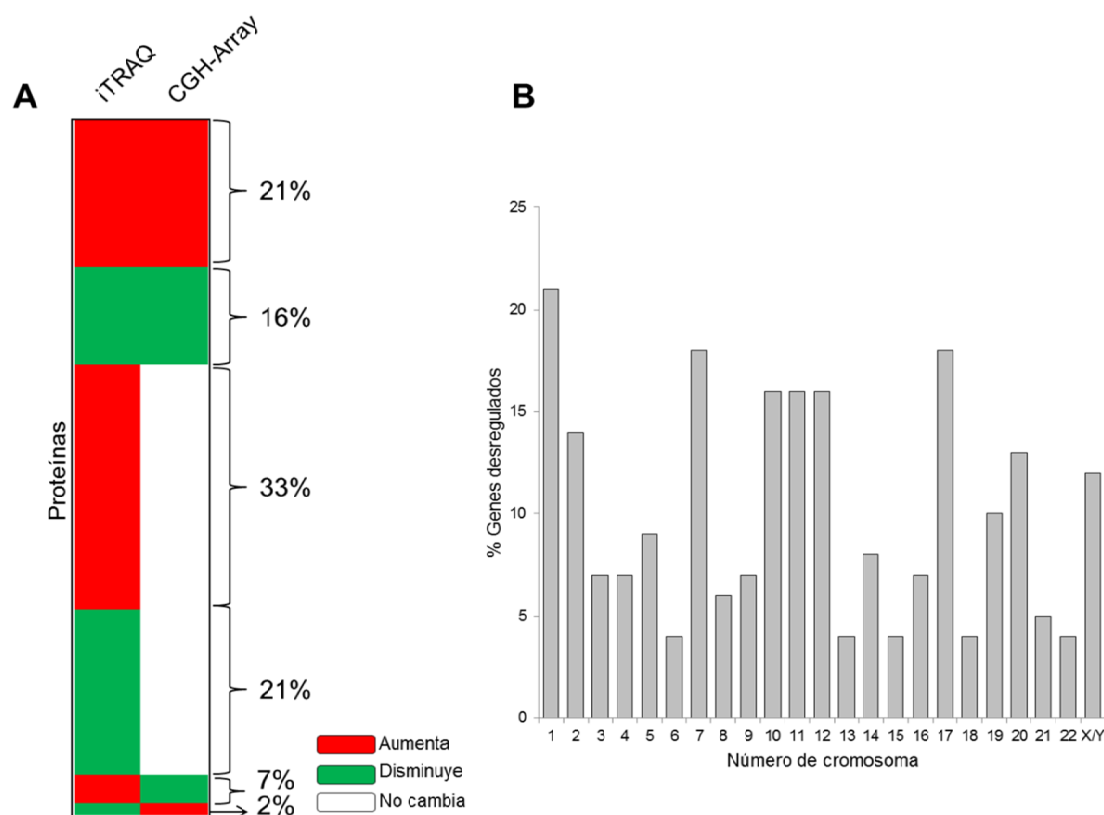
En segundo lugar, se validaron de manera ortogonal los resultados obtenidos en MS/MS mediante WB (Figura 68B). Se utilizaron anticuerpos de los que se disponía en ese momento en el laboratorio frente a distintas proteínas identificadas y cuantificadas

mediante iTRAQ como calumenina, P53, CLIC1, Prohibitin y CDC5L. Se cuantificó la intensidad de las bandas en las muestras control y silenciadas en PAUF mediante densitometría óptica y se observó que la diferencia en la intensidad de las bandas del WB era similar a los ratios de intensidad observados por iTRAQ (Figura 68C).

#### **25.2.16.4. Comparación de los datos obtenidos por aCGH y por iTRAQ en las células SW620 establemente silenciadas en PAUF y control**

Se compararon los datos de la hibridación genómica comparada de las células SW620 silenciadas en PAUF y control con los datos de iTRAQ de estas mismas células con el fin de conocer si los genes que codifican para las proteínas desreguladas en las células silenciadas en PAUF se encuentran en regiones cromosómicas alteradas en dichas células. Para analizar la localización cromosómica de los genes que codifican para las 232 proteínas desreguladas se utilizó la herramienta web de la National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI). Los datos de la localización cromosómica de los genes que codifican para estas proteínas, así como los resultados de la comparación de los datos obtenidos por ambas técnicas se recogen en la Tabla Suplementaria 27, anexo y en la Figura 53. El 21% de las proteínas desreguladas, son proteínas sobre-expresadas en las células SW620 silenciadas en PAUF y que se encuentran en regiones cromosómicas ganadas en las células silenciadas en PAUF respecto de las células control. El 16% son proteínas reguladas a la baja que se encuentran en regiones cromosómicas pérdidas en las células silenciadas. Cabe destacar que el 54% de las proteínas desreguladas se encuentran en regiones cromosómicas inalteradas. Por último, en un pequeño porcentaje de los casos (9%), las proteínas sobre-expresadas se encuentran en regiones perdidas en las células silenciadas en PAUF respecto de las células control y viceversa (Figura 69A). El análisis de la distribución de la localización cromosómica de los genes que codifican para las proteínas desreguladas

reveló que los genes alterados se encuentran preferentemente en los cromosomas 1, 7 y 17 (Figura 69B).

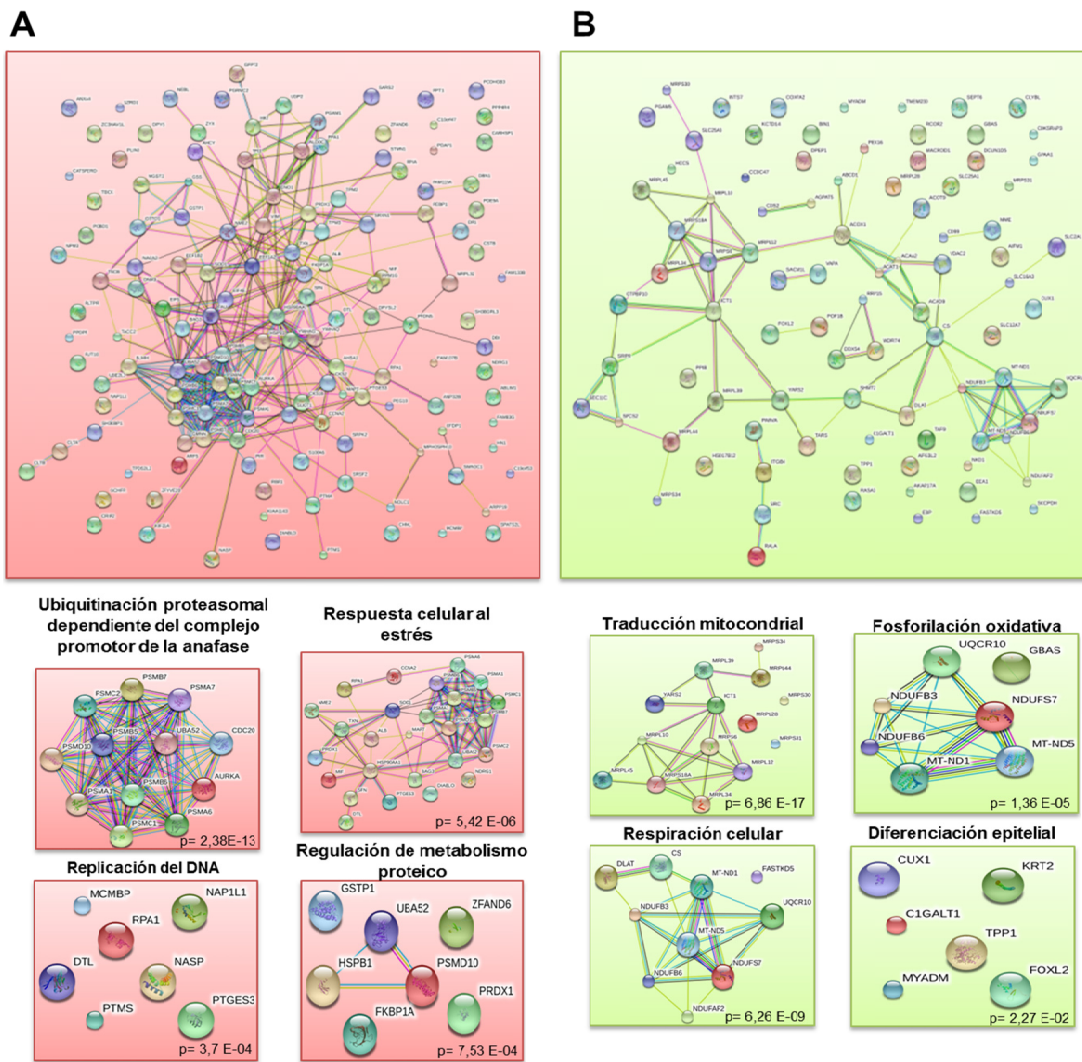


**Figura 69. Esquema del resultado obtenido del análisis comparativo de los datos obtenidos por CGH e iTRAQ de las células SW620 silenciadas en PAUF respecto de las células control.** A) En rojo y en verde se representan las proteínas sobre-expresadas y reguladas a la baja, así como las regiones cromosómicas ganadas y perdidas, respectivamente, en las células silenciadas en PAUF comparado con las células control. En blanco se representan las regiones cromosómicas que no cambian entre ambos tipos celulares. B) Representación del porcentaje de genes des-regulados en las células SW620 silenciadas en PAUF respecto de las células control a lo largo de todos los cromosomas.

En resumen, los genes que codifican para las proteínas desreguladas en las células SW620 establemente silenciadas en PAUF respecto de las células control se distribuyen de manera no homogénea a lo largo de los cromosomas. Además, la mitad de proteínas desreguladas se encuentran en regiones cromosómicas inalteradas, lo que sugiere que el silenciamiento de PAUF desencadena la desregulación proteica por dos vías: una de ellas dependiente de la CIN y otra independiente de la CIN, posiblemente a través de la regulación transcripcional.

#### **25.2.16.5. Análisis funcional de los procesos biológicos alterados por el silenciamiento estable de PAUF**

El análisis funcional de las proteínas desreguladas mediante STRING reveló que las 141 proteínas sobre-expresadas en las células silenciadas en PAUF presentaban numerosas interacciones significativas entre ellas, más de las que cabría esperar para proteínas aleatorias de tamaño similar extraídas del genoma. Tal enriquecimiento indica que las proteínas están al menos parcialmente conectadas biológicamente, como un grupo. Por el contrario, la relación funcional entre las 91 proteínas reguladas a la baja es menor, aunque también existen interacciones significativas entre estas proteínas (Figura 70). El análisis del proceso biológico en el que participan las 141 proteínas expresadas reveló la presencia de *cluster* bien diferenciados entre los que destacan: procesos catabólicos de la ubiquitinación de proteínas mediante el proteasoma, dependiente del complejo promotor de la anafase; respuesta celular al estrés; replicación del DNA y procesos metabólicos de regulación proteica. El listado detallado de los procesos más significativos en los que están involucradas estas proteínas se muestra en la Tabla Suplementaria 28, anexo. Por otro lado, las proteínas reguladas a la baja estaban involucradas principalmente en procesos como traducción mitocondrial; fosforilación oxidativa; respiración celular y diferenciación celular (Figura 70B y Tabla Suplementaria 29, anexo).

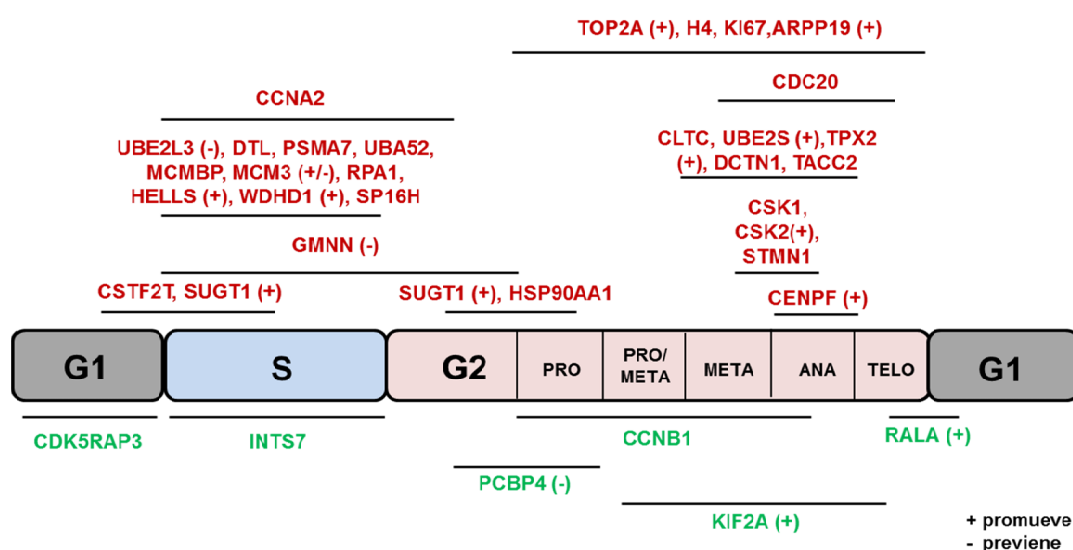


**Figura 70. Análisis mediante STRING de la conexión funcional entre las proteínas desreguladas en las células SW620 silenciadas en PAUF con respecto de las células control identificadas por espectrometría de masas.** A) Imagen de las 141 proteínas sobre-expresadas y las conexiones entre ellas. B) Imagen de las 91 proteínas reguladas a la baja y las conexiones entre ellas. En ambos casos en la parte inferior se representan los cluster más significativos del proceso biológico en el que están implicadas las 141 proteínas sobre-expresadas (A) y 91 reguladas a la baja (B) en las células SW620 silenciadas en PAUF respecto de las células control.

En resumen, las proteínas sobre-expresadas y reguladas a la baja en las células silenciadas aneuploides están involucradas en procesos biológicos muy diferentes. Las células aneuploides presentan sobre-expresión de la maquinaria implicada en la replicación del DNA y en la degradación proteica mediada por el proteasoma; mientras que tienen una regulación a la baja de la maquinaria implicada en la respiración celular.

### 25.2.16.6. Estudio de las proteínas desreguladas en las células silenciadas en PAUF implicadas en ciclo celular

El análisis por GO de proteínas desreguladas en las células silenciadas en PAUF respecto de las células control reveló que, únicamente en el conjunto de proteínas sobre-expresadas, había proteínas significativamente implicadas en procesos relacionados con el ciclo celular. A pesar de ello, el análisis *in silico* detallado de las 91 proteínas reguladas a la baja mostró que algunas de ellas también estaban implicadas en ciclo celular (Figura 71). Por ejemplo, algunas participan en la regulación de la transición de las distintas fases de la mitosis como PCBP4, CCNB1 y KIF2A. Otras, como CDK5RAP3 e INTS7, desempeñan sus funciones durante las fases G1 y S, respectivamente.



**Figura 71.** Esquema de las proteínas desreguladas en las células silenciadas en PAUF respecto de las células control y la etapa del ciclo celular donde ejercen su acción. Mediante barras se representa la fase del ciclo celular donde cada proteína lleva a cabo su función. Las proteínas representadas en color rojo (arriba) son proteínas sobre-expresadas en las células SW620 silenciadas en PAUF en comparación con las células control, mientras que en verde (abajo) se representan las proteínas reguladas a la baja.

En cuanto a las proteínas sobre-expresadas en las células silenciadas en PAUF, destacan aquellas implicadas en la fase S del ciclo celular como UBE2L3, DTL, PSMA7, UBA52, MCMBP, MCM3, RPA1, HELLS, WDHD1 y SP16H; CCNA2,

necesaria para la transición de la fase S a la fase de mitosis; o CDC20, CSK1, CSK2 y STMN1, que participan en la correcta transición de las etapas finales de la mitosis: metafase, anafase y telofase.

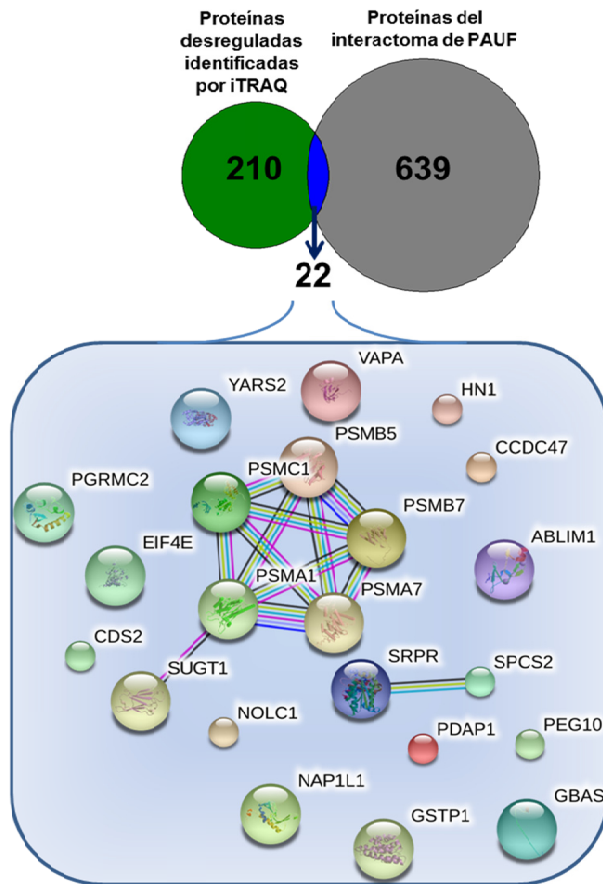
En resumen, el silenciamiento de PAUF desregula los niveles de expresión de numerosas proteínas implicadas en distintas fases del ciclo celular, especialmente en la fase S y en la transición de la metafase a la anafase. La mayoría de estas proteínas se regulan al alza, lo que indicaría una rápida transición de las células SW620 silenciadas en PAUF a través de las distintas fases del ciclo celular.

### **25.2.16.7. Análisis de las proteínas desreguladas en las células silenciadas en PAUF que forman parte del interactoma de PAUF**

Con el objetivo de saber si las proteínas desreguladas por el silenciamiento de PAUF forman parte de su interactoma, se compararon los datos obtenidos del interactoma de PAUF mediante las técnicas de BioID y purificación por afinidad acopladas a espectrometría de masas, con las 232 proteínas desreguladas en las células SW620 silenciadas en PAUF en comparación con las células control identificadas en el experimento de cuantificación relativa por iTRAQ (Figura 72).

Se observó que de las 661 proteínas del interactoma de PAUF identificadas anteriormente, 22 aparecen como proteínas desreguladas en las células silenciadas en PAUF. El análisis funcional de estas proteínas reveló una fuerte asociación con el proceso de ubiquitinación de proteínas en el proteasoma de manera dependiente del complejo promotor de la anafase.

