

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE MARCADORES DE CÁNCER COLORRECTAL
MEDIANTE INMUNÓMICA Y PROTEÓMICA: INTEGRACIÓN EN PLATAFORMAS
DIAGNÓSTICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Garranzo Asensio

DIRECTORES

**Rodrigo Barderas Manchado
Ana Isabel Guzmán Aránguez**

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE MARCADORES DE CÁNCER COLORRECTAL
MEDIANTE INMUNÓMICA Y PROTEÓMICA: INTEGRACIÓN EN PLATAFORMAS
DIAGNÓSTICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Garranzo Asensio

DIRECTORES

**Rodrigo Barderas Manchado
Ana Isabel Guzmán Aránguez**

Madrid, 2020

La investigación presentada en esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y en la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid, así como en la Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas del Instituto de Salud Carlos III bajo la dirección del Dr. Rodrigo Barderas Manchado y la Dra. Ana Isabel Guzmán Aránguez. Parte del trabajo experimental mostrado se ha realizado en colaboración con el grupo de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos de los Dres. José Manuel Pingarrón y Susana Campuzano Ruiz de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid y con el grupo de la Dra. Gemma Domínguez Muñoz en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”. Además, hemos colaborado con la Dra. Ana Ramírez de Molina y la Dra. Marta Gómez de Cedrón del grupo de Oncología Molecular del IMDEA-Alimentación, la Dra. Custodia Jiménez García de la Universidad Rey Juan Carlos, el Dr. Alberto Peláez García del grupo de patología molecular del cáncer y dianas terapéuticas del Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) y el Dr. Jorge Joven Maried de la Unidad de Investigación Biomédica del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili. Por último, colaboramos con investigadores clínicos de los Hospitales Gregorio Marañón -Dra. María Jesús Fernández Aceñero-, Hospital Clínico San Carlos -Dra. Carmen Povés-, el Dr. Javier Martínez Useros del grupo de Oncología Médica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y la Dra. Nuria Rodríguez Salas del Hospital Universitario La Paz.

El principal apoyo financiero para la realización de esta Tesis Doctoral ha sido proporcionado por la Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo bajo el Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI), por el Ministerio de Economía y Competitividad (Programa Ramón y Cajal al Dr. Rodrigo Barderas) y el proyecto AES-ISCIII PI17CIII/00045 al Dr. Rodrigo Barderas.



AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	19
ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	31
1. CÁNCER COLORRECTAL.....	33
1.1. Desarrollo del CCR	34
1.2. Tipos de CCR	34
1.2.1. CCR hereditario	35
1.2.2. CCR familiar	35
1.2.3. CCR esporádico	35
1.3. Diagnóstico	36
1.4. Tratamiento	37
2. BIOMARCADORES EN CÁNCER.....	37
2.1. Proteínas desreguladas en cáncer	38
2.1.1. APC	38
2.1.2. Familia de proteínas p53.....	38
2.1.3. Receptores fosfotirosín-fosfatasa	40
2.2. Respuesta inmune humoral.....	41
2.2.1. Autoantígenos en CCR	42
3. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	44
3.1. Expresión de proteínas en bacteria	45
3.2. Expresión de proteínas en células de insecto.....	45
3.3. Expresión de proteínas en células de mamífero	45
3.4. Expresión <i>in vitro</i> de proteínas	45
4. TÉCNICAS PROTEÓMICAS	46
4.1. SERPA	48
4.2. SEREX	48
4.3. Microarrays.....	48
4.3.1. Microarrays de anticuerpos	48
4.3.2. Microarrays de proteínas recombinantes	48
4.3.3. Microarrays de proteínas naturales.....	49
4.3.4. Microarrays de fagos	49
4.3.5. Microarrays de ácidos nucleicos programables (NAPPA)	49
4.4. Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS)	49
4.4.1. Marcaje metabólico	51
4.4.2. Marcaje con reactivos isobáricos.....	52
4.4.3. <i>Label free</i> MS	52

4.4.3.1. Inmunoprecipitación seguida de MS/MS	52
5. VALIDACIÓN DE RESULTADOS PROTEÓMICOS	53
5.1. Ensayos tipo ELISA	53
5.1.1. ELISA directo	54
5.1.2. ELISA indirecto	54
5.1.3. ELISA tipo sándwich	54
5.1.4. ELISA competitivo	55
5.2. Sensores electroquímicos	55
6. PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS	56
6.1. <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA)	56
6.2. STRING	57
6.3. Oncomine	57
6.4. cBioPortal	57
6.5. <i>Human Protein Atlas</i>	57
6.6. UALCAN	57
6.7. DAVID	57
OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. PLASMA Y SUEROS	65
1.1. Plasmas empleados en el estudio de la desregulación proteica mediada por $\Delta Np73$	65
1.2. Plasmas empleados en la búsqueda de autoantígenos de CCR mediante IP acoplada a LC-MS/MS	65
1.3. Plasmas empleados en el análisis de la presencia de autoanticuerpos frente a p73 y sus isoformas	66
1.4. Plasmas empleados para la evaluación de la seroreactividad a PTPRN y sus dominios intra- y extra-celular	66
1.5. Plasmas empleados en la puesta a punto de un sensor electroquímico para la detección de autoanticuerpos frente a p53	67
1.6. Plasmas empleados en la evaluación del potencial diagnóstico de autoantígenos difíciles de expresar y desarrollo de un inmunosensor electroquímico para la detección de CCR	67
2. MUESTRAS DE TEJIDO	67
3. LÍNEAS CELULARES	68
3.1. HCT116	68
3.2. <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (HUVEC) y <i>Human Lymphatic Endothelial Cells</i> (HLEC)	68
3.3. SW80, SW620, KM12C y KM12SM	68
4. EXTRACCIÓN DE RNA	68