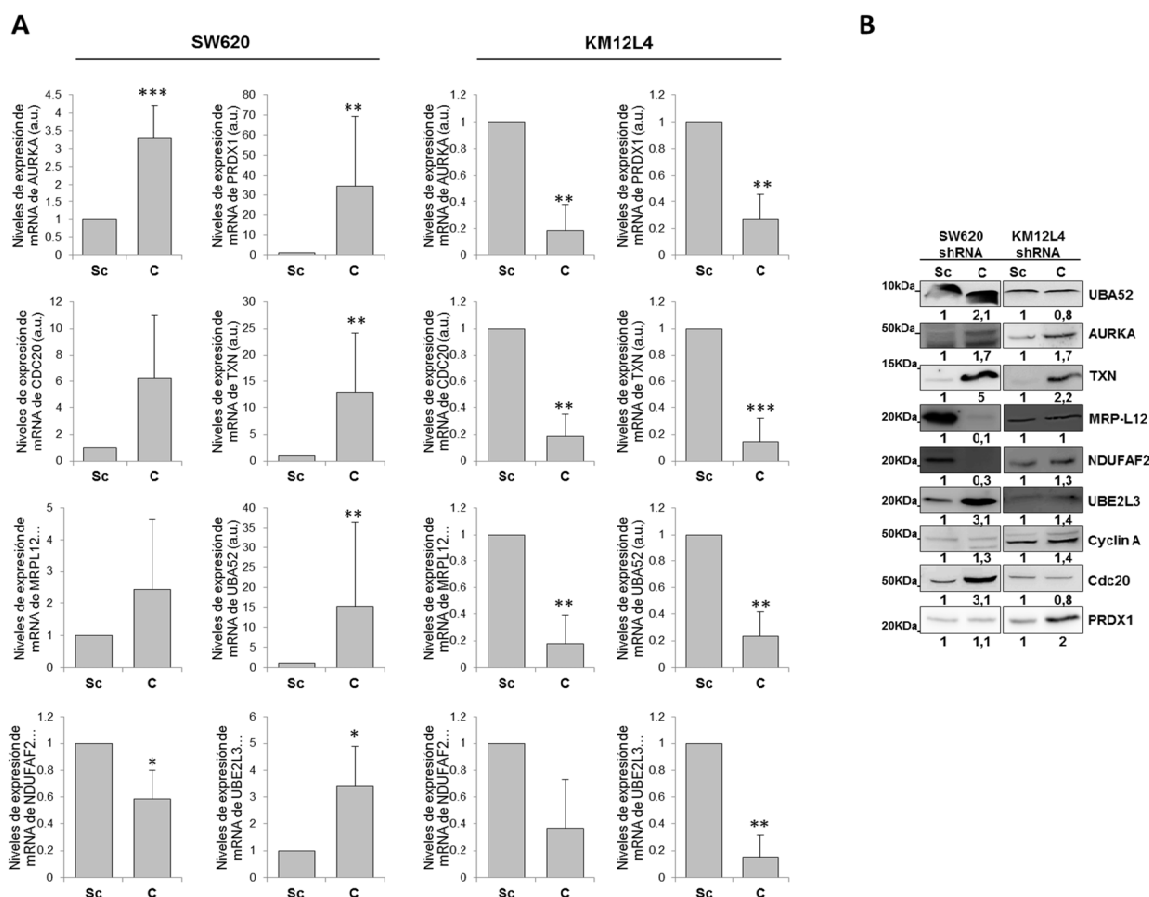
En definitiva, PAUF interacciona y de alguna manera controla la expresión de determinadas proteínas relacionadas con la maquinaria de proteasoma, como PSMC1, PSMB5 o PSMB7, en las células SW620.



**Figura 72. Diagrama de Venn e identificación de las proteínas del interactoma de PAUF desreguladas en las células SW620 silenciadas en PAUF respecto de las células control.** De entre las 661 proteínas identificadas mediante los sistemas de BioID y purificación por afinidad, como proteínas del interactoma de PAUF, 22 se han identificado en el experimento de espectrometría de masas de cuantificación relativa por iTRAQ como proteínas desreguladas en las células SW620 silenciadas en PAUF en comparación con las células control. El análisis de las interacciones de estas proteínas mediante STRING revela interacciones significativas entre algunas de ellas, destacando el complejo que forman las proteínas PSM.

**25.2.16.8. Caracterización de las proteínas alteradas por el silenciamiento de PAUF, implicadas en la degradación proteica proteosomal mediante la ubiquitinación y en ciclo celular**

Se seleccionaron para su validación ortogonal un total de 9 proteínas desreguladas por el silenciamiento de PAUF: UBA52, AURKA, TXN, UBE2L3, Ciclina A y CDC20, MRPL-12, NDUFAF2 y PRDX1. Estas proteínas participan principalmente en los procesos de degradación proteica mediada por el proteosoma y en el ciclo celular, dos procesos que, como se vio anteriormente, son característicos de las proteínas que forman parte del interactoma de PAUF. Se valoró el nivel de expresión de estas proteínas a nivel de RNAm (Figura 73A) y de proteína (Figura 73B) en las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF.

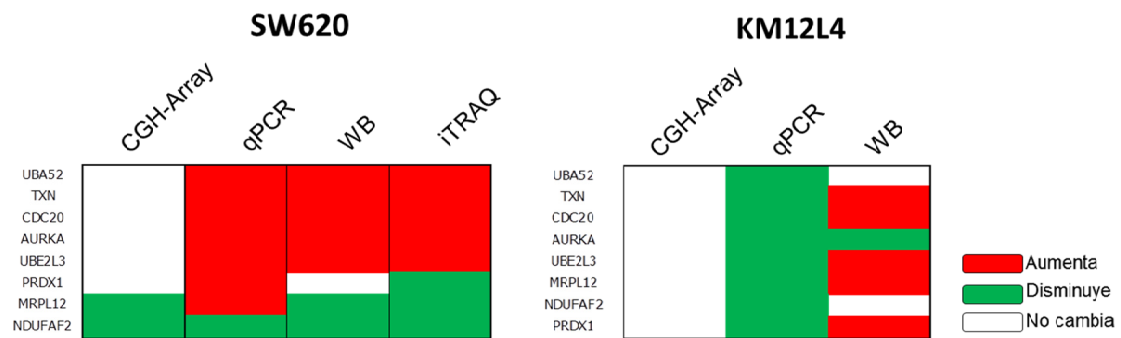


**Figura 73. Análisis de los niveles de expresión a nivel de mRNA y proteína de alguna de las proteínas desreguladas por el silenciamiento de PAUF implicadas en degradación proteosomal y ciclo celular.** A) qPCR del nivel de expresión de mRNA de estas proteínas en las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF (PAUF C) y control (Sc). Los p-valor se calcularon usando una prueba de ANOVA (\* p <0,05, \*\* p <0,01). B) Análisis mediante WB de la cantidad de proteína en el extracto nuclear de las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF (PAUF C) y control (Sc). La intensidad de cada banda se calculó mediante densitometría óptica y se representa el ratio Sc/PAUF C de intensidad de cada proteína mediante número debajo de cada WB.

En el caso de las células SW620, mediante qPCR se observó que la cantidad de mRNA de todas las proteínas analizadas era mayor en las células silenciadas en PAUF con respecto de las células control, salvo en el caso del mRNA de la proteína NDUFAF2. Los datos obtenidos por WB concuerdan mayoritariamente con lo observado por qPCR. Así, mediante WB se observó que la cantidad de las proteínas UBA52, AURKA, TXN, UBE2L3, Ciclina A y CDC20 era mayor en las células silenciadas en PAUF en comparación con las células control; que el nivel de expresión de MRPL-12 y NDUFAF2 es menor que las células silenciadas en PAUF y que el nivel

de expresión de PRDX1 no cambia entre ambos tipos celulares. En el análisis de la expresión de estas proteínas en las células KM12L4, se observó que los niveles de expresión del RNAm de todas ellas eran menores en las células silenciadas en PAUF en comparación con las células control. Sin embargo, por WB se observó que únicamente AURKA tenía menores niveles de expresión en las células silenciadas en PAUF. Los niveles de expresión de UBA52 y NDUFAF2 no cambiaban en ambos tipos celulares, mientras que la cantidad de TXN, UBE2L3, Ciclina A, CDC20, MRPL-12 y PRDX1 era mayor en las células silenciadas en PAUF con respecto de las células control.

El resumen de los datos de expresión de las 9 proteínas analizadas, obtenidos por diversas técnicas, se recoge en la Figura 74.



**Figura 74. Resumen de los datos de expresión de las proteínas analizadas obtenidos por diversas técnicas.**

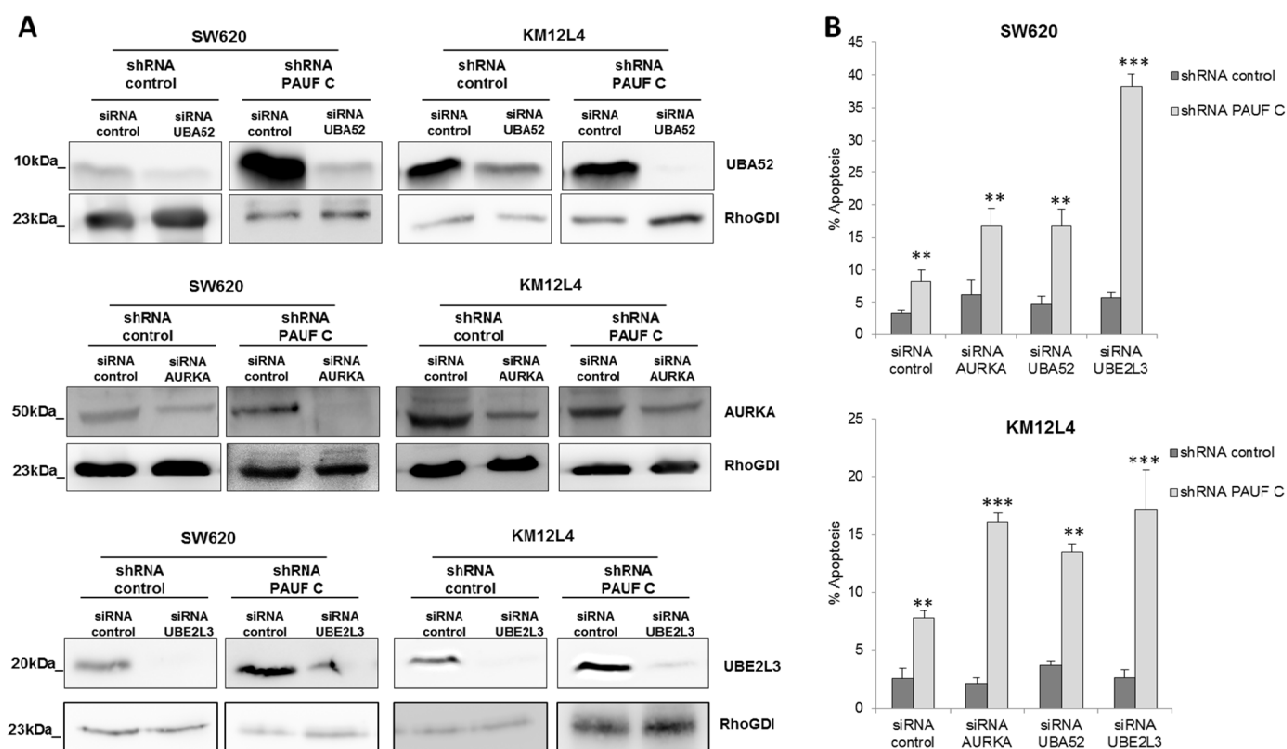
TXN, CDC20 y UBE2L3 tienen mayor expresión, valorada por WB, tanto en las células SW620 como en las KM12L4 silenciadas en PAUF respecto de las células control. Además, los genes que codifican para estas proteínas, se encuentran en regiones cromosómicas inalteradas en las células silenciadas en PAUF respecto de las células control. Otras proteínas, como UBA52 y AURKA, tienen niveles de expresión diferentes en las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF en comparación con las células control.

**25.2.16.9. Análisis del efecto del silenciamiento de AURKA, UBA52 y UBE2L3 sobre la apoptosis de las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF y control**

AURKA, UBA52 y UBE2L3 se han descrito como proteínas con un papel clave en el ciclo celular (245, 246) y en la ubiquitinación de proteínas para su posterior degradación por el proteosoma. Ambos procesos se han relacionado con la aneuploidía y además están significativamente regulados al alza en las células SW620 aneuploides establemente silenciadas en PAUF con respecto de las células control. Con el objetivo de analizar el papel que desempeñan AURKA, UBA52 y UBE2L3 en la aneuploidía de las células silenciadas en PAUF, se llevó a cabo el estudio del efecto del silenciamiento de estas proteínas sobre la apoptosis.

En primer lugar, se testó por WB la bajada de la expresión de AURKA, UBA52 y UBE2L3 24 h después de la transfección de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF con siRNAs específicos frente a estas proteínas (Figura 75A).

En segundo lugar, estos transfectantes se sometieron a análisis mediante citometría de flujo, para determinar el número de células apoptóticas de cada población celular. Se observó que, únicamente en las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF, el silenciamiento transitorio de estas proteínas aumentó de manera significativa el porcentaje de apoptosis celular en comparación con las células transfectadas con el siRNA control (Figura 75B).



**Figura 75. Análisis del silenciamiento transitorio de AURKA, UBA52 y UBE2L3 en las líneas celulares SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas en PAUF, y su efecto sobre la apoptosis celular.** A) Las células SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas en PAUF se transfectaron de manera transitoria con siRNAs específicos para las proteínas AURKA, UBA52 y UBE2L3, así como con un siRNA inespecífico que se utilizó como control y se obtuvo el extracto proteico celular total a las 24 después de la transfección. 30  $\mu$ g de cada extracto proteico se resolvieron en SDS-PAGE al 12,5% y se sometieron a transferencia utilizando anti-UBE2L3, anti-UBA52, anti-AURKA o anti-RhoGDI como control de carga. B) Los mismos transfectantes de A) se sometieron a un análisis del número de células apoptóticas mediante citometría de flujo. En los diagramas de barras se refleja la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.01$ ).

### 25.2.17. Análisis del efecto del silenciamiento de PAUF sobre el tratamiento celular con diferentes drogas

Las células silenciadas en PAUF tienen mayor apoptosis, arresto mitótico y además tienen regulada a la baja la maquinaria de respiración celular y regulada al alza la maquinaria de proteasoma, en comparación con las células control. Teniendo en cuenta todas estas características, se planteó la hipótesis de que el silenciamiento de PAUF podría sensibilizar a las células de CCR al tratamiento con drogas que afecten a la maquinaria de los microtúbulos, a la respiración mitocondrial, así como al funcionamiento del proteasoma. Con el objetivo de demostrar esta hipótesis, se evaluó

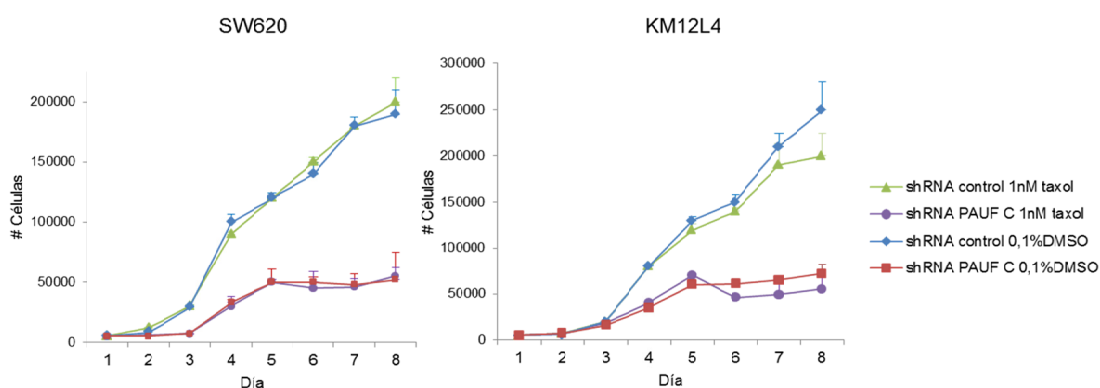
el efecto del tratamiento de células de CCR control y silenciadas en PAUF con diferentes drogas.

**25.2.17.1. Estudio del efecto del tratamiento de células de CCR control y silenciadas en PAUF con paclitaxel**

Los fármacos anticancerosos tales como los taxanos inducen la muerte celular a través de la inhibición de la polimerización / despolimerización de los microtúbulos durante la fase M del ciclo celular. Uno de estos fármacos es el taxol (o paclitaxel), comúnmente utilizado para tratar el cáncer de mama, ovario y pulmón, pero no el CCR (96). Se sabe que las células deficientes en APC (la mayoría de las células de CCR) son menos sensibles al tratamiento con taxol, debido a que presentan deterioro del paro mitótico (67, 97). Puesto que el silenciamiento de PAUF provoca un incremento del arresto mitótico y de la apoptosis celular, se hipotetizó que el silenciamiento de PAUF podría aumentar la sensibilidad de las células de CCR deficientes en APC a los taxanos. Con este planteamiento, se realizaron dos experimentos, uno de ellos de sensibilidad y otro de supervivencia a taxol de células de CCR silenciadas en PAUF y control.

En primer lugar, se evaluó la sensibilidad a baja concentración de taxol de las células SW620 y KM12L4 control y silenciadas en PAUF. Las células se incubaron durante 72 h con taxol (1 nM) o bien con DMSO al 0,1% como control, tras lo cual se lavaron y contaron cada día durante siete días. La incubación con taxol a una concentración de 1 nM no retardó la tasa de proliferación de ninguno de los tipos celulares estudiados (Figura 76). Es decir, el silenciamiento de PAUF no sensibiliza a las células de CCR a un retraso en su tasa de proliferación cuando son incubadas con taxol a 1 nM.

## RESULTADOS

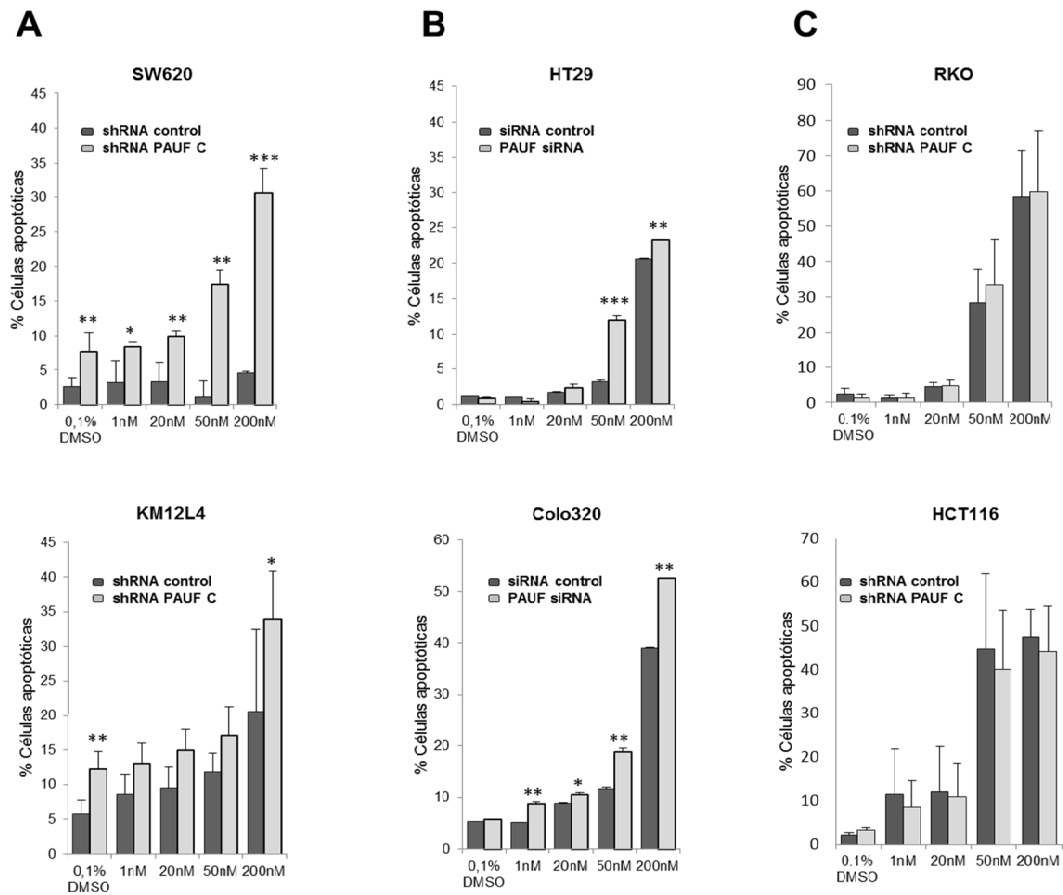


**Figura 76. Análisis del efecto del tratamiento con paclitaxel sobre la proliferación de las células establemente silenciadas en PAUF.** Las células SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas en PAUF se incubaron durante 72 h con paclitaxel 1nM o bien con DMSO al 0,1% como control. Tras este tiempo las células se lavaron, se incubaron en medio fresco y se contaron desde este día (día 1) hasta siete días después para valorar la velocidad de proliferación celular. No se observaron diferencias significativas entre la tasa de proliferación de las células pre-incubadas con DMSO al 0,1% y 1 nM.

Por otro lado, para analizar la supervivencia de las células de CCR control y silenciadas en PAUF tras su incubación con diferentes concentraciones de taxol (1 nM, 20 nM, 50 nM y 200 nM), se evaluó el porcentaje de células apoptóticas después de 24 h de tratamiento (Figura 77). Se observó que las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF eran significativamente más sensibles al tratamiento con paclitaxel que las células de control. En el caso de las SW620, incluso a concentraciones tan bajas como 1 nM, se observó una diferencia significativa después de 24 h de incubación (Figura 77A). Las células KM12L4 mostraron en general, menor sensibilidad al tratamiento con paclitaxel.

Para confirmar el efecto del silenciamiento de PAUF sobre la supervivencia celular mediada por el taxol, se analizó el efecto del silenciamiento transitorio de PAUF en las líneas celulares de CCR con APC *wild type*: HCT116 y RKO; y APC mutante: HT29 y Colo320; sobre la apoptosis mediada por el taxol. En las líneas celulares HT29 y Colo320, el silenciamiento de PAUF provocó un aumento significativo de las células apoptóticas, en particular a concentraciones de taxol de 50 y 200 nM (Figura 77B). Por otro lado, en las líneas celulares con APC *wild type* RKO y HCT116, el silenciamiento

transitorio de PAUF no produjo un incremento en la apoptosis celular mediado por el tratamiento con taxol (Figura 77C).

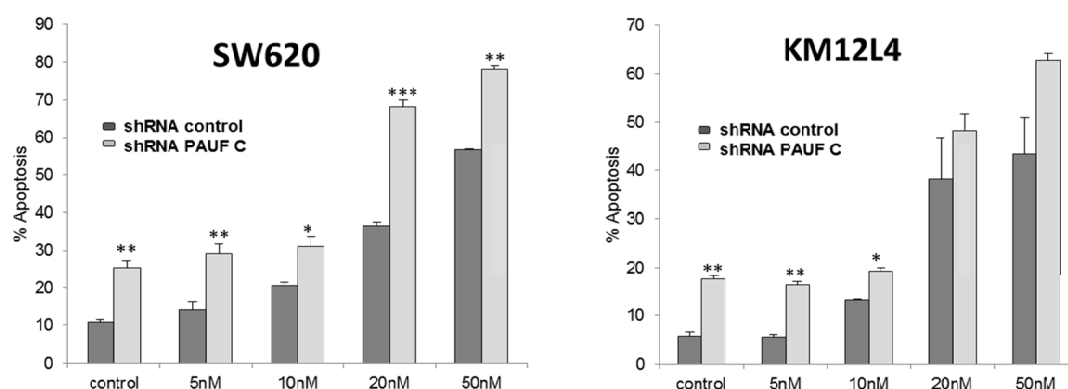


**Figura 77. Análisis del efecto del tratamiento con paclitaxel sobre la apoptosis de las células establemente silenciadas en PAUF.** (A, B y C) Análisis del efecto de la incubación con diferentes concentraciones de taxol (1 nM, 20 nM, 50 nM y 200 nM) durante 48 h de células control y silenciadas en PAUF sobre el porcentaje apoptosis celular. A) Estudio del porcentaje de apoptosis de las células SW620 (arriba) y KM12L4 (abajo) control y establemente silenciadas en PAUF incubadas con diferentes concentraciones de taxol. B) Estudio del porcentaje de apoptosis de las células HT29 (arriba) y Colo320 (abajo) control y transitoriamente silenciadas en PAUF mediante siRNAs, incubadas con 1 nM, 20 nM, 50 nM y 200 nM de taxol. C) Estudio del porcentaje de apoptosis de las células RKO (arriba) y HCT116 (abajo) control y transitoriamente silenciadas en PAUF mediante shRNAs, incubadas con diferentes concentraciones de taxol. En todos los casos, como control las células se incubaron durante 48 h con DMSO al 0,1%. Los datos representan la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

En resumen, estos datos sugieren que el silenciamiento de PAUF sensibiliza a células de CCR mutantes en APC al tratamiento con taxol.

### 25.2.17.2. Estudio del efecto del tratamiento de células de CCR control y silenciadas en PAUF con bortezomib

Debido a que parte de la maquinaria del proteasoma se encuentra sobre-expresada en las células establemente silenciadas en PAUF, se valoró la sensibilidad de las células de CCR control y silenciadas en PAUF, al tratamiento con bortezomib, un inhibidor del proteasoma, actualmente utilizado en la clínica para el tratamiento de determinados tipos de cáncer como el melanoma.



**Figura 78. Análisis del efecto del tratamiento con bortezomib sobre la apoptosis de las células establemente silenciadas en PAUF.** Estudio, mediante citometría de flujo, del efecto de la incubación con diferentes concentraciones de bortezomib (5 nM, 10 nM, 20 nM y 50 nM) durante 24h horas de células SW620 (izquierda) y KM12L4 (derecha) control y silenciadas en PAUF sobre el porcentaje apoptosis celular. Como control las células se incubaron durante con DMSO al 0,01%. Los datos representan la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Las células SW620 y KM12L4 control y establemente silenciadas en PAUF se incubaron durante 24 h con distintas concentraciones de bortezomib (5 nM, 10 nM, 20 nM y 50 nM) o con DMSO al 0,01% como control y se valoró el porcentaje de células apoptóticas (Figura 78). La apoptosis de las células SW620 y KM12L4 silenciadas en PAUF incubadas con bortezomib a 5 nM y 10 nM, así como únicamente la de las células SW620 silenciadas en PAUF incubadas con bortezomib a 20 nM y 50 nM, fue mayor que la de las células control. Sin embargo, la diferencia entra la apoptosis de las

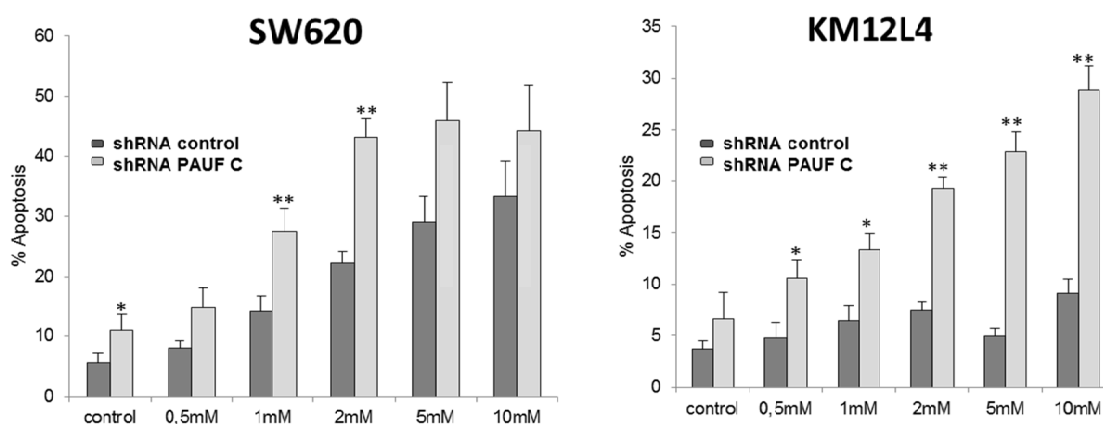
células silenciadas en PAUF incubadas con DMSO o con bortezomib a 5 nM y 10 nM, y la de las células control fue similar y no se incrementó por el tratamiento con bortezomib. El silenciamiento de PAUF solamente incrementó la sensibilidad de las células SW620 al tratamiento con bortezomib a 20 nM.

### **25.2.17.3. Estudio del efecto del tratamiento de células de CCR control y silenciadas en PAUF con peróxido de hidrógeno**

La respiración celular es un proceso regulado a la baja por el silenciamiento de PAUF. Por ello, a continuación se analizó la sensibilidad de las células establemente silenciadas en PAUF y control al tratamiento con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se observó que las células KM12L4 silenciadas en PAUF fueron significativamente más sensibles que las células control al tratamiento con concentraciones 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM de peróxido de hidrógeno durante 16 h (Figura 79).

Mientras que el incremento en la concentración de peróxido de hidrógeno se tradujo en un incremento de la apoptosis de las células KM12L4 silenciadas en PAUF, las células KM12L4 control fueron insensibles a la incubación con cualquier concentración de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, únicamente las células SW620 silenciadas en PAUF fueron más sensibles que las células control al tratamiento con concentraciones de 1 mM y 2 mM de peróxido de hidrógeno. Cabe destacar que, de manera general, las células SW620 control fueron más sensibles al tratamiento con peróxido de hidrógeno que las células KM12L4 control.

En resumen, de manera general, el silenciamiento de PAUF aumenta la sensibilidad celular al tratamiento con peróxido de hidrógeno en diferentes líneas de CCR



**Figura 79. Análisis del efecto del tratamiento con peróxido de hidrógeno sobre la apoptosis de las células estables silenciadas en PAUF.** Estudio, mediante citometría de flujo, del efecto de la incubación con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM) durante 16 h de células SW620 (izquierda) y KM12L4 (derecha) control y silenciadas en PAUF sobre el porcentaje apoptosis celular. Como control las células se incubaron durante 16 h con DMSO al 0,01%. Los datos representan la media con la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Los resultados del segundo bloque de esta Tesis Doctoral demuestran que PAUF es una proteína importante para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica en células de CCR. Mediante la caracterización de su interactoma, se ha observado que PAUF podría formar parte del *checkpoint* de mitosis, ya que interacciona con numerosas proteínas implicadas en este punto de control, como por ejemplo, APC. El silenciamiento de PAUF conlleva la disminución de la expresión de APC, y además promueve alteraciones en el perfil de ciclo celular, arresto mitótico y errores en la segregación cromosómica, que se traducen en un descenso de la viabilidad y en un aumento de la apoptosis celular. Además, el silenciamiento de PAUF sensibiliza a las células de CCR al tratamiento con diversos tipos de drogas. En definitiva, hemos caracterizado el papel de PAUF en CCR y lo hemos identificado como una potencial diana terapéutica del CCR.



## **DISCUSIÓN**



En esta Tesis Doctoral se han desarrollado dos apartados claramente diferenciados: la búsqueda y caracterización de nuevos biomarcadores del CCR mediante herramientas de proteómica cuantitativa y la caracterización funcional de LOXL1 y PAUF en CCR.

La caracterización de nuevos biomarcadores que permitan, no solo detectar el CCR en estadios tempranos sino predecir el desarrollo metastásico de la enfermedad, constituye un paso esencial para el control de la enfermedad. La mayoría de las muertes por CCR se deben al desarrollo metastásico de la enfermedad, lo que provoca que el CCR sea el cuarto cáncer más mortal a nivel mundial (1, 247). Aunque hoy en día se siguen estrategias quimioterapéuticas combinadas para el tratamiento de la metástasis del CCR (88), que incrementan la supervivencia entre 6 y 20 meses (89-95), únicamente el 10% de los pacientes diagnosticados con metástasis de CCR sobrevive a los cinco años del diagnóstico de la enfermedad. Estos datos evidencian la necesidad de la identificación de nuevos biomarcadores de la metástasis del CCR, así como del estudio de las proteínas y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo metastásico. Nuestro laboratorio se centra en este aspecto, mediante la utilización de herramientas proteómicas.

### **26. Nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas del CCR**

La metástasis del CCR ocurre preferentemente en hígado y en segundo lugar en pulmón (8, 9). Para que las células del tumor primario colorrectal sean capaces de metastatizar a un órgano distal deben sufrir una serie de alteraciones en procesos como degradación proteolítica, adhesión, invasión y migración celular, anoikis o angiogénesis (4). Si bien se sabe que éstos son los procesos que están alterados en la metástasis, no se conocen con exactitud las proteínas y los mecanismos moleculares que controlan cada una de estas etapas (10). Desde la hipótesis planteada por Stephen Paget, conocida

como "*seed and soil*" (248), que sostiene que la metástasis es organotrópica, no se han logrado progresos suficientes para el completo entendimiento de los mecanismos que rigen las metástasis de órganos específicos. A pesar de ello, se han realizado algunos avances, sobre todo en cáncer de mama, identificándose perfiles génicos que indican qué genes juegan un papel en la metástasis del tumor primario a un órgano específico (249-252). Este avance se ha conseguido también a nivel proteico, encontrándose que algunas proteínas exosomales son claves para determinar la metástasis organotrópica (253). Cabe destacar que muchos de los genes que son determinantes para el tropismo de las metástasis codifican para proteínas secretadas o de membrana (251).

En el caso del CCR, el conocimiento generado es muy limitado, de tal manera que todavía se desconocen todos los genes que regulan el tropismo de las células cancerosas de colon al hígado o al pulmón. Parece que IGF1R está implicado en la colonización hepática del CCR (254), mientras que los genes *E2F* y timidilato sintasa aumentan la supervivencia de las células de CCR en los pulmones (255).

Con estos antecedentes, nuestro laboratorio inició la caracterización en profundidad de las proteínas asociadas a la metástasis hepática del CCR (121), detectando a CDH17 (21) e IL13R $\alpha$ 2 (18) como proteínas necesarias para la colonización hepática del CCR. En esta Tesis Doctoral decidimos continuar con el análisis de los mecanismos y las proteínas implicadas en el desarrollo metastásico de la enfermedad, utilizando el modelo celular SW620, KM12SM y KM12L4, y herramientas de proteómica cuantitativa *label free*. Encontramos un gran número de proteínas desreguladas en las tres líneas celulares. La mayoría de ellas estaban comúnmente desreguladas en las células KM12L4 y KM12SM respecto de las células SW620, lo que indica la similitud de las líneas celulares KM12SM y KM12L4. El análisis de los procesos biológicos significativamente enriquecidos en los conjuntos de proteínas

desreguladas al alza y a la baja en las fracciones de secretoma y membrana reveló que estas proteínas estaban implicadas en procesos biológicos muy diferentes. Corroboramos, como se había descrito previamente (10, 256), que procesos celulares como organización de la matriz extracelular, muerte celular programada, regulación del *checkpoint* mitótico, expresión génica o ciclo celular están relacionados con la metástasis del CCR (10, 256). Además, identificamos otros procesos alterados en la metástasis del CCR, como el metabolismo de lípidos y glicoproteínas, la organización mitocondrial o la determinación de la localización proteica en diferentes orgánulos, que nunca antes habían sido descritos como procesos desregulados en la metástasis de esta enfermedad.

La reprogramación metabólica está firmemente establecida como un sello distintivo del cáncer (33). Las células tumorales, para hacer frente a sus grandes necesidades nutricionales, muestran alteraciones en el metabolismo de lípidos (257-259) y glicoproteínas (260). El exceso de lípidos y colesterol de las células tumorales se almacena en el interior celular en forma de moléculas LD, moléculas cuyo contenido en ésteres de colesterol se considera un signo distintivo de la agresividad del cáncer (261-264). Por otro lado, las glicoproteínas se han implicado en el desarrollo carcinogénico siendo también marcadores de la malignidad de algunos cánceres como el de pulmón (265), ovario o mama (266). Sin embargo, nada se sabe del papel concreto que podría desempeñar, ni de las ventajas “colonizadoras” que otorga la alteración del metabolismo de lípidos y glicoproteínas en las células metastásicas en comparación con las células del tumor primario. Los lípidos, como componentes esenciales de las balsas lipídicas de las membranas celulares (267), intervienen en procesos de señalización celular (268-271) e interacción con el estroma (272-275). Quizás, la participación lipídica en estos procesos podría explicar su regulación al alza en el secretoma de las células

metastásicas del CCR. De hecho, se sabe que tumores como el de ovario (276) o próstata (277) crecen en la vecindad de los adipocitos y metastatizan en un ambiente rico en adipocitos. Por otro lado, las glicoproteínas están implicadas en procesos moleculares y celulares fundamentales que ocurren en cáncer y son de gran importancia en la colonización metastásica, tales como señalización y comunicación celular, interacciones célula-matriz extracelular, angiogénesis tumoral o modulación inmune. CDH17 es un ejemplo de glicoproteína con demostrado papel en cáncer y su metástasis (21, 278, 279).

En definitiva, hemos demostrado que las alteraciones en las células metastásicas no sólo se dan a nivel de los procesos que hoy en día se conocen como las etapas de la cascada metastásica, sino que la desregulación de las células metastásicas respecto de las células tumorales es más amplia y abarca alteraciones en muchos otros procesos celulares.

El estudio proteómico de las líneas celulares de CCR SW620, KM12SM y KM12L4 nos permitió, además de caracterizar los procesos alterados en la metástasis del CCR, encontrar potenciales biomarcadores de la metástasis de esta enfermedad. Encontramos 111 proteínas del secretoma, cuya expresión aumentaba 5 o más veces en las células altamente metastásicas en comparación con las poco metastásicas y que podrían estar sobre-expresadas en pacientes con metástasis de CCR en comparación con pacientes con CCR o pacientes sanos, por lo que fueron consideradas para su posterior validación como posibles biomarcadores de la enfermedad.

El análisis realizado, mediante proteómica cuantitativa, de las muestras de secretoma soluble de pacientes con diferentes estadios de CCR permitió analizar en qué grupo de comparación (normal vs tumoral, normal vs adenoma, adenoma vs estadios

tempranos y estadios tempranos vs estadios tardíos) estaban significativamente desregulados los 111 potenciales biomarcadores seleccionados. Encontramos que 51 de ellos estaban significativamente desreguladas en las muestras normales respecto de las muestras tumorales. Concretamente, SHMT1, S100A9, PDIA4, CD44, MESDC2, GANAB, TGFBI, CPVL, CALR, CDH1, CTSC, CTSD, DSG2, S100P podrían funcionar como biomarcadores de los adenomas colorrectales. Otras proteínas como: PHGDH, CANT1, S100A9, TFF3, PRKCSH, HSPA5, GANAB, HSPG2, AGRN, LAMB1, CDH1, B2M, LSR, EPCAM, TPP1, DSG2, SPINT1 y IGFBP2, podrían ser marcadores de estadios I y II del CCR, mientras que LYZ, PLBD2, DNASE2, GNS, PPT1, CTSB, IDH1 podrían comportarse como biomarcadores de estadios tardíos de la enfermedad. En resumen, mientras que algunos potenciales biomarcadores como CDH1, GANAB o LAMB1, podrían funcionar, no solo como biomarcadores de la metástasis de esta enfermedad sino también como marcadores de cada estadio del CCR, otros como DNASE2, GNS, PPT1 o CTSB parecen ser específicos de la metástasis del CCR.

Por otro lado, encontramos que la alta expresión de 21 de los 111 candidatos biomarcadores se correlaciona con peor supervivencia global a la enfermedad. De las 21 proteínas, alguna de ellas se había relacionado poco o nada, como es el caso de PLOD1, con cáncer. PLOD1 es una lisil hidroxilasa que cataliza la hidroxilación de residuos lisilo en péptidos similares al colágeno (280) y está implicada en enfermedades como el síndrome de Ehlers-Danlos o la forma citoescoliótica del síndrome de tipo VI y Ehlers-Danlos (281). La función de PLOD1 es mantener la organización de la matriz extracelular, por lo que su sobre-expresión en la metástasis del CCR podría desencadenar modificaciones en la matriz extracelular que produjesen alteración de procesos pro-metastásicos como invasión o adhesión celular, de manera similar al papel que tienen las proteínas LOX. De las proteínas APLP2, ADAM10, SPON1 (282, 283) y

CALU (284, 285) apenas hay un par de artículos publicados que las relacionan con cáncer. APLP2 podría estar implicada en la viabilidad (286) y el crecimiento (287) de algunos tipos celulares de cáncer de páncreas y ADAM10 con la capacidad metastásica de células de cáncer de colon (288).

Otros candidatos seleccionados, como CD109 (289-291), ULBP2 (292-294), ERO1L (295) o S100A6, se habían relacionado con cáncer pero no concretamente con CCR, proponiéndose de hecho, como biomarcadores de cánceres de pulmón, mama u ovario, entre otros. CD109 es una glicoproteína cuya sobre-expresión se ha asociado a carcinoma de pulmón de células escamosas (296), cáncer de mama triple negativo (297), sarcoma epitelioides (un sarcoma de tejidos blandos relativamente raro y altamente maligno) (290) y carcinoma de la cavidad oral (291). A pesar de que *CD109* se ha descrito como un gen mutado frecuentemente y de manera significativa en cáncer de mama y colon (298), nada se sabe acerca del nivel de expresión ni del papel pronóstico de CD109 en CCR. CD109 modula negativamente la vía de señalización “pro-tumorigénica” mediada por TGF $\beta$ 1 (299), por lo que su papel en la metástasis del CCR debe ser independiente de su participación en esta vía de señalización. Cabe destacar que CD109 se ha descrito como una proteína con valor pronóstico para determinados tipos de cáncer (289-291), pero también como una posible diana terapéutica (290, 296, 297), por lo que no se podría descartar esta funcionalidad dual también en CCR. La relación entre S100A6 y cáncer descrita hasta el momento es contraria a la observada en este trabajo. La disminución de la expresión de S100A6 parece ser un buen marcador del cáncer de páncreas (300) y de pulmón de células pequeñas en estadio I (301), aunque también se ha observado que una alta expresión de S100A6 se relaciona con estadios avanzados del cáncer de ovario (302), así como con el comportamiento metastásico de líneas celulares de melanoma en ratones desnudos

(303). S100A6, es una proteína de unión a calcio encargada de regular la diferenciación celular y la progresión del ciclo celular (304). Además, como miembro de la familia de proteínas S100, está implicada la reorganización del citoesqueleto de actina y en motilidad celular (305). Estas funciones podrían ser la razón de su sobre-expresión en la metástasis del CCR.

Por último, alguna de las 21 proteínas seleccionadas como candidatos biomarcadores ya se había relacionado previamente con CCR. Este es el caso de *CLU*, que está relacionada además de con cáncer de mama (306, 307), próstata (308, 309), ovario (310) o esófago (311), con CCR (204, 207-210); *LAMB1*, implicada en CCR (211, 212) y cáncer de mama (312); o *VEGFA*, ampliamente relacionada con cáncer. Muchos de los estudios publicados relacionan la presencia de polimorfismos en la secuencia génica de *VEGFA* con el riesgo de desarrollo, así como con el pronóstico de CCR (213, 214, 313). *IGFBP3* es un miembro de la familia de proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (*IGFBP*), previamente implicado en desarrollo tumoral. Al igual que ocurre con *VEGFA*, numerosas publicaciones relacionan la presencia de polimorfismos en la secuencia génica de *IGFBP3* con el desarrollo de cáncer de mama (314, 315), próstata (314) u ovario (316, 317), entre otros. La relación entre *IGFBP3* y CCR conocida hasta ahora también tiene que ver con la presencia de determinados polimorfismos en *IGFBP3* (205, 206). Sin embargo, nada se ha descrito acerca del papel de la sobre-expresión de *IGFBP3* en el desarrollo de CCR ni de su posible utilización como biomarcador de la misma. De hecho, el papel de la sobre-expresión de *IGFBP3* en la metástasis del CCR es difícil de explicar, ya que en otros tipos de cáncer, como el de páncreas, *IGFBP3* inhibe la proliferación, adhesión y motilidad celular (318), posiblemente de manera dependiente de la unión con su receptor *TMEM219 / IGFBP-3R* (319), que ha demostrado tener efectos anti-

proliferativos y apoptóticos. Probablemente, IGFBP3 participe en la metástasis del CCR a través de una ruta de señalización independiente de la mediada por su receptor TMEM219 / IGFBP-3R.

HSP90B1 también se ha relacionado con cáncer, concretamente con el de pulmón (320), mama (321), cavidad oral (322), vesícula biliar (323) y también con CCR (324). En todos los casos, la sobre-expresión de HSP90B1 se relaciona con progresión tumoral. HSP90B1 es una chaperona, por lo que probablemente se encargue del plegamiento y estabilización de proteínas implicadas en procesos tumorales y metastásicos. Interesantemente, otra proteína implicada con el desarrollo metastático es QSOX1, quien además de estar relacionada con el desarrollo de cánceres como el de páncreas (325), mama (326, 327) y próstata (328), lo está con la diseminación celular metastásica, de la cual podría funcionar como biomarcador (329, 330). QSOX1 se ha asociado con fibroblastos del estroma tumoral, donde muestra capacidades de supresión tumoral involucradas en la regulación del crecimiento (331). Aquí identificamos a QSOX1 como una proteína del secretoma tumoral secretada por las células cancerosas endoteliales. QSOX1 cataliza la oxidación de grupos sulfhidrilo en tioles, contribuyendo a la formación de enlaces disulfuro en una variedad de proteínas secretadas. Mediante esta actividad, QSOX1 podría participar en la metástasis del CCR, siendo una proteína clave en las modificaciones post-traduccionales de proteínas secretadas pertenecientes al microambiente tumoral.

Como conclusión de este primer bloque de la Tesis Doctoral, hemos continuado con la caracterización proteómica de la metástasis de CCR iniciada previamente en nuestro laboratorio (121), encontrando nuevos prometedores biomarcadores y dianas terapéuticas de la metástasis de esta enfermedad, que podrían ser de gran utilidad para la proteómica clínica (332). Hemos propuesto una serie de potenciales biomarcadores del

CCR, los cuales, tras posteriores análisis, podrían funcionar como marcadores específicos de la metástasis de la enfermedad hacia hígado y pulmón.

### **27. Papel de LOXL1 y PAUF en CCR**

#### **27.1.LOXL1**

Poco se sabe acerca del papel de LOXL1 en cáncer (170, 171). Geum-Hwa Lee et al. identificaron a LOXL1 como una proteína necesaria para la colonización pulmonar de las células de cáncer de mama (171). LOXL1 no es la única proteína identificada con este papel. De hecho, el mecanismo molecular de la colonización metastásica pulmonar de las células de cáncer de mama está bien caracterizado, mejor que el de las células de CCR. Tanto es así que se ha descrito una “firma de la metástasis pulmonar”, con los genes desregulados en células de cáncer de mama que metastatizan a pulmón (251). Dentro de estos genes se encuentran MMP2, Osteonectina/SPARC, IL13R $\alpha$ 2 o VCAM1 (251). En otros estudios, como por ejemplo en el de Landemaine, et al., se identificaron más genes que predicen la metástasis de cáncer de mama a pulmón: DSC2, TFCP2L1, UGT8, ITGB8, ANP32E y FERMT1 (333, 334).

Por otro lado, en cáncer de vejiga parece que LOXL1 lleva a cabo un papel totalmente contrario, actuando como supresor tumoral (170). Hasta el desarrollo de esta Tesis Doctoral, LOXL1 no se había relacionado con CCR. Aquí, mostramos que *LOXLI* está amplificado en el 5% de los casos de CCR, que se sobre-expresa en tejido tumoral de colon respecto de tejido normal, y que es secretada diferencialmente por la línea celular de CCR que metastatiza a pulmón KM12L4, en comparación con las líneas celulares de CCR KM12SM y SW620. Esto sugiere que LOXL1 podría ser importante para la colonización pulmonar de las células de CCR, lo que estaría en concordancia

con la función que lleva a cabo LOXL1 en la metástasis pulmonar del cáncer de mama (171).

LOXL1, como proteína perteneciente a la familia de las lisil-oxidasas (335, 336), participa en procesos como la remodelación de la matriz extracelular y la hipoxia, que promueve la angiogénesis tumoral (337), la EMT (29, 338) y la invasión celular (162), todos ellos conocidos como procesos clave para la metástasis del cáncer (10). Estas funciones las lleva a cabo gracias a su secuencia C-terminal, que le otorga, a LOXL1 y a todos los miembros de la familia, su actividad amina oxidasa extracelular dependiente de cobre (162). Sin embargo, el dominio N-terminal, mal conservado entre los miembros de la familia, le proporciona a cada componente de la familia funciones adicionales a su actividad clásica, como por ejemplo la regulación del desarrollo, crecimiento y senescencia celular o la quimiotaxis (162). Este es el caso de las proteínas LOX y LOXL2, que también parecen tener funciones de reguladores transcripcionales (222), con un papel clave en la progresión tumoral. Aquí, mostramos los primeros datos de la distribución celular de LOXL1 en CCR, observando que no tiene localización nuclear en las líneas celulares SW620, KM12SM y KM12L4, lo que podría descartar, necesitándose más estudios para poder afirmarlo, su posible papel como regulador transcripcional en esta enfermedad.

La función que desempeña LOXL1 en CCR parece ser a través de la modulación de los procesos pro-metastásicos adhesión e invasión celular. El silenciamiento de LOXL1 disminuye significativamente la invasión y adhesión celular, de manera concordante a lo observado en cáncer de mama (171). Sin embargo, parece que LOXL1 no juega un papel sobre la proliferación de las células de CCR, como sí lo hace LOX, quien, de una manera dependiente de HIF1 $\alpha$ , promueve la proliferación celular (339).

Con el objetivo de conocer los mediadores de la acción de LOXL1 sobre la invasión y adhesión de las células de CCR, analizamos su interactoma mediante espectrometría de masas. Hasta el momento, prácticamente sólo se conocía que LOXL1 interactuaba con fibulina-5 para unirse a las fibras elásticas (340). Nosotros identificamos 331 proteínas pertenecientes al interactoma de LOXL1 en la línea celular KM12L4. Entre ellas están AP1B1, AP1G1, ARCN1 y ARL6IP1, implicadas en el transporte intracelular de proteínas. Interesantemente, encontramos que LOXL1 interacciona con proteínas como COL1A1, CSNK1A1, CTNNB1 y CTNND1, que participan en la regulación de la vía de señalización canónica Wnt, y por tanto son proteínas involucradas en los procesos de invasión y adhesión celular (341). Entre ellas destaca COL1A1, recientemente propuesta como marcador de mal pronóstico del cáncer gástrico (342), aunque se había identificado con anterioridad como un marcador de buen pronóstico de cáncer hepático (343). A pesar de que LOXL1 no desempeña una función en la proliferación de las células KM12L4, encontramos que interacciona con proteínas implicadas en la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, como CDK1, CUL4A, MCM3 y MCM7. En definitiva, aquí observamos que LOXL1 interacciona con proteínas que, además de estar involucradas en procesos de adhesión e invasión celular a partir de diferentes vías, como por ejemplo la vía de señalización Wnt, lo están en procesos como ciclo celular y regulación del transporte proteico intracelular.

En resumen, en esta Tesis Doctoral hemos demostrado, por primera vez, el potencial oncogénico de LOXL1 en CCR. Además, hemos caracterizado los mediadores proteicos de la señalización por LOXL1 que podrían explicar su implicación en estos procesos celulares. Entre las proteínas identificadas, una de las más interesantes fue COL1A1, una proteína con un papel dual en cáncer (342, 343), al igual que LOXL1. En futuros trabajos será necesario profundizar en el conocimiento de las alteraciones

causadas por el silenciamiento de LOXL1 en CCR, para así determinar su función en el desarrollo tumoral y en la colonización metastásica pulmonar.

### **27.2.PAUF**

Al comienzo de esta Tesis Doctoral, el papel de PAUF en cáncer era prácticamente desconocido. Se había descrito principalmente, como una proteína sobre-expresada en cáncer pancreático (143), mientras que la bibliografía existente sobre los niveles de expresión y la función de PAUF en CCR era muy escasa (121, 143, 344). Aquí, demostramos la relación existente entre PAUF y CCR.

En primer lugar identificamos a PAUF como una proteína regulada a la baja en tumor primario de CCR respecto de tejido de colon normal, y cuya expresión aumenta en metástasis en comparación con el tumor primario. Estos datos concuerdan con lo descrito previamente en el laboratorio, donde se observó que PAUF se sobre-expresa en las células KM12SM altamente metastásicas en comparación con las células parentales KM12C pobremente metastásicas (121). Sin embargo, estos datos proteómicos estaban en desacuerdo con los niveles de mRNA de PAUF en CCR recogidos en Cancer Genome Atlas (TCGA) (190). Las diferencias que existen entre el nivel de expresión de las poblaciones de mRNA y de proteínas se pueden explicar por varias razones: por la amplia población de especies que portan modificaciones químicas, por el tiempo variable de residencia y/o estabilidad de ambas moléculas en el interior de una célula o de un compartimento celular, por la traslocación intra y extracelular, por la modificación de las proteínas durante su intervención en procesos biológicos, etc. Por ello, la medición de la expresión de mRNA no suministra valores confiables de los cuales se puede deducir la abundancia y presencia de las proteínas traducidas, datos que sólo proporciona el estudio directo de las proteínas mediante proteómica o técnicas complementarias.

Se había descrito que PAUF promueve determinadas propiedades tumorigénicas como proliferación (143, 150, 153, 344), invasión (143, 150, 344), migración (143, 148, 150, 344, 345) y adhesión celular (149, 151, 344). Previamente en el laboratorio, se observó la misma tendencia de PAUF sobre la tumorigénesis de la línea celular de CCR KM12SM (121). En esta Tesis Doctoral, se validó el efecto del silenciamiento de PAUF sobre estas propiedades tumorigénicas, ampliando el número de células de CCR analizadas y utilizando las líneas celulares altamente metastásicas SW620 y KM12L4 donde PAUF aparece sobre-expresada, en comparación con las respectivas líneas celulares isogénicas parentales pobremente metastásicas SW480 y KM12C. Mediante el silenciamiento estable de PAUF en estas líneas celulares, corroboramos su participación en los procesos de adhesión e invasión celular en CCR.

Por otra parte, lo que primero llamó la atención después del silenciamiento estable de PAUF en las células SW620 y KM12L4, fue su fenotipo. La disminución de la expresión de PAUF provocó un claro aumento en el tamaño celular y nuclear. Nunca antes se había descrito este papel de PAUF, teniendo en cuenta además que se trataba de una proteína secretada. Se ha demostrado que, aparte de ser una proteína secretada, PAUF está presente en el núcleo celular y tiene un patrón de localización característico, prácticamente idéntico al de la proteína APC (61), encontrándose asociada a los microtúbulos y por lo tanto al huso mitótico y a los conos de crecimiento, unas estructuras cruciales para la extensión del filamento, la motilidad celular y la interacción con el microambiente (346).

Se había descrito que el silenciamiento de PAUF aumentaba el porcentaje de células en fase G0/G1 y lo disminuía en las fases S/G2 (344). Además, se podía intuir que el efecto de PAUF sobre el ciclo celular dependía del PAUF intracelular y no del PAUF secretado, ya que la incubación de las células MDSC con la proteína

recombinante PAUF no producía alteraciones en el perfil de ciclo celular (345). Con estos antecedentes, sumados a lo observado aquí sobre la localización celular de PAUF y el efecto de su silenciamiento sobre el tamaño nuclear, se decidió valorar el efecto del silenciamiento de PAUF sobre el perfil de ciclo celular de distintas líneas celulares de CCR. El silenciamiento de PAUF provocó una serie de alteraciones en el perfil de ciclo celular de las células deficientes en *APC*, como la ampliación y el desplazamiento de las fases G1, S y G2. El desplazamiento del perfil de ciclo sugiere la presencia de deslizamiento mitótico (*mitotic slippage*) durante el ciclo celular, que conduce a la acumulación de células tetraploides (347), como ocurrió con las células SW620 silenciadas en PAUF. Las alteraciones sobre el perfil de ciclo celular de las células KM12L4 no fueron tan evidentes, probablemente debido a la ya extensa aneuploidía de esta línea celular (173). El hecho de que los efectos del silenciamiento de PAUF sobre el perfil de ciclo celular únicamente sean evidentes en las líneas celulares deficientes en *APC*, parece indicar que el papel de PAUF depende del estado de *APC*. Esta razón podría ser una explicación adicional al hecho de que el silenciamiento estable de PAUF en las células KM12L4 (que son *APC wild type*) no produce tetraploidización, como sí ocurre en las células SW620 (que son mutantes en *APC*). Las células tetraploides pueden originarse a partir de la fusión celular, fallo de citocinesis, problemas en metafase o anafase, o por el fenómeno de endorreduplicación (68, 348, 349). Mientras que los fallos en la citocinesis y la fusión celular dan lugar a células binucleadas, la mitosis defectuosa o la endorreduplicación conducen a células con un único núcleo de gran tamaño (68). Este parece ser el caso de las células silenciadas en PAUF, las cuales presentan en su inmensa mayoría un solo núcleo celular de gran tamaño, siendo ocasional la presencia de células binucleadas y de micronúcleos.

Además de las alteraciones en el perfil de ciclo celular, el silenciamiento de PAUF produjo arresto mitótico, errores en la segregación cromosómica y presencia de cromosomas retardados. Los cromosomas retardados se forman por fallos en la maquinaria de corrección de errores de la fijación de los cromosomas al cinetocoro (350, 351), lo que sugirió que las células silenciadas en PAUF podrían presentar defectos en el *checkpoint* mitótico. De hecho, defectos en el *checkpoint* mitótico causados por el daño del huso mitótico inducen la parada del ciclo celular, lo que está de acuerdo con el aumento del número de células que muestran arresto mitótico después del silenciamiento de PAUF. El silenciamiento de PAUF también provocó un aumento de la apoptosis y una disminución de la proliferación de las células de CCR, lo que está en consonancia con lo descrito anteriormente en cáncer de páncreas (143, 150, 153, 344).

En resumen, hasta este punto, la localización celular de PAUF (muy similar a la de APC); el efecto de su silenciamiento sobre el perfil de ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular; así como la presencia de arresto mitótico y de grandes defectos en la segregación cromosómica después del silenciamiento de PAUF, apuntaban a una implicación de PAUF en el *checkpoint* mitótico.

Esta hipótesis se corroboró con los datos del *array*-CGH de las células SW620 y KM12L4 establemente silenciadas en PAUF en comparación con las células SW620 y KM12L4 control, que revelaron la presencia de numerosas alteraciones cromosomales en ambas líneas celulares. De nuevo los efectos fueron más evidentes en las células SW620, donde la mayoría de los cromosomas sufría alteración de gran parte o la totalidad de sus regiones. La localización y el tipo (amplificación o delección) de las extensas alteraciones cromosómicas fueron diferentes entre las líneas celulares SW620 y KM12L4, lo que sugiere existencia de aleatoriedad de este proceso. Estas alteraciones

al azar parecen similares a los desequilibrios aleatorios en los adenomas colorrectales esporádicos (49) y podrían contribuir a la heterogeneidad molecular observada en CCR. Estos datos, en concordancia con el hecho de que las células tetraploides se consideran intermedios transitorios de una aneuploidía más amplia e inestabilidad cromosómica (CIN) (348), confirmaron que la expresión de PAUF es crítica para el mantenimiento de la inestabilidad genómica, reafirmaron la función de PAUF como componente del *checkpoint* mitótico y sugirieron que el aumento de la aneuploidía causada por el silenciamiento de PAUF posiblemente se atribuya a la desregulación cromosómica y a la formación de cromosomas retardados.

El análisis del interactoma de PAUF mediante espectrometría de masas terminó de confirmar el papel de PAUF en el *checkpoint* mitótico. Hasta los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, el interactoma de PAUF era prácticamente desconocido. Únicamente se había descrito que PAUF era ligando de los receptores toll-like TLR2 (con más afinidad) y TLR4 (con menos afinidad) (152), así como del receptor CXCR4 (144, 150). Aquí, identificamos numerosas proteínas pertenecientes al interactoma de PAUF que podrían explicar su implicación en la inestabilidad cromosómica y en otros procesos como invasión y adhesión celular. PAUF interacciona con múltiples proteínas del *checkpoint* mitótico, como ANAPC1 y ANAPC5, SKA2/3, NEK9, PUM1 o proteínas del complejo augmin, las cuales se encargan de garantizar la correcta duplicación del material genético en las células hijas (352), por lo que son fundamentales para prevenir la desregulación cromosómica y la aneuploidía (353). PAUF interacciona además con proteínas implicadas en la duplicación de los centrosomas y en la transición G2/M, como CENPJ, CETN2, CEP192 o PCNT; así como con ZW10, CDC23, NCAPG o NAP1L1, unas proteínas relacionadas con la segregación cromosómica y la organización de los cromosomas. ZW10 es una proteína

con funciones aparentemente dispares como la regulación de la localización de dineína y Mad2 en los cinetocoros, motilidad de la membrana y regulación del tráfico vesicular entre RE y aparato de Golgi (354). Al igual que PAUF, se localiza en los microtúbulos y su integridad es esencial para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica, ya que entre sus funciones está el asegurar la correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis (355). El resto de proteínas del interactoma de PAUF estaban relacionadas con otros aspectos del ciclo celular, con el establecimiento de la polaridad celular, la organización de los microtúbulos del citoesqueleto y la muerte celular programada, entre otros.

Curiosamente, otra proteína que forma parte del interactoma de PAUF es APC. Aquí mostramos que PAUF y APC no solo comparten patrón de localización y efecto sobre la CIN, sino que además interaccionan entre sí. La similitud funcional entre estas dos proteínas es difícil de explicar. APC es una proteína multifuncional grande, que consta de 2843 aminoácidos y contiene sitios de unión para múltiples proteínas incluyendo  $\beta$ -catenina, reguladores del citoesqueleto, factores Rac y microtúbulos (60). La capacidad de APC de unirse a microtúbulos y centrosomas, a través de un dominio de unión a EB1, se ha relacionado con la iniciación de CIN (49, 229). Por el contrario, PAUF es una proteína pequeña de 208 aminoácidos compuesta de un único dominio de jacalina sin homología con APC. Quizás la similitud fenotípica de las células silenciadas en PAUF y en APC se deba a que PAUF, de alguna manera, controla los niveles de expresión de APC. Aquí observamos que PAUF modula la expresión génica de alguna de las proteínas con las que interacciona, entre las que se encuentra APC. APC forma un complejo con axina, glucógeno sintasa quinasa  $3\beta$  y caseína quinasa que se encarga de la degradación de  $\beta$ -catenina. De esta manera, la pérdida de APC conduce a la acumulación de  $\beta$ -catenina nuclear y a la activación de la vía Wnt, que es un sello

distintivo de la progresión del CCR (65), así como a la disminución de los niveles de E-cadherina. Aquí observamos que el silenciamiento de PAUF condujo a la pérdida de APC, lo que produjo un claro aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina, acompañado de una reducción en los niveles de E-cadherina. Algunos trabajos han sugerido que la expresión estable de  $\beta$ -catenina con la consecuente activación inapropiada de la vía de señalización Wnt también podrían contribuir a la CIN (60, 66). De hecho, el aumento en el tamaño nuclear después del silenciamiento de PAUF podría explicarse por la notable diferencia en el tamaño nuclear entre las células positivas para  $\beta$ -catenina y el tejido normal con APC (67). E-cadherina es una proteína de adhesión celular, cuya desregulación permite el desprendimiento de las células tumorales, facilitando su extravasación y colonización metastásica (356). El valor pronóstico de las moléculas de adhesión en la metástasis hepática de la CCR ha sido ampliamente estudiado. Altos niveles de mRNA de E-cadherina en pacientes con CCR se asocian con una mayor supervivencia general, mientras que la ausencia se relaciona con menor supervivencia (357). De hecho, la expresión reducida de E-cadherina y el aumento de los niveles de  $\beta$ -catenina nucleares se asocian con la formación de metástasis hepáticas (358, 359). De esta manera, podría decirse que la disminución de la expresión de PAUF, además de ayudar a la iniciación y la progresión tumoral, podría ser un marcador del desarrollo metastásico de CCR.

La aneuploidía, que es consecuencia de la CIN, causa alteraciones globales en el transcriptoma y en el proteoma celular (50), conduciendo a lo que se denomina "respuesta al estrés aneuploide" (360) que se caracteriza por un intento de las células de corregir los desequilibrios de la estequiometría proteica, aumentando la degradación de proteínas, así como las vías de plegado proteico. Es decir, las células aneuploides tienen que hacer frente a un exceso de síntesis de proteínas debido a la presencia de

cromosomas extra, lo que provoca un considerable estrés celular. Este fenómeno se analizó previamente en células de levadura que tienen un cromosoma extra (361) y se observó que la aneuploidía provoca un aumento del ciclo de síntesis y degradación de proteínas y una disminución de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) para mejorar la aptitud de las células de levadura aneuploides. Este es uno de los pocos estudios donde se ha abordado sistemáticamente el estudio de las alteraciones en el proteoma de células aneuploides. De hecho, los mecanismos que permiten a las células cancerosas sobrevivir al estrés asociado a la aneuploidía son en su mayoría desconocidos.

Aquí, consideramos que las células tetraploides SW620 establemente silenciadas en PAUF eran un excelente modelo de tetraploidización inducida, ideal para la caracterización proteómica de la respuesta de las células cancerosas al estrés inducido por CIN. Mediante proteómica cuantitativa, observamos que el silenciamiento de PAUF provoca la desregulación de numerosas proteínas, muchas de las cuales se encuentran en regiones cromosómicas inalteradas, lo que parece indicar que la regulación de la expresión proteica por parte de PAUF se da por dos vías: una dependiente de la CIN y la alteración del número de copias génicas; y otra independiente de su efecto sobre la CIN. En concordancia con lo descrito previamente por Dephoure N. et al. (361), las células aneuploides SW620 silenciadas en PAUF presentan un aumento significativo en las vías de degradación y plegado de proteínas y una disminución significativa de la expresión de proteínas asociadas a la respiración mitocondrial y el metabolismo de proteínas. Por otra parte, muchas de las proteínas desreguladas por el silenciamiento de PAUF, entre las que se encuentran AURKA, UBA52 y UBE2L3, estaban involucradas en el ciclo celular (245, 246). Aquí observamos que el silenciamiento de estas tres proteínas en las células establemente silenciadas en PAUF aumentó la apoptosis celular,

lo que sugiere que la sobre-expresión de AURKA, UBA52 y UBE2L3 en las células SW620 aneuploides podría ser un mecanismo de defensa ante la ya extensa apoptosis celular que sufren. En resumen, aquí demostramos que la “respuesta al estrés aneuploidie” también se da en células de mamífero, e implica la regulación al alza de la degradación y el plegado proteico, así como la disminución de la respiración mitocondrial. Además, las células aneuploides probablemente aumenten la expresión de otras proteínas implicadas directamente en el mantenimiento de la supervivencia celular, como es el caso de AURKA, UBA52 y UBE2L3 en las células SW620 aneuploides.

El aumento de la tasa de CIN sobre un umbral crítico podría ser una terapia tumoral eficaz. De hecho, bajos niveles de CIN son promotores de tumores y altos niveles de CIN conducen a muerte celular y supresión tumoral (50). Por esta razón, el paclitaxel, un taxano que induce muerte celular a través de la inhibición de la polimerización/despolimerización de los microtúbulos durante la fase M del ciclo celular, es la droga más eficaz para tratar los tumores de pacientes que exhiben CIN (96). Aunque la mayoría de las células de CCR esporádico presentan CIN, también son deficientes en *APC*, lo que les hace ser insensibles al tratamiento con taxol, debido a un deterioro del arresto mitótico (67, 97). PAUF y *APC* son proteínas muy similares en cuanto a localización celular y efecto que causa su silenciamiento sobre la CIN. Sin embargo, difieren en que el silenciamiento de *APC* no sólo no induce parada mitótica (362), sino que además funciona como una señal anti-apoptótica para células cancerosas (67). En esta Tesis Doctoral demostramos que la pérdida de PAUF induce detención mitótica y apoptosis, además de gran CIN. Por ello, hipotetizamos que el silenciamiento de PAUF podría aumentar la sensibilidad de las células de CCR al tratamiento paclitaxel. En efecto, las células de CCR con *APC* mutado y silenciadas en PAUF

fueron más sensibles al tratamiento con paclitaxel, lo que sugiere que el silenciamiento de PAUF podría ser útil en pacientes con CCR porque mejoraría la respuesta a las drogas antimitóticas. La alta sensibilidad de las células silenciadas con PAUF a dosis bajas de taxol (1nM) abre nuevas oportunidades terapéuticas para el CCR, exponiendo a PAUF como una posible diana terapéutica de este tipo de cáncer. El papel de PAUF como diana terapéutica se había validado previamente en modelos *in vivo* de cáncer de páncreas, donde la inhibición de la acción de PAUF con anticuerpos bloqueantes (143, 149, 363), inhibía la proliferación tumoral de células de cáncer de páncreas, así como la capacidad de formar metástasis (149).

En la validación del papel de PAUF como diana terapéutica del CCR, utilizamos, además del taxol, otros tipos de drogas. Como se comentó anteriormente, las células aneuploides silenciadas en PAUF llevan a cabo la "respuesta al estrés causada por aneuploidia" (360), que se caracteriza por un intento de las células de corregir los desequilibrios de la estequiometría de proteínas, aumentando las vías de degradación proteico. Como consecuencia, existe una sensibilidad aumentada a los compuestos que interfieren con la degradación y plegamiento de las proteínas, como es el bortezomib. Aquí, observamos que el silenciamiento de PAUF en células de CCR deficientes en *APC* sensibiliza a las células de CCR al tratamiento con bortezomib y con peróxido de hidrógeno.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de PAUF en células deficientes en *APC* podría ser una buena estrategia terapéutica para la sensibilización de las células de CCR al tratamiento con diversos tipos de fármacos, como el paclitaxel o el bortezomib. El rango de fármacos a los que sensibiliza el silenciamiento de PAUF podría ser mayor. Se ha descrito que la inhibición de la acción de PAUF con anticuerpos bloqueantes sensibiliza aún más a las células CFPAC-1 al

tratamiento con gemcitabina (149, 364), un fármaco actualmente utilizado para el tratamiento de cáncer de páncreas, vejiga o mama.

Por último, además de diana terapéutica, PAUF se podría utilizar con biomarcador de la metástasis del CCR. Aquí observamos que la expresión de PAUF disminuye en el tumor primario para luego aumentar en la metástasis de CCR. PAUF se ha propuesto como biomarcador de otros tipos de cáncer, como el de cérvix (147) o el de ovario (146), donde su nivel de expresión se asocia con mal pronóstico. En CCR poco se ha estudiado el posible papel pronóstico de PAUF. Polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) localizados en sitios de unión de miRNAs a diversos genes pueden tener un impacto en el pronóstico de los pacientes con este tipo de cáncer (365). Este es también el caso del gen que codifica para PAUF. Se ha observado que el SNP PAUF rs12373A>C (que probablemente afecte al nivel de expresión de PAUF) se asocia significativamente con el pronóstico de CCR, y más concretamente, con el intervalo libre de enfermedad (365).

Como resumen de esta parte del segundo bloque de la Tesis Doctoral, hemos demostrado que PAUF es una proteína clave para el mantenimiento de la estabilidad cromosomal de las células de CCR, donde parece funcionar como un supresor tumoral, de manera similar a APC. PAUF participa en la preservación de la estabilidad genómica mediante la estabilización de la red de proteínas implicadas en los puntos de control del ensamblaje del huso mitótico y la segregación cromosómica. Hemos demostrado que interactúa con la red de proteínas de APC, imitando muchos de los papeles multifuncionales de APC, con algunas diferencias relevantes en la detención mitótica y la inducción de apoptosis. Además, PAUF regula los niveles de APC, de tal manera que el silenciamiento de PAUF provoca una disminución de los niveles proteicos de APC. Probablemente, la pérdida observada de expresión de PAUF en el tumor colorrectal

primario podría contribuir a la pérdida de APC y a los efectos asociados sobre la aneuploidía y el aumento de  $\beta$ -catenina nuclear, promoviendo un fenotipo mesenquimal y la progresión del CCR. En la metástasis del CCR, PAUF podría desempeñar un papel importante en la invasión y adhesión celular. Por último, nuestros resultados sugieren que la combinación del silenciamiento de PAUF y el tratamiento con diferentes drogas, podría ser una nueva estrategia terapéutica de pacientes con CCR.



## **CONCLUSIONES**



1. Hemos corroborado la capacidad colonizadora pulmonar de las células de CCR KM12L4.
2. Las proteínas alteradas en la metástasis de CCR participan en más procesos biológicos de los conocidos hasta ahora como pertenecientes a la “cascada metastásica”, como por ejemplo ciclo celular, muerte celular, transporte intracelular, organización mitocondrial o metabolismo de lípidos y glicoproteínas, entre otros.
3. Hemos identificado 21 posibles candidatos biomarcadores de metástasis de CCR cuya alta expresión se asocia con menor supervivencia a la enfermedad, entre los que destacan VEGFA, CD109, QSOX1, PLOD1, o las lamininas LAMB1, LAMC1 y LAMA5.
4. LOXL1 está regulado al alza en CCR, a nivel de RNA y de proteína, y se secreta de manera exclusiva por las células de CCR que metastatizan a pulmón KM12L4 en comparación con las células SW620 y KM12SM, lo que sería responsable de la colonización pulmonar de las células KM12L4.
5. LOXL1 participa en la adhesión e invasión de las células HEK293 y, probablemente, de las células KM12L4. En células KM12L4, LOXL1 interacciona con proteínas implicadas en procesos celulares diferentes a adhesión e invasión, como por ejemplo la vía de señalización del receptor de lectina tipo C, la transición de las fases G1/S de ciclo celular, transporte intracelular de proteínas o la regulación de la vía de señalización canónica Wnt, entre otras.
6. La expresión de PAUF disminuye en el tumor primario de cáncer de colon para posteriormente aumentar en la metástasis hepática de CCR.

7. El silenciamiento estable de PAUF provoca un descenso en la adhesión e invasión, así como un aumento en el tamaño y complejidad celular y nuclear de las células SW620 y KM12L4. Además, el silenciamiento de PAUF provoca un desplazamiento del perfil de ciclo celular, con ampliación de las fases G1, S y G2, de las células de CCR deficientes en *APC*, arresto mitótico y errores en las mitosis que desencadenan en un aumento de la apoptosis y un descenso en la proliferación celular. Por último, el silenciamiento de PAUF provoca inestabilidad genómica en las células SW620 y KM12L4. Todos estos datos sugieren la participación de PAUF en el *checkpoint* mitótico.
8. PAUF muestra una distribución ubicua dentro de la célula, enormemente similar a la de *APC*, encontrándose en el núcleo y en el citosol, donde se asocia a microtúbulos, huso mitótico y conos de crecimiento.
9. PAUF interacciona con múltiples proteínas, destacando ZW10 o *APC*, que participan principalmente en ciclo celular, y concretamente, en *checkpoint* mitótico, lo que corrobora el papel de PAUF como componente de este punto de control. Además, el silenciamiento de PAUF provoca la desregulación de alguna de las proteínas con las que interacciona, como *APC*. Consecuentemente, el silenciamiento de PAUF provoca una disminución de los niveles de expresión de *APC* y E-cadherina, y un aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina nucleares, sugiriendo que la pérdida de PAUF podría promover la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la progresión tumoral en CCR.
10. Las células SW620 tetraploides establemente silenciadas en PAUF son un buen modelo de tetraploidización inducida para la caracterización proteómica de la respuesta de las células cancerosas al estrés inducido por CIN. Las células aneuploides presentan sobre-expresión de la maquinaria implicada en la

replicación del DNA y en la degradación proteica mediada por el proteasoma; mientras que tienen una regulación a la baja de la maquinaria implicada en la respiración celular.

11. El silenciamiento de PAUF provoca la desregulación de 232 proteínas nucleares, destacando AURKA, UBA52, UBE2L3, la mitad de las cuales se encuentran en regiones cromosómicas inalteradas, sugiriendo que PAUF desencadena desregulación proteica de manera independiente de CIN, posiblemente a través de la regulación transcripcional. El silenciamiento de AURKA, UBA52 y UBE2L3 aumenta la apoptosis de las células silenciadas en PAUF, lo que sugiere que estas proteínas son claves en el mantenimiento de la viabilidad celular de las células aneuploides.
12. El silenciamiento de PAUF sensibiliza a células de CCR mutantes en *APC* al tratamiento con taxol, bortezomib y peróxido de hidrógeno, sugiriendo que el silenciamiento de PAUF, combinado con el tratamiento quimioterapéutico, podría ser una buena estrategia terapéutica a seguir en pacientes con CCR.



## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;136(5):E359-86. Epub 2014/09/16.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global cancer statistics, 2002*. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(2):74-108. Epub 2005/03/12.
3. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The oncologist*. 2007;12(1):20-37. Epub 2007/01/18.
4. Kopfstein L, Christofori G. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63(4):449-68. Epub 2006/01/18.
5. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(5):392-401. Epub 2006/03/31.
6. Bremnes RM, Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011;6(1):209-17. Epub 2010/11/26.
7. Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(12):858-70. Epub 2013/11/23.
8. Galandiuk S, Wieand HS, Moertel CG, Cha SS, Fitzgibbons RJ, Jr., Pemberton JH, et al. Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1992;174(1):27-32. Epub 1992/01/11.
9. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, et al. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *The Journal of pathology*. 1986;150(3):195-203. Epub 1986/11/01.
10. Rudmik LR, Magliocco AM. Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2005;92(4):347-59. Epub 2005/11/22.
11. Yoshimoto M, Itoh F, Yamamoto H, Hinoda Y, Imai K, Yachi A. Expression of MMP-7(PUMP-1) mRNA in human colorectal cancers. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1993;54(4):614-8. Epub 1993/06/19.
12. Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, Matrisian LM. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Molecular carcinogenesis*. 1994;10(4):199-206. Epub 1994/08/01.
13. Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut*. 1999;45(2):252-8. Epub 1999/07/14.
14. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer research*. 1995;55(18):3964-8. Epub 1995/09/15.
15. Kang S, Maeda K, Chung Y, Onoda N, Ogawa Y, Takatsuka S, et al. Vascular endothelial growth factor expression correlates with hematogenous metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Oncology reports*. 1997;4(2):381-4. Epub 1997/03/01.
16. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer research*. 2003;63(13):3833-9. Epub 2003/07/04.
17. Barderas R, Bartolome RA, Fernandez-Acenero MJ, Torres S, Casal JI. High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. *Cancer research*. 2012;72(11):2780-90. Epub 2012/04/17.
18. Bartolome RA, Garcia-Palmero I, Torres S, Lopez-Lucendo M, Balyasnikova IV, Casal JI. IL13 Receptor alpha2 Signaling Requires a Scaffold Protein, FAM120A, to Activate the FAK and

- PI3K Pathways in Colon Cancer Metastasis. *Cancer research*. 2015;75(12):2434-44. Epub 2015/04/22.
19. Berndorff D, Gessner R, Kreft B, Schnoy N, Lajous-Petter AM, Loch N, et al. Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca(2+)-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. *The Journal of cell biology*. 1994;125(6):1353-69. Epub 1994/06/01.
  20. Luque-Garcia JL, Martinez-Torrecuadrada JL, Epifano C, Canamero M, Babel I, Casal JI. Differential protein expression on the cell surface of colorectal cancer cells associated to tumor metastasis. *Proteomics*. 2010;10(5):940-52. Epub 2010/01/06.
  21. Bartolome RA, Barderas R, Torres S, Fernandez-Acenero MJ, Mendes M, Garcia-Foncillas J, et al. Cadherin-17 interacts with alpha2beta1 integrin to regulate cell proliferation and adhesion in colorectal cancer cells causing liver metastasis. *Oncogene*. 2014;33(13):1658-69. Epub 2013/04/23.
  22. Bartolome RA, Pelaez-Garcia A, Gomez I, Torres S, Fernandez-Acenero MJ, Escudero-Paniagua B, et al. An RGD motif present in cadherin 17 induces integrin activation and tumor growth. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(50):34801-14. Epub 2014/10/23.
  23. Bartolome RA, Torres S, Isern de Val S, Escudero-Paniagua B, Calvino E, Teixido J, et al. VE-cadherin RGD motifs promote metastasis and constitute a potential therapeutic target in melanoma and breast cancers. *Oncotarget*. 2017;8(1):215-27. Epub 2016/12/15.
  24. Debinski W, Gibo DM, Hulet SW, Connor JR, Gillespie GY. Receptor for interleukin 13 is a marker and therapeutic target for human high-grade gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5(5):985-90. Epub 1999/06/03.
  25. Mandal D, Levine AD. Elevated IL-13Ralpha2 in intestinal epithelial cells from ulcerative colitis or colorectal cancer initiates MAPK pathway. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(5):753-64. Epub 2009/12/17.
  26. Lin C, Liu H, Zhang H, He H, Li H, Shen Z, et al. Interleukin-13 receptor alpha2 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer after gastrectomy. *Oncotarget*. 2016;7(31):49281-8. Epub 2016/06/29.
  27. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309-22. Epub 2012/03/24.
  28. Torres S, Garcia-Palmero I, Herrera M, Bartolome RA, Pena C, Fernandez-Acenero MJ, et al. LOXL2 Is Highly Expressed in Cancer-Associated Fibroblasts and Associates to Poor Colon Cancer Survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(21):4892-902. Epub 2015/07/25.
  29. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906. Epub 2009/11/26.
  30. Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, et al. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer cell*. 2009;15(1):35-44. Epub 2008/12/30.
  31. Herranz N, Dave N, Millanes-Romero A, Morey L, Diaz VM, Lorenz-Fonfria V, et al. Lysyl oxidase-like 2 deaminates lysine 4 in histone H3. *Molecular cell*. 2012;46(3):369-76. Epub 2012/04/10.
  32. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.
  33. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.
  34. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*. 2003;361(9368):1496-501. Epub 2003/05/10.

35. Baena R, Salinas P. Diet and colorectal cancer. *Maturitas*. 2015;80(3):258-64. Epub 2015/01/27.
36. Raimondi S, Botteri E, Iodice S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Gene-smoking interaction on colorectal adenoma and cancer risk: review and meta-analysis. *Mutation research*. 2009;670(1-2):6-14. Epub 2009/07/11.
37. Samadder NJ, Jasperson K, Burt RW. Hereditary and common familial colorectal cancer: evidence for colorectal screening. *Digestive diseases and sciences*. 2015;60(3):734-47. Epub 2014/12/17.
38. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine*. 1988;319(9):525-32. Epub 1988/09/01.
39. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-9. Epub 1999/01/01.
40. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67. Epub 1990/06/01.
41. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer*. 1992;70(6 Suppl):1727-31. Epub 1992/09/15.
42. Russo A, Pacchierotti F, Cimini D, Ganem NJ, Genesca A, Natarajan AT, et al. Genomic instability: Crossing pathways at the origin of structural and numerical chromosome changes. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2015;56(7):563-80. Epub 2015/03/19.
43. Copija A, Waniczek D, Witkos A, Walkiewicz K, Nowakowska-Zajdel E. Clinical Significance and Prognostic Relevance of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer Patients. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1). Epub 2017/01/10.
44. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, et al. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer research*. 1999;59(20):5068-74. Epub 1999/10/28.
45. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(7):489-501. Epub 2002/07/03.
46. Ferracin M, Gafa R, Miotto E, Veronese A, Pultrone C, Sabbioni S, et al. The methylator phenotype in microsatellite stable colorectal cancers is characterized by a distinct gene expression profile. *The Journal of pathology*. 2008;214(5):594-602. Epub 2008/02/05.
47. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(12):988-93. Epub 2004/12/02.
48. van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut*. 2002;51(6):797-802. Epub 2002/11/13.
49. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2059-72. Epub 2010/04/28.
50. Funk LC, Zasadil LM, Weaver BA. Living in CIN: Mitotic Infidelity and Its Consequences for Tumor Promotion and Suppression. *Developmental cell*. 2016;39(6):638-52. Epub 2016/12/21.
51. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2004;23(1-2):11-27. Epub 2004/03/06.
52. McKinley KL, Cheeseman IM. Polo-like kinase 1 licenses CENP-A deposition at centromeres. *Cell*. 2014;158(2):397-411. Epub 2014/07/19.
53. Zhang G, Lischetti T, Hayward DG, Nilsson J. Distinct domains in Bub1 localize RZZ and BubR1 to kinetochores to regulate the checkpoint. *Nature communications*. 2015;6:7162. Epub 2015/06/03.
54. Hiruma Y, Sacristan C, Pachis ST, Adamopoulos A, Kuijt T, Ubbink M, et al. CELL DIVISION CYCLE. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science*. 2015;348(6240):1264-7. Epub 2015/06/13.

55. Bardi G, Parada LA, Bomme L, Pandis N, Willen R, Johansson B, et al. Cytogenetic comparisons of synchronous carcinomas and polyps in patients with colorectal cancer. *British journal of cancer*. 1997;76(6):765-9. Epub 1997/01/01.
56. Curtis LJ, Georgiades IB, White S, Bird CC, Harrison DJ, Wyllie AH. Specific patterns of chromosomal abnormalities are associated with RER status in sporadic colorectal cancer. *The Journal of pathology*. 2000;192(4):440-5. Epub 2000/12/13.
57. Leslie A, Pratt NR, Gillespie K, Sales M, Kernohan NM, Smith G, et al. Mutations of APC, K-ras, and p53 are associated with specific chromosomal aberrations in colorectal adenocarcinomas. *Cancer research*. 2003;63(15):4656-61. Epub 2003/08/09.
58. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature cell biology*. 2001;3(4):433-8. Epub 2001/04/03.
59. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997;386(6627):761, 3. Epub 1997/04/24.
60. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 19):3327-35. Epub 2007/09/21.
61. Kroboth K, Newton IP, Kita K, Dikovskaya D, Zumbunn J, Waterman-Storer CM, et al. Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(3):910-8. Epub 2006/12/29.
62. Kita K, Wittmann T, Nathke IS, Waterman-Storer CM. Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1. *Molecular biology of the cell*. 2006;17(5):2331-45. Epub 2006/03/10.
63. Sotillo R, Hernando E, Diaz-Rodriguez E, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Lowe SW, et al. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer cell*. 2007;11(1):9-23. Epub 2006/12/27.
64. Weaver BA, Silk AD, Montagna C, Verdier-Pinard P, Cleveland DW. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer cell*. 2007;11(1):25-36. Epub 2006/12/27.
65. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843-50. Epub 2005/04/15.
66. Hadjihannas MV, Bruckner M, Jerchow B, Birchmeier W, Dietmaier W, Behrens J. Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(28):10747-52. Epub 2006/07/04.
67. Dikovskaya D, Schiffmann D, Newton IP, Oakley A, Kroboth K, Sansom O, et al. Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *The Journal of cell biology*. 2007;176(2):183-95. Epub 2007/01/18.
68. Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annual review of cell and developmental biology*. 2011;27:585-610. Epub 2011/08/02.
69. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10. Epub 2000/12/01.
70. Michalovitz D, Halevy O, Oren M. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell*. 1990;62(4):671-80. Epub 1990/08/24.
71. Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW, et al. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(16):6166-70. Epub 1990/08/01.

72. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*. 1990;249(4971):912-5. Epub 1990/08/24.
73. Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, et al. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Molecular and cellular biology*. 1990;10(11):5772-81. Epub 1990/11/01.
74. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 1991;352(6333):345-7. Epub 1991/07/25.
75. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(10):4495-9. Epub 1992/05/15.
76. Wang Y, Blandino G, Oren M, Givol D. Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene*. 1998;17(15):1923-30. Epub 1998/10/27.
77. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88(5):593-602. Epub 1997/03/07.
78. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007;445(7128):661-5. Epub 2007/01/26.
79. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *The British journal of surgery*. 2002;89(7):845-60. Epub 2002/06/26.
80. Iacopetta B, Russo A, Bazan V, Dardanoni G, Gebbia N, Soussi T, et al. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2006;17(5):842-7. Epub 2006/03/10.
81. Lima JM, Serafim PV, Silva ID, Forones NM. [Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer]. *Arquivos de gastroenterologia*. 2006;43(1):8-13. Epub 2006/05/16. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (codon 72) em cancer colorretal.
82. Mammano E, Belluco C, Bonafe M, Olivieri F, Mugianesi E, Barbi C, et al. Association of p53 polymorphisms and colorectal cancer: modulation of risk and progression. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2009;35(4):415-9. Epub 2008/05/13.
83. Campomenosi P, Assereto P, Bogliolo M, Fronza G, Abbondandolo A, Capasso A, et al. p53 mutations and DNA ploidy in colorectal adenocarcinomas. *Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology*. 1998;17(1):1-12. Epub 1998/11/10.
84. Blount PL, Galipeau PC, Sanchez CA, Neshat K, Levine DS, Yin J, et al. 17p allelic losses in diploid cells of patients with Barrett's esophagus who develop aneuploidy. *Cancer research*. 1994;54(9):2292-5. Epub 1994/05/01.
85. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D805-11. Epub 2014/10/31.
86. Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, Hanlon Newell AE, Lenzi ML, Olson SB, et al. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature*. 2010;467(7316):707-10. Epub 2010/09/24.
87. Kingsbury MA, Yung YC, Peterson SE, Westra JW, Chun J. Aneuploidy in the normal and diseased brain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63(22):2626-41. Epub 2006/09/05.

88. Maringe C, Walters S, Rachet B, Butler J, Fields T, Finan P, et al. Stage at diagnosis and colorectal cancer survival in six high-income countries: a population-based study of patients diagnosed during 2000-2007. *Acta Oncol.* 2013;52(5):919-32. Epub 2013/04/16.
89. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England journal of medicine.* 2004;350(23):2343-51. Epub 2004/06/04.
90. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000;355(9209):1041-7. Epub 2000/04/01.
91. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004;22(1):23-30. Epub 2003/12/11.
92. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2009;27(5):663-71. Epub 2008/12/31.
93. Strickler JH, McCall S, Nixon AB, Brady JC, Pang H, Rushing C, et al. Phase I study of dasatinib in combination with capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab followed by an expanded cohort in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Investigational new drugs.* 2014;32(2):330-9. Epub 2013/11/01.
94. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(12):2013-9. Epub 2008/04/19.
95. Wanebo HJ, Berz D. The neoadjuvant therapy of colorectal hepatic metastases and the role of biologic sensitizing and resistance factors. *Journal of surgical oncology.* 2010;102(8):891-7. Epub 2010/12/18.
96. Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nature reviews Cancer.* 2007;7(2):107-17. Epub 2007/01/26.
97. Radulescu S, Ridgway RA, Appleton P, Kroboth K, Patel S, Woodgett J, et al. Defining the role of APC in the mitotic spindle checkpoint in vivo: APC-deficient cells are resistant to Taxol. *Oncogene.* 2010;29(49):6418-27. Epub 2010/08/24.
98. Elliott PJ, Ross JS. The proteasome: a new target for novel drug therapies. *American journal of clinical pathology.* 2001;116(5):637-46. Epub 2001/11/17.
99. Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center.* 2003;10(5):361-9. Epub 2003/10/29.
100. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2001;69(3):89-95. Epub 2001/03/10.
101. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nature reviews Cancer.* 2004;4(3):177-83. Epub 2004/03/03.
102. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2006;24(33):5313-27. Epub 2006/10/25.
103. Macdonald JS. Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. *Seminars in oncology.* 1999;26(5):556-60. Epub 1999/10/21.

104. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003;39(6):718-27. Epub 2003/03/26.
105. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *The New England journal of medicine*. 2001;344(16):1196-206. Epub 2001/04/20.
106. Babel I, Barderas R, Diaz-Uriarte R, Martinez-Torrecuadrada JL, Sanchez-Carbayo M, Casal JI. Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2009;8(10):2382-95. Epub 2009/07/30.
107. Villar-Vazquez R, Padilla G, Fernandez-Acenero MJ, Suarez A, Fuente E, Pastor C, et al. Development of a novel multiplex beads-based assay for autoantibody detection for colorectal cancer diagnosis. *Proteomics*. 2016;16(8):1280-90. Epub 2016/02/27.
108. Adam JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2003;99(1):113-32. Epub 2003/06/14.
109. Ersvaer E, Zhang JY, McCormack E, Olsnes A, Anensen N, Tan EM, et al. Cyclin B1 is commonly expressed in the cytoplasm of primary human acute myelogenous leukemia cells and serves as a leukemia-associated antigen associated with autoantibody response in a subset of patients. *European journal of haematology*. 2007;79(3):210-25. Epub 2007/07/28.
110. Suzuki H, Graziano DF, McKolanis J, Finn OJ. T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(4):1521-6. Epub 2005/03/05.
111. Babel I, Barderas R, Diaz-Uriarte R, Moreno V, Suarez A, Fernandez-Acenero MJ, et al. Identification of MST1/STK4 and SULF1 proteins as autoantibody targets for the diagnosis of colorectal cancer by using phage microarrays. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10(3):M110 001784. Epub 2011/01/14.
112. Pelaez-Garcia A, Barderas R, Torres S, Hernandez-Varas P, Teixido J, Bonilla F, et al. FGFR4 role in epithelial-mesenchymal transition and its therapeutic value in colorectal cancer. *PLoS one*. 2013;8(5):e63695. Epub 2013/05/23.
113. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. Epub 2015/01/24.
114. Volmer MW, Stuhler K, Zapatka M, Schoneck A, Klein-Scory S, Schmiegel W, et al. Differential proteome analysis of conditioned media to detect Smad4 regulated secreted biomarkers in colon cancer. *Proteomics*. 2005;5(10):2587-601. Epub 2005/05/25.
115. Grimm D, Bauer J, Pietsch J, Infanger M, Eucker J, Eilles C, et al. Diagnostic and therapeutic use of membrane proteins in cancer cells. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(2):176-90. Epub 2010/11/30.
116. Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, Chang R, Reddy R, Sato N, et al. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2006;5(1):157-71. Epub 2005/10/11.
117. Weng LP, Wu CC, Hsu BL, Chi LM, Liang Y, Tseng CP, et al. Secretome-based identification of Mac-2 binding protein as a potential oral cancer marker involved in cell growth and motility. *Journal of proteome research*. 2008;7(9):3765-75. Epub 2008/07/24.
118. Lou X, Xiao T, Zhao K, Wang H, Zheng H, Lin D, et al. Cathepsin D is secreted from M-BE cells: its potential role as a biomarker of lung cancer. *Journal of proteome research*. 2007;6(3):1083-92. Epub 2007/02/08.
119. de Wit M, Kant H, Piersma SR, Pham TV, Mongera S, van Berkel MP, et al. Colorectal cancer candidate biomarkers identified by tissue secretome proteome profiling. *Journal of proteomics*. 2014;99:26-39. Epub 2014/01/15.

120. Albrethsen J, Knol JC, Piersma SR, Pham TV, de Wit M, Mongera S, et al. Subnuclear proteomics in colorectal cancer: identification of proteins enriched in the nuclear matrix fraction and regulation in adenoma to carcinoma progression. *Molecular & cellular proteomics* : MCP. 2010;9(5):988-1005. Epub 2010/01/22.
121. Barderas R, Mendes M, Torres S, Bartolome RA, Lopez-Lucendo M, Villar-Vazquez R, et al. In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion. *Molecular & cellular proteomics* : MCP. 2013;12(6):1602-20. Epub 2013/02/28.
122. Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome research*. 1996;6(7):639-45. Epub 1996/07/01.
123. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001;412(6849):822-6. Epub 2001/08/24.
124. Gorges TM, Stein A, Quidde J, Hauch S, Rock K, Riethdorf S, et al. Improved Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer by the Combination of the CellSearch(R) System and the AdnaTest(R). *PloS one*. 2016;11(5):e0155126. Epub 2016/05/18.
125. Sadanandam A, Wang X, de Sousa EMF, Gray JW, Vermeulen L, Hanahan D, et al. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: interrelationships and clinical implications. *Cell Cycle*. 2014;13(3):353-7. Epub 2014/01/11.
126. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nature medicine*. 2013;19(5):619-25. Epub 2013/04/16.
127. Thykjaer T, Workman C, Kruhoffer M, Demtroder K, Wolf H, Andersen LD, et al. Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. *Cancer research*. 2001;61(6):2492-9. Epub 2001/04/06.
128. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature genetics*. 1996;14(4):457-60. Epub 1996/12/01.
129. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74. Epub 2001/09/13.
130. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6. Epub 2002/02/02.
131. Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*. 2005;1(5):252-62. Epub 2006/01/13.
132. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics* : MCP. 2002;1(5):376-86. Epub 2002/07/16.
133. Ong SE, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods Mol Biol*. 2007;359:37-52. Epub 2007/05/09.
134. Dayon L, Hainard A, Licker V, Turck N, Kuhn K, Hochstrasser DF, et al. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Analytical chemistry*. 2008;80(8):2921-31. Epub 2008/03/04.
135. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics* : MCP. 2004;3(12):1154-69. Epub 2004/09/24.
136. Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:840518. Epub 2009/11/17.

137. de la Cuesta F, Barderas MG, Calvo E, Zubiri I, Maroto AS, Darde VM, et al. Secretome analysis of atherosclerotic and non-atherosclerotic arteries reveals dynamic extracellular remodeling during pathogenesis. *Journal of proteomics*. 2012;75(10):2960-71. Epub 2011/12/27.
138. Chelius D, Bondarenko PV. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of proteome research*. 2002;1(4):317-23. Epub 2003/03/21.
139. Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical chemistry*. 2004;76(14):4193-201. Epub 2004/07/16.
140. Gingras AC, Gstaiger M, Raught B, Aebersold R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(8):645-54. Epub 2007/06/28.
141. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 2012;196(6):801-10. Epub 2012/03/14.
142. Lambert JP, Tucholska M, Go C, Knight JD, Gingras AC. Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes. *Journal of proteomics*. 2014. Epub 2014/10/05.
143. Kim SA, Lee Y, Jung DE, Park KH, Park JY, Gang J, et al. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF), a novel up-regulated secretory protein in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer science*. 2009;100(5):828-36. Epub 2009/03/24.
144. Park HD, Lee Y, Oh YK, Jung JG, Park YW, Myung K, et al. Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor promotes metastasis by regulating TLR/CXCR4 activation. *Oncogene*. 2011;30(2):201-11. Epub 2010/08/31.
145. Kanagawa M, Satoh T, Ikeda A, Nakano Y, Yagi H, Kato K, et al. Crystal structures of human secretory proteins ZG16p and ZG16b reveal a Jacalin-related beta-prism fold. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(1):201-5. Epub 2010/11/30.
146. Kim SK, Song SY, Kim S, Cho NH, Yim GW, Kim SW, et al. Association of pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor expression in ovarian mucinous adenocarcinoma with poor prognosis. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(8):5103-10. Epub 2014/09/10.
147. Choi CH, Chung JY, Park HS, Jun M, Lee YY, Kim BG, et al. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor expression is associated with disease-specific survival in cervical cancer patients. *Human pathology*. 2015;46(6):884-93. Epub 2015/04/15.
148. Kim SJ, Lee Y, Kim NY, Hwang Y, Hwang B, Min JK, et al. Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor, a novel endothelial activator, promotes angiogenesis and vascular permeability. *Oncogene*. 2013;32(31):3638-47. Epub 2012/08/22.
149. Kim SJ, Chang S, Lee Y, Kim NY, Hwang Y, Min HJ, et al. A PAUF-neutralizing antibody targets both carcinoma and endothelial cells to impede pancreatic tumor progression and metastasis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;454(1):144-50. Epub 2014/12/03.
150. Lee Y, Kim SJ, Park HD, Park EH, Huang SM, Jeon SB, et al. PAUF functions in the metastasis of human pancreatic cancer cells and upregulates CXCR4 expression. *Oncogene*. 2010;29(1):56-67. Epub 2009/09/29.
151. Lee YS, Kim SJ, Min HJ, Jo JY, Park EH, Koh SS. PAUF promotes adhesiveness of pancreatic cancer cells by modulating focal adhesion kinase. *Experimental & molecular medicine*. 2011;43(5):291-7. Epub 2011/04/06.
152. Kang TH, Kim YS, Kim S, Yang B, Lee JJ, Lee HJ, et al. Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor serves as adjuvant by activating dendritic cells through stimulation of TLR4. *Oncotarget*. 2015;6(29):27751-62. Epub 2015/09/05.

153. Cho IR, Koh SS, Min HJ, Kim SJ, Lee Y, Park EH, et al. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) enhances the expression of beta-catenin, leading to a rapid proliferation of pancreatic cells. *Experimental & molecular medicine*. 2011;43(2):82-90. Epub 2011/01/05.
154. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Postgraduate medical journal*. 2008;84(995):478-97. Epub 2008/10/23.
155. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annual review of pathology*. 2008;3:157-88. Epub 2007/11/28.
156. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer metastasis reviews*. 2003;22(4):395-403. Epub 2003/07/30.
157. Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB life*. 2005;57(4-5):283-95. Epub 2005/07/23.
158. Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26(3-4):453-67. Epub 2007/09/11.
159. Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, et al. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer research*. 2002;62(4):1093-102. Epub 2002/02/28.
160. Nishihira J, Ishibashi T, Fukushima T, Sun B, Sato Y, Todo S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;995:171-82. Epub 2003/06/20.
161. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(4):660-72. Epub 2003/02/11.
162. Xiao Q, Ge G. Lysyl oxidase, extracellular matrix remodeling and cancer metastasis. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2012;5(3):261-73. Epub 2012/04/25.
163. Barker HE, Cox TR, Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(8):540-52. Epub 2012/07/20.
164. Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer research*. 2006;66(21):10238-41. Epub 2006/11/03.
165. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 2006;440(7088):1222-6. Epub 2006/04/28.
166. Cox TR, Rumney RM, Schoof EM, Perryman L, Hoyer AM, Agrawal A, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*. 2015;522(7554):106-10. Epub 2015/05/29.
167. Palamakumbura AH, Jeay S, Guo Y, Pischon N, Sommer P, Sonenshein GE, et al. The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(39):40593-600. Epub 2004/07/28.
168. Sung FL, Cui Y, Hui EP, Li L, Loh TK, Tao Q, et al. Silencing of hypoxia-inducible tumor suppressor lysyl oxidase gene by promoter methylation activates carbonic anhydrase IX in nasopharyngeal carcinoma. *American journal of cancer research*. 2014;4(6):789-800. Epub 2014/12/19.
169. Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;101(6):1338-54. Epub 2007/05/02.
170. Wu G, Guo Z, Chang X, Kim MS, Nagpal JK, Liu J, et al. LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. *Cancer research*. 2007;67(9):4123-9. Epub 2007/04/26.
171. Lee GH, Kim DS, Chung MJ, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Lysyl oxidase-like-1 enhances lung metastasis when lactate accumulation and monocarboxylate transporter expression are involved. *Oncology letters*. 2011;2(5):831-8. Epub 2012/08/07.

172. Morikawa K, Walker SM, Jessup JM, Fidler IJ. In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer research*. 1988;48(7):1943-8. Epub 1988/04/01.
173. Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capella G, Egozcue J, et al. Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;110(6):869-74. Epub 2004/06/02.
174. Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM, Fidler IJ. Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer research*. 1988;48(23):6863-71. Epub 1988/12/01.
175. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer research*. 1976;36(12):4562-9. Epub 1976/12/11.
176. Fogh J. Human tumor lines for cancer research. *Cancer investigation*. 1986;4(2):157-84. Epub 1986/01/01.
177. Quinn LA, Moore GE, Morgan RT, Woods LK. Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer research*. 1979;39(12):4914-24. Epub 1979/12/01.
178. Brattain MG, Brattain DE, Fine WD, Khaled FM, Marks ME, Kimball PM, et al. Initiation and characterization of cultures of human colonic carcinoma with different biological characteristics utilizing feeder layers of confluent fibroblasts. *Oncodevelopmental biology and medicine : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 1981;2(5):355-66. Epub 1981/01/01.
179. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer research*. 1981;41(5):1751-6. Epub 1981/05/01.
180. Eshleman JR, Lang EZ, Bowerfind GK, Parsons R, Vogelstein B, Willson JK, et al. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*. 1995;10(1):33-7. Epub 1995/01/05.
181. Brattain MG, Levine AE, Chakrabarty S, Yeoman LC, Willson JK, Long B. Heterogeneity of human colon carcinoma. *Cancer metastasis reviews*. 1984;3(3):177-91. Epub 1984/01/01.
182. Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual review of biochemistry*. 1989;58:913-49. Epub 1989/01/01.
183. Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of molecular biology*. 1992;226(3):735-45. Epub 1992/08/05.
184. Kall L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nature methods*. 2007;4(11):923-5. Epub 2007/10/24.
185. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D561-8. Epub 2010/11/04.
186. Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2010;2010:baq020. Epub 2010/08/07.
187. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 2004;6(1):1-6. Epub 2004/04/08.
188. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, et al. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*. 2007;9(2):166-80. Epub 2007/03/16.

189. Cornish TC, Chakravarti A, Kapoor A, Halushka MK. HPASubC: A suite of tools for user subclassification of human protein atlas tissue images. *Journal of pathology informatics*. 2015;6:36. Epub 2015/07/15.
190. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*. 2013;6(269):pl1. Epub 2013/04/04.
191. Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, Gangoda L, Quek CY, Williamson NA, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics*. 2015;15(15):2597-601. Epub 2015/04/30.
192. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*. 2011;8(10):785-6. Epub 2011/10/01.
193. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2004;17(4):349-56. Epub 2004/04/30.
194. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS biology*. 2012;10(12):e1001450. Epub 2012/12/29.
195. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC bioinformatics*. 2009;10:202. Epub 2009/07/01.
196. Dinse GE, Lagakos SW. Nonparametric estimation of lifetime and disease onset distributions from incomplete observations. *Biometrics*. 1982;38(4):921-32. Epub 1982/12/01.
197. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2003;5(2):73-81. Epub 2003/04/23.
198. Pham TV, Piersma SR, Warmoes M, Jimenez CR. On the beta-binomial model for analysis of spectral count data in label-free tandem mass spectrometry-based proteomics. *Bioinformatics*. 2010;26(3):363-9. Epub 2009/12/17.
199. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*. 2017;45(D1):D158-D69. Epub 2016/12/03.
200. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. 1998;6:175-82. Epub 1998/10/23.
201. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*. 2001;305(3):567-80. Epub 2001/01/12.
202. Bagos PG, Liakopoulos TD, Spyropoulos IC, Hamodrakas SJ. PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins. *Nucleic acids research*. 2004;32(Web Server issue):W400-4. Epub 2004/06/25.
203. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology*. 2000;37(2):239-53. Epub 2000/08/10.
204. Andersen CL, Schepeler T, Thorsen K, Birkenkamp-Demtroder K, Mansilla F, Aaltonen LA, et al. Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2007;6(6):1039-48. Epub 2007/02/27.
205. Samowitz WS, Wolff RK, Ma KN, Andersen K, Caan B, Slattery ML. Polymorphisms in insulin-related genes predispose to specific KRAS2 and TP53 mutations in colon cancer. *Mutation research*. 2006;595(1-2):117-24. Epub 2006/02/02.
206. Keku TO, Vidal A, Oliver S, Hoyo C, Hall IJ, Omofoye O, et al. Genetic variants in IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, and adiponectin genes and colon cancer risk in African Americans and Whites. *Cancer causes & control : CCC*. 2012;23(7):1127-38. Epub 2012/05/09.

207. Bertuzzi M, Marelli C, Bagnati R, Colombi A, Fanelli R, Saieva C, et al. Plasma clusterin as a candidate pre-diagnosis marker of colorectal cancer risk in the Florence cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition: a pilot study. *BMC cancer*. 2015;15:56. Epub 2015/04/18.
208. Rodriguez-Pineiro AM, Garcia-Lorenzo A, Blanco-Prieto S, Alvarez-Chaver P, Rodriguez-Berrocal FJ, Cadena MP, et al. Secreted clusterin in colon tumor cell models and its potential as diagnostic marker for colorectal cancer. *Cancer investigation*. 2012;30(1):72-8. Epub 2012/01/13.
209. Pucci S, Bonanno E, Sesti F, Mazzarelli P, Mauriello A, Ricci F, et al. Clusterin in stool: a new biomarker for colon cancer screening? *The American journal of gastroenterology*. 2009;104(11):2807-15. Epub 2009/07/23.
210. Kevans D, Foley J, Tenniswood M, Sheahan K, Hyland J, O'Donoghue D, et al. High clusterin expression correlates with a poor outcome in stage II colorectal cancers. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(2):393-9. Epub 2009/01/22.
211. Lin Q, Lim HS, Lin HL, Tan HT, Lim TK, Cheong WK, et al. Analysis of colorectal cancer glyco-secretome identifies laminin beta-1 (LAMB1) as a potential serological biomarker for colorectal cancer. *Proteomics*. 2015;15(22):3905-20. Epub 2015/09/12.
212. Delektorskaya VV, Golovkov DA, Kushlinskii NE. Clinical significance of levels of molecular biological markers in zones of invasive front-line of colorectal cancer. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2008;146(5):616-9. Epub 2009/06/16.
213. Cacev T, Loncar B, Seiwerth S, Spaventi S, Kapitanovic S. Vascular endothelial growth factor polymorphisms -1154 G/A and -460 C/T are not associated with VEGF mRNA expression and susceptibility to sporadic colon cancer. *DNA and cell biology*. 2008;27(10):569-74. Epub 2008/07/11.
214. Bae SJ, Kim JW, Kang H, Hwang SG, Oh D, Kim NK. Gender-specific association between polymorphism of vascular endothelial growth factor (VEGF 936 C>T) gene and colon cancer in Korea. *Anticancer research*. 2008;28(2B):1271-6. Epub 2008/05/29.
215. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*. 2012;2(5):401-4. Epub 2012/05/17.
216. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research*. 1988;48(3):589-601. Epub 1988/02/01.
217. Grever MR, Schepartz SA, Chabner BA. The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Seminars in oncology*. 1992;19(6):622-38. Epub 1992/12/01.
218. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7. Epub 2012/07/20.
219. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature biotechnology*. 2010;28(12):1248-50. Epub 2010/12/09.
220. Kaiser S, Park YK, Franklin JL, Halberg RB, Yu M, Jessen WJ, et al. Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome biology*. 2007;8(7):R131. Epub 2007/07/07.
221. Skrzypczak M, Goryca K, Rubel T, Paziewska A, Mikula M, Jarosz D, et al. Modeling oncogenic signaling in colon tumors by multidirectional analyses of microarray data directed for maximization of analytical reliability. *PloS one*. 2010;5(10). Epub 2010/10/20.
222. Iturbide A, Garcia de Herreros A, Peiro S. A new role for LOX and LOXL2 proteins in transcription regulation. *The FEBS journal*. 2015;282(9):1768-73. Epub 2014/08/12.

223. Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens AL, Lambert JP, St-Denis NA, Li T, et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nature methods*. 2013;10(8):730-6. Epub 2013/08/08.
224. Edens LJ, White KH, Jevtic P, Li X, Levy DL. Nuclear size regulation: from single cells to development and disease. *Trends in cell biology*. 2013;23(4):151-9. Epub 2013/01/02.
225. Aumais JP, Williams SN, Luo W, Nishino M, Caldwell KA, Caldwell GA, et al. Role for NudC, a dynein-associated nuclear movement protein, in mitosis and cytokinesis. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 10):1991-2003. Epub 2003/04/08.
226. Nathke I. APC at a glance. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 21):4873-5. Epub 2004/10/01.
227. Nathke I. Cytoskeleton out of the cupboard: colon cancer and cytoskeletal changes induced by loss of APC. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(12):967-74. Epub 2006/11/10.
228. Ilyas M, Tomlinson IP. Genetic pathways in colorectal cancer. *Histopathology*. 1996;28(5):389-99. Epub 1996/05/01.
229. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2002;38(7):867-71. Epub 2002/04/30.
230. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*. 2005;54(9):1283-6. Epub 2005/04/22.
231. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(10):749-58. Epub 2009/09/25.
232. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2:e71. Epub 2013/09/18.
233. Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, Fujiwara T, Liu W, Bucana CD, et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer research*. 1998;58(11):2288-92. Epub 1998/06/11.
234. Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(26):17751-7. Epub 2006/06/27.
235. Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(19):10330-4. Epub 1997/09/18.
236. Groden J, Joslyn G, Samowitz W, Jones D, Bhattacharyya N, Spirio L, et al. Response of colon cancer cell lines to the introduction of APC, a colon-specific tumor suppressor gene. *Cancer research*. 1995;55(7):1531-9. Epub 1995/04/01.
237. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004;23(16):2825-37. Epub 2004/04/13.
238. Williams BC, Goldberg ML. Determinants of Drosophila zw10 protein localization and function. *Journal of cell science*. 1994;107 ( Pt 4):785-98. Epub 1994/04/01.
239. Saffery R, Irvine DV, Griffiths B, Kalitsis P, Wordeman L, Choo KH. Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins. *Human molecular genetics*. 2000;9(2):175-85. Epub 1999/12/23.
240. Hirose H, Arasaki K, Dohmae N, Takio K, Hatsuzawa K, Nagahama M, et al. Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *The EMBO journal*. 2004;23(6):1267-78. Epub 2004/03/19.
241. Chan GK, Jablonski SA, Starr DA, Goldberg ML, Yen TJ. Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nature cell biology*. 2000;2(12):944-7. Epub 2001/01/09.

242. Williams BC, Karr TL, Montgomery JM, Goldberg ML. The *Drosophila* l(1)zw10 gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset. *The Journal of cell biology*. 1992;118(4):759-73. Epub 1992/08/01.
243. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science signaling*. 2014;7(344):re8. Epub 2014/09/25.
244. Chen D, Shah A, Nguyen H, Loo D, Inder KL, Hill MM. Online quantitative proteomics p-value calculator for permutation-based statistical testing of peptide ratios. *Journal of proteome research*. 2014;13(9):4184-91. Epub 2014/07/25.
245. Kimura M, Kotani S, Hattori T, Sumi N, Yoshioka T, Todokoro K, et al. Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(21):13766-71. Epub 1997/05/23.
246. Katayama H, Sasai K, Kloc M, Brinkley BR, Sen S. Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells. *Cell Cycle*. 2008;7(17):2691-704. Epub 2008/09/09.
247. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2013*. CA: a cancer journal for clinicians. 2013;63(1):11-30. Epub 2013/01/22.
248. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer metastasis reviews*. 1989;8(2):98-101. Epub 1989/08/01.
249. Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 2009;459(7249):1005-9. Epub 2009/05/08.
250. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer cell*. 2003;3(6):537-49. Epub 2003/07/05.
251. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436(7050):518-24. Epub 2005/07/29.
252. Welch DR. Microarrays bring new insights into understanding of breast cancer metastasis to bone. *Breast cancer research : BCR*. 2004;6(2):61-4. Epub 2004/02/26.
253. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578):329-35. Epub 2015/11/03.
254. Okamoto K, Ishiguro T, Midorikawa Y, Ohata H, Izumiya M, Tsuchiya N, et al. miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. *The EMBO journal*. 2012;31(7):1752-63. Epub 2012/03/01.
255. Banerjee D, Gorlick R, Liefshitz A, Danenberg K, Danenberg PC, Danenberg PV, et al. Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase. *Cancer research*. 2000;60(9):2365-7. Epub 2000/05/16.
256. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *Journal of gastroenterology*. 2006;41(3):185-92. Epub 2006/05/16.
257. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(6):1353-63. Epub 2013/11/10.
258. Ackerman D, Simon MC. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends in cell biology*. 2014;24(8):472-8. Epub 2014/07/06.
259. Cruz PM, Mo H, McConathy WJ, Sabnis N, Lacko AG. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Frontiers in pharmacology*. 2013;4:119. Epub 2013/10/05.
260. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(9):540-55. Epub 2015/08/21.

261. Yue S, Li J, Lee SY, Lee HJ, Shao T, Song B, et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell metabolism*. 2014;19(3):393-406. Epub 2014/03/13.
262. Bozza PT, Viola JP. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2010;82(4-6):243-50. Epub 2010/03/09.
263. de Gonzalo-Calvo D, Lopez-Vilaro L, Nasarre L, Perez-Olabarria M, Vazquez T, Escuin D, et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC cancer*. 2015;15:460. Epub 2015/06/10.
264. Abramczyk H, Surmacki J, Kopec M, Olejnik AK, Lubecka-Pietruszewska K, Fabianowska-Majewska K. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *The Analyst*. 2015;140(7):2224-35. Epub 2015/03/03.
265. Pan PW, Zhang Q, Hou J, Liu Z, Bai F, Cao MR, et al. Cell surface glycoprotein profiling of cancer cells based on bioorthogonal chemistry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(6):1661-70. Epub 2012/04/25.
266. Nazmeen A, Maiti S, Mandal K, Roy SK, Ghosh TK, Sinha NK. Better predictive value of Cancer Antigen125 (CA125) as biomarker in ovary and breast tumors and its correlation with the histopathological type/grade of the disease. *Med Chem*. 2017. Epub 2017/04/26.
267. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 2010;327(5961):46-50. Epub 2010/01/02.
268. Hill MM, Feng J, Hemmings BA. Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Current biology : CB*. 2002;12(14):1251-5. Epub 2002/08/15.
269. Adam RM, Mukhopadhyay NK, Kim J, Di Vizio D, Cinar B, Boucher K, et al. Cholesterol sensitivity of endogenous and myristoylated Akt. *Cancer research*. 2007;67(13):6238-46. Epub 2007/07/10.
270. Wang R, Bi J, Ampah KK, Zhang C, Li Z, Jiao Y, et al. Lipid raft regulates the initial spreading of melanoma A375 cells by modulating beta1 integrin clustering. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(8):1679-89. Epub 2013/05/15.
271. Jeon JH, Kim SK, Kim HJ, Chang J, Ahn CM, Chang YS. Lipid raft modulation inhibits NSCLC cell migration through delocalization of the focal adhesion complex. *Lung Cancer*. 2010;69(2):165-71. Epub 2009/12/01.
272. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(3):181-93. Epub 2010/02/20.
273. Xiang X, Poliakov A, Liu C, Liu Y, Deng ZB, Wang J, et al. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;124(11):2621-33. Epub 2009/02/25.
274. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*. 2007;67(9):4507-13. Epub 2007/05/08.
275. Chen JY, Li CF, Kuo CC, Tsai KK, Hou MF, Hung WC. Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression. *Breast cancer research : BCR*. 2014;16(4):410. Epub 2014/07/26.
276. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine*. 2011;17(11):1498-503. Epub 2011/11/01.
277. Gazi E, Gardner P, Lockyer NP, Hart CA, Brown MD, Clarke NW. Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *Journal of lipid research*. 2007;48(8):1846-56. Epub 2007/05/15.

278. Qu LP, Zhong YM, Zheng Z, Zhao RX. CDH17 is a downstream effector of HOXA13 in modulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017;21(6):1234-41. Epub 2017/04/08.
279. Liu LX, Lee NP, Chan VW, Xue W, Zender L, Zhang C, et al. Targeting cadherin-17 inactivates Wnt signaling and inhibits tumor growth in liver carcinoma. *Hepatology*. 2009;50(5):1453-63. Epub 2009/08/14.
280. Hautala T, Byers MG, Eddy RL, Shows TB, Kivirikko KI, Myllyla R. Cloning of human lysyl hydroxylase: complete cDNA-derived amino acid sequence and assignment of the gene (PLOD) to chromosome 1p36.3---p36.2. *Genomics*. 1992;13(1):62-9. Epub 1992/05/01.
281. Giunta C, Randolph A, Steinmann B. Mutation analysis of the PLOD1 gene: an efficient multistep approach to the molecular diagnosis of the kyphoscoliotic type of Ehlers-Danlos syndrome (EDS VIA). *Molecular genetics and metabolism*. 2005;86(1-2):269-76. Epub 2005/06/28.
282. Pyle-Chenault RA, Stolk JA, Molesh DA, Boyle-Harlan D, McNeill PD, Repasky EA, et al. VSGP/F-spondin: a new ovarian cancer marker. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2005;26(5):245-57. Epub 2005/08/17.
283. Lee BL, Kim WH, Jung J, Cho SJ, Park JW, Kim J, et al. A hypoxia-independent up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 by AKT contributes to angiogenesis in human gastric cancer. *Carcinogenesis*. 2008;29(1):44-51. Epub 2007/11/07.
284. Zheng P, Wang Q, Teng J, Chen J. Calumenin and fibulin-1 on tumor metastasis: Implications for pharmacology. *Pharmacological research*. 2015;99:11-5. Epub 2015/05/16.
285. Nagano K, Imai S, Zhao X, Yamashita T, Yoshioka Y, Abe Y, et al. Identification and evaluation of metastasis-related proteins, oxysterol binding protein-like 5 and calumenin, in lung tumors. *International journal of oncology*. 2015;47(1):195-203. Epub 2015/05/13.
286. Peters HL, Tuli A, Wang X, Liu C, Pan Z, Ouellette MM, et al. Relevance of amyloid precursor-like protein 2 C-terminal fragments in pancreatic cancer cells. *International journal of oncology*. 2012;41(4):1464-74. Epub 2012/07/17.
287. Pandey P, Rachagani S, Das S, Seshacharyulu P, Sheinin Y, Naslavsky N, et al. Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) affects the actin cytoskeleton and increases pancreatic cancer growth and metastasis. *Oncotarget*. 2015;6(4):2064-75. Epub 2015/01/13.
288. Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, et al. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer research*. 2007;67(16):7703-12. Epub 2007/08/19.
289. Mancuso P, Calleri A, Gregato G, Labanca V, Quarna J, Antoniotti P, et al. A subpopulation of circulating endothelial cells express CD109 and is enriched in the blood of cancer patients. *PloS one*. 2014;9(12):e114713. Epub 2014/12/17.
290. Emori M, Tsukahara T, Murase M, Kano M, Murata K, Takahashi A, et al. High expression of CD109 antigen regulates the phenotype of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in the novel epithelioid sarcoma cell line ESX and is related to poor prognosis of soft tissue sarcoma. *PloS one*. 2013;8(12):e84187. Epub 2014/01/01.
291. Hagiwara S, Murakumo Y, Sato T, Shigetomi T, Mitsudo K, Tohnai I, et al. Up-regulation of CD109 expression is associated with carcinogenesis of the squamous epithelium of the oral cavity. *Cancer science*. 2008;99(10):1916-23. Epub 2008/11/20.
292. McGilvray RW, Eagle RA, Rolland P, Jafferji I, Trowsdale J, Durrant LG. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(6):1412-20. Epub 2010/01/08.
293. Chang YT, Wu CC, Shyr YM, Chen TC, Hwang TL, Yeh TS, et al. Secretome-based identification of ULBP2 as a novel serum marker for pancreatic cancer detection. *PloS one*. 2011;6(5):e20029. Epub 2011/06/01.

294. Paschen A, Sucker A, Hill B, Moll I, Zapatka M, Nguyen XD, et al. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(16):5208-15. Epub 2009/08/13.
295. Kutomi G, Tamura Y, Tanaka T, Kajiwara T, Kukita K, Ohmura T, et al. Human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-alpha is a novel predictor for poor prognosis of breast cancer. *Cancer science*. 2013;104(8):1091-6. Epub 2013/04/13.
296. Hashimoto M, Ichihara M, Watanabe T, Kawai K, Koshikawa K, Yuasa N, et al. Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene*. 2004;23(20):3716-20. Epub 2004/04/30.
297. Tao J, Li H, Li Q, Yang Y. CD109 is a potential target for triple-negative breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(12):12083-90. Epub 2014/08/26.
298. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006;314(5797):268-74. Epub 2006/09/09.
299. Finnson KW, Tam BY, Liu K, Marcoux A, Lepage P, Roy S, et al. Identification of CD109 as part of the TGF-beta receptor system in human keratinocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(9):1525-7. Epub 2006/06/07.
300. Rehman I, Cross SS, Azzouzi AR, Catto JW, Deloulme JC, Larre S, et al. S100A6 (Calcyclin) is a prostate basal cell marker absent in prostate cancer and its precursors. *British journal of cancer*. 2004;91(4):739-44. Epub 2004/07/29.
301. De Petris L, Orre LM, Kanter L, Pernemalm M, Koyi H, Lewensohn R, et al. Tumor expression of S100A6 correlates with survival of patients with stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009;63(3):410-7. Epub 2008/07/16.
302. Wei BR, Hoover SB, Ross MM, Zhou W, Meani F, Edwards JB, et al. Serum S100A6 concentration predicts peritoneal tumor burden in mice with epithelial ovarian cancer and is associated with advanced stage in patients. *PloS one*. 2009;4(10):e7670. Epub 2009/11/06.
303. Weterman MA, Stoopen GM, van Muijen GN, Kuznicki J, Ruitter DJ, Bloemers HP. Expression of calcyclin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behavior in nude mice. *Cancer research*. 1992;52(5):1291-6. Epub 1992/03/01.
304. Gabius HJ, Bardosi A, Gabius S, Hellmann KP, Karas M, Kratzin H. Identification of a cell cycle-dependent gene product as a sialic acid-binding protein. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;163(1):506-12. Epub 1989/08/30.
305. Yamaguchi F, Umeda Y, Shimamoto S, Tsuchiya M, Tokumitsu H, Tokuda M, et al. S100 proteins modulate protein phosphatase 5 function: a link between CA2+ signal transduction and protein dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(17):13787-98. Epub 2012/03/09.
306. Zhang S, Zhang D, Zhu Y, Guo H, Zhao X, Sun B. Clusterin expression and univariate analysis of overall survival in human breast cancer. *Technology in cancer research & treatment*. 2006;5(6):573-8. Epub 2006/11/24.
307. Flanagan L, Whyte L, Chatterjee N, Tenniswood M. Effects of clusterin over-expression on metastatic progression and therapy in breast cancer. *BMC cancer*. 2010;10:107. Epub 2010/03/24.
308. Rizzi F, Bettuzzi S. Clusterin (CLU) and prostate cancer. *Advances in cancer research*. 2009;105:1-19. Epub 2009/11/03.
309. Rauhala HE, Porkka KP, Saramaki OR, Tammela TL, Visakorpi T. Clusterin is epigenetically regulated in prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(7):1601-9. Epub 2008/07/24.
310. Park DC, Yeo SG, Wilson MR, Yerbury JJ, Kwong J, Welch WR, et al. Clusterin interacts with Paclitaxel and confer Paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Neoplasia*. 2008;10(9):964-72. Epub 2008/08/21.

311. Guo W, Ma X, Xue C, Luo J, Zhu X, Xiang J, et al. Serum clusterin as a tumor marker and prognostic factor for patients with esophageal cancer. *Disease markers*. 2014;2014:168960. Epub 2015/01/13.
312. Mori T, Kariya Y, Komiya E, Higashi S, Miyagi Y, Sekiguchi K, et al. Downregulation of a newly identified laminin, laminin-3B11, in vascular basement membranes of invasive human breast cancers. *Cancer science*. 2011;102(5):1095-100. Epub 2011/02/01.
313. Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, et al. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2008;19(10):1734-41. Epub 2008/06/14.
314. Canzian F, Cox DG, Setiawan VW, Stram DO, Ziegler RG, Dossus L, et al. Comprehensive analysis of common genetic variation in 61 genes related to steroid hormone and insulin-like growth factor-I metabolism and breast cancer risk in the NCI breast and prostate cancer cohort consortium. *Human molecular genetics*. 2010;19(19):3873-84. Epub 2010/07/17.
315. Qiu LX, Yao L, Yuan H, Mao C, Chen B, Zhan P, et al. IGFBP3 A-202C polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 33,557 cases and 45,254 controls. *Breast cancer research and treatment*. 2010;122(3):867-71. Epub 2010/01/20.
316. Terry KL, Tworoger SS, Gates MA, Cramer DW, Hankinson SE. Common genetic variation in IGF1, IGFBP1 and IGFBP3 and ovarian cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009;30(12):2042-6. Epub 2009/10/28.
317. Walker G, MacLeod K, Williams AR, Cameron DA, Smyth JF, Langdon SP. Insulin-like growth factor binding proteins IGFBP3, IGFBP4, and IGFBP5 predict endocrine responsiveness in patients with ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(5):1438-44. Epub 2007/03/03.
318. Massoner P, Colleselli D, Matscheski A, Pircher H, Geley S, Jansen Durr P, et al. Novel mechanism of IGF-binding protein-3 action on prostate cancer cells: inhibition of proliferation, adhesion, and motility. *Endocrine-related cancer*. 2009;16(3):795-808. Epub 2009/06/11.
319. Ingermann AR, Yang YF, Han J, Mikami A, Garza AE, Mohanraj L, et al. Identification of a novel cell death receptor mediating IGFBP-3-induced anti-tumor effects in breast and prostate cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(39):30233-46. Epub 2010/04/01.
320. Wang Q, He Z, Zhang J, Wang Y, Wang T, Tong S, et al. Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. *Cancer detection and prevention*. 2005;29(6):544-51. Epub 2005/11/22.
321. Essegir S, Kennedy A, Seedhar P, Nerurkar A, Poulosom R, Reis-Filho JS, et al. Identification of NTN4, TRA1, and STC2 as prognostic markers in breast cancer in a screen for signal sequence encoding proteins. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(11):3164-73. Epub 2007/06/05.
322. Nomura H, Uzawa K, Yamano Y, Fushimi K, Ishigami T, Kato Y, et al. Network-based analysis of calcium-binding protein genes identifies Grp94 as a target in human oral carcinogenesis. *British journal of cancer*. 2007;97(6):792-801. Epub 2007/08/30.
323. Chen Y, Chen C, Ma C, Sun S, Zhang J, Sun Y. Expression of heat-shock protein gp96 in gallbladder cancer and its prognostic clinical significance. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(2):1946-53. Epub 2015/05/15.
324. Heike M, Frenzel C, Meier D, Galle PR. Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;86(4):489-93. Epub 2000/05/08.
325. Shi CY, Fan Y, Liu B, Lou WH. HIF1 contributes to hypoxia-induced pancreatic cancer cells invasion via promoting QSOX1 expression. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2013;32(3):561-8. Epub 2013/09/07.
326. Das P, Siegers GM, Postovit LM. Illuminating luminal B: QSOX1 as a subtype-specific biomarker. *Breast cancer research : BCR*. 2013;15(3):104. Epub 2013/05/18.

327. Soloviev M, Esteves MP, Amiri F, Crompton MR, Rider CC. Elevated transcription of the gene QSOX1 encoding quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 in breast cancer. *PloS one*. 2013;8(2):e57327. Epub 2013/03/06.
328. Yano S, Matsuyama H, Hirata H, Inoue R, Matsumoto H, Ohmi C, et al. Identification of genes linked to gefitinib treatment in prostate cancer cell lines with or without resistance to androgen: a clue to application of gefitinib to hormone-resistant prostate cancer. *Oncology reports*. 2006;15(6):1453-60. Epub 2006/05/11.
329. Lake DF, Faigel DO. The emerging role of QSOX1 in cancer. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(3):485-96. Epub 2013/12/24.
330. Katchman BA, Ocal IT, Cunliffe HE, Chang YH, Hostetter G, Watanabe A, et al. Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2013;15(2):R28. Epub 2013/03/30.
331. Coppock D, Kopman C, Gudas J, Cina-Poppe DA. Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;269(2):604-10. Epub 2000/03/10.
332. Mischak H, Apweiler R, Banks RE, Conaway M, Coon J, Dominiczak A, et al. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clinical applications*. 2007;1(2):148-56. Epub 2007/02/01.
333. Landemaine T, Jackson A, Bellahcene A, Rucci N, Sin S, Abad BM, et al. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer research*. 2008;68(15):6092-9. Epub 2008/08/05.
334. Driouch K, Bonin F, Sin S, Clairac G, Lidereau R. Confounding effects in "a six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis": reply. *Cancer research*. 2009;69(24):9507-11. Epub 2009/11/26.
335. Kenyon K, Modi WS, Contente S, Friedman RM. A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(25):18435-7. Epub 1993/09/05.
336. Kim Y, Boyd CD, Csiszar K. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(13):7176-82. Epub 1995/03/31.
337. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(7):505-14. Epub 2010/06/25.
338. Gao Y, Xiao Q, Ma H, Li L, Liu J, Feng Y, et al. LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(44):18892-7. Epub 2010/10/20.
339. Pez F, Dayan F, Durivault J, Kaniewski B, Aimond G, Le Provost GS, et al. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer research*. 2011;71(5):1647-57. Epub 2011/01/18.
340. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nature genetics*. 2004;36(2):178-82. Epub 2004/01/28.
341. Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. Wnt Signaling in Cell Motility and Invasion: Drawing Parallels between Development and Cancer. *Cancers*. 2016;8(9). Epub 2016/09/03.
342. Li J, Ding Y, Li A. Identification of COL1A1 and COL1A2 as candidate prognostic factors in gastric cancer. *World journal of surgical oncology*. 2016;14(1):297. Epub 2016/11/30.
343. Hayashi M, Nomoto S, Hishida M, Inokawa Y, Kanda M, Okamura Y, et al. Identification of the collagen type 1 alpha 1 gene (COL1A1) as a candidate survival-related factor associated with hepatocellular carcinoma. *BMC cancer*. 2014;14:108. Epub 2014/02/21.

344. Liu PF, Wu YY, Hu Y, Wang L, He SB, Zhu YB, et al. Silencing of pancreatic adenocarcinoma upregulated factor by RNA interference inhibits the malignant phenotypes of human colorectal cancer cells. *Oncology reports*. 2013;30(1):213-20. Epub 2013/05/17.
345. Song J, Lee J, Kim J, Jo S, Kim YJ, Baek JE, et al. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) enhances the accumulation and functional activity of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016;7(32):51840-53. Epub 2016/06/21.
346. Lowery LA, Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(5):332-43. Epub 2009/04/18.
347. Ohashi A. Different cell fates after mitotic slippage: From aneuploidy to polyploidy. *Molecular & cellular oncology*. 2016;3(2):e1088503. Epub 2016/06/17.
348. Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current opinion in genetics & development*. 2007;17(2):157-62. Epub 2007/02/28.
349. Jahn SC, Corsino PE, Davis BJ, Law ME, Norgaard P, Law BK. Constitutive Cdk2 activity promotes aneuploidy while altering the spindle assembly and tetraploidy checkpoints. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 5):1207-17. Epub 2013/01/17.
350. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*. 2009;460(7252):278-82. Epub 2009/06/10.
351. Silkworth WT, Nardi IK, Scholl LM, Cimini D. Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PLoS one*. 2009;4(8):e6564. Epub 2009/08/12.
352. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(5):379-93. Epub 2007/04/12.
353. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(6):385-92. Epub 2011/04/30.
354. Schmitt HD. Dsl1p/Zw10: common mechanisms behind tethering vesicles and microtubules. *Trends in cell biology*. 2010;20(5):257-68. Epub 2010/03/17.
355. Vallee RB, Varma D, Dujardin DL. ZW10 function in mitotic checkpoint control, dynein targeting and membrane trafficking: is dynein the unifying theme? *Cell Cycle*. 2006;5(21):2447-51. Epub 2006/11/15.
356. Paschos KA, Canovas D, Bird NC. The engagement of selectins and their ligands in colorectal cancer liver metastases. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(1-2):165-74. Epub 2009/07/25.
357. Dorudi S, Hanby AM, Poulosom R, Northover J, Hart IR. Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *British journal of cancer*. 1995;71(3):614-6. Epub 1995/03/01.
358. Delektorskaya VV, Perevoshchikov AG, Golovkov DA, Kushlinskii NE. Expression of E-cadherin, beta-catenin, and CD-44v6 cell adhesion molecules in primary tumors and metastases of colorectal adenocarcinoma. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2005;139(6):706-10. Epub 2005/10/15.
359. Choi HN, Kim KR, Lee JH, Park HS, Jang KY, Chung MJ, et al. Serum response factor enhances liver metastasis of colorectal carcinoma via alteration of the E-cadherin/beta-catenin complex. *Oncology reports*. 2009;21(1):57-63. Epub 2008/12/17.
360. Torres EM, Dephoure N, Panneerselvam A, Tucker CM, Whittaker CA, Gygi SP, et al. Identification of aneuploidy-tolerating mutations. *Cell*. 2010;143(1):71-83. Epub 2010/09/21.
361. Dephoure N, Hwang S, O'Sullivan C, Dodgson SE, Gygi SP, Amon A, et al. Quantitative proteomic analysis reveals posttranslational responses to aneuploidy in yeast. *eLife*. 2014;3:e03023. Epub 2014/07/31.
362. Green RA, Wollman R, Kaplan KB. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(10):4609-22. Epub 2005/07/21.

363. Kim YH, Sung HJ, Kim S, Kim EO, Lee JW, Moon JY, et al. An RNA aptamer that specifically binds pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor inhibits migration and growth of pancreatic cancer cells. *Cancer letters*. 2011;313(1):76-83. Epub 2011/10/04.
364. Gao CC, Xu XL, Li F, Gong BG, Liu S, Cui YQ, et al. Silencing pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) increases the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(6):7555-64. Epub 2015/12/20.
365. Kim JG, Chae YS, Lee SJ, Kang BW, Park JY, Lee EJ, et al. Genetic variation in microRNA-binding site and prognosis of patients with colorectal cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2015;141(1):35-41. Epub 2014/08/01.

## **ANEXOS**



## ANEXO I

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, los resultados obtenidos han sido preparados para su publicación.

Además, durante la realización de la Tesis Doctoral he colaborado en otros proyectos del grupo, cuyas referencias aparecen a continuación:

1. Bartolomé RA, Peláez-García A, Gomez I, Torres S, Fernandez-Aceñero MJ, **Escudero-Paniagua B**, Imbaud JI, Casal JI. “An RGD motif present in cadherin 17 induces integrin activation and tumor growth”. *J Biol Chem*. 2014 Dec 12; 289 (50):34801-14.
2. García-Palmero I, Torres S, Bartolomé RA, Peláez-García A, Larriba MJ, Lopez-Lucendo M, Peña C, **Escudero-Paniagua B**, Muñoz A, Casal JI. “Twist1-induced activation of human fibroblasts promotes matrix stiffness by upregulating palladin and collagen  $\alpha 1$  (VI)”. *Oncogene*. 2016 Oct 6;35(40):5224-5236
3. Bartolomé RA, Torres S, Isern de Val S, **Escudero-Paniagua B**, Calviño E, Teixidó J, Casal JI. “VE-cadherin RGD motifs promote metastasis and constitute a potential therapeutic target in melanoma and breast cancers”. *Oncotarget*. 2017 Jan 3; 8 (1):215-227.

## ANEXO II

Las Tablas suplementarias de esta Tesis Doctoral se recogen en formato digital, en el CD adjunto al documento en papel.