4.1. Extracción de RNA de extractos celulares	69
5. SÍNTESIS DE cDNA	69
5.1. <i>SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR</i> (Invitrogen)	69
5.2. <i>NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit</i> (NZYtech)	70
6. GELES DE AGAROSA PARA VISUALIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	70
6.1. Geles de agarose para la comprobación de la integridad del RNA y la visualización de muestras de DNA.....	70
7. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR	70
8. LISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS	70
9. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS POR METANOL-CLOROFORMO	71
10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA	71
10.1. Determinación de la concentración de extractos proteicos	71
10.2. Determinación de la concentración de proteínas puras	71
11. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (PAGE-SDS).....	71
12. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (<i>WESTERN BLOT</i> Y <i>DOT BLOT</i>)	72
13. MODELADO <i>IN SILICO</i> DE LAS PROTEÍNAS.....	73
14. OBTENCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HCT116-ΔNp73 Y HCT116-CONTROL	73
15. MARCAJE DEL CONTENIDO PROTEICO DEL SECRETOMA DE LAS CÉLULAS HCT116 E HIBRIDACIÓN CON MICROARRAYS DE ANTICUERPOS.....	73
16. PROTEÓMICA CUANTITATIVA DE LAS CÉLULAS HCT116 MEDIANTE SILAC	75
17. ENSAYOS DE PROTEÓMICA PARA LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA DE AUTOANTICUERPOS.....	76
18. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	77
18.1. Espectrometría de masas de muestras de experimentos SILAC	77
18.2. Espectrometría de masas de la inmunoprecipitación de proteínas diana de autoanticuerpos	78
19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS DE PROTEÓMICA.....	79
19.1. DAVID.....	79
19.2. <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>	79
19.3. STRING	79
19.4. Exocarta	79
19.5. CRAPome	79
19.6. Oncomine	79
19.7. UALCAN	80
19.8. cBioPortal	80

19.9.	<i>Human Protein Atlas</i>	80
20.	OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS MEDIANTE EL SISTEMA <i>GATEWAY</i>	80
20.1.	Vectores de expresión <i>in vitro</i>	81
20.1.1.	Vectores de expresión <i>in vitro</i> para los dominios intra- y extra-celular de PTPRN.....	83
20.2.	Vectores de expresión en bacteria.....	84
21.	EXPRESIÓN <i>IN VITRO</i> DE PROTEÍNAS.....	84
21.1.	Expresión <i>in vitro</i> de proteínas empleando lisado de células HeLa.....	84
21.2.	Expresión <i>in vitro</i> de proteínas empleando lisado de reticulocitos de conejo.....	84
22.	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIA USANDO LA CEPA BL21 (DE3) DE <i>E. coli</i>	85
23.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRODUCIDAS EN BACTERIA.....	85
24.	EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR.....	85
24.1.	PCR semi-cuantitativa.....	86
24.2.	qPCR.....	86
25.	ENSAYOS CELULARES.....	87
25.1.	Ensayos celulares con silenciamiento transitorio de PTPRN.....	87
25.1.1.	Ensayos de proliferación.....	88
25.1.2.	Ensayos de invasión.....	88
25.1.3.	Ensayos de cierre de herida.....	88
26.	ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS EMPLEANDO MEMBRANAS DE NITROCELULOSA.....	88
27.	ELISA.....	89
27.1.	ELISAs comerciales.....	89
27.1.1.	ELISA frente a VEGFC (RayBiotech), VEGFR3 (RayBiotech), BDNF (RayBiotech) y EMAP-II (Elabscience).....	89
27.1.2.	ELISA comercial de CEA.....	89
27.1.3.	ELISA para la detección de autoanticuerpos frente a p53.....	89
27.2.	ELISA para EBNA1.....	89
27.3.	ELISA luminiscente empleando esferas magnéticas y proteínas expresadas a partir de extractos celulares de HeLa.....	90
27.3.1.	Inmunoensayo para la evaluación del potencial diagnóstico de los autoanticuerpos identificados mediante IP acoplada a LC-MS/MS.....	90
27.3.2.	Inmunoensayo para la evaluación del potencial diagnóstico de los autoanticuerpos previamente identificados mediante estudios proteómicos.....	91
27.3.3.	Inmunoensayo para la evaluación de la seroreactividad diferencial de PTPRN y sus dominios.....	91
27.4.	ELISA luminiscente empleando esferas magnéticas y proteínas expresadas a partir de extractos de reticulocitos de conejo.....	92

27.5.	ELISA de inhibición.....	92
28.	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	93
29.	MICROARRAYS DE TEJIDO E INMUNOHISTOQUÍMICA	93
30.	DESARROLLO DE INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS	93
30.1.	Aparatos y electrodos empleados para el desarrollo de inmunosensores electroquímicos	93
30.2.	Puesta a punto del sensor electroquímico mediante la detección de autoanticuerpos frente a p53.....	94
30.3.	Desarrollo del sensor para la detección múltiple de autoanticuerpos específicos de CCR.....	95
RESULTADOS		97
BLOQUE 1		99
Artículo 1		101
Artículo 2		141
BLOQUE 2		161
Artículo 3		163
Artículo 4		185
Artículo 5		201
Artículo 6		219
DISCUSIÓN		241
CONCLUSIONES		255
REFERENCIAS		259
ANEXO (LISTA DE PUBLICACIONES)		277
ÍNDICE DE TABLAS		
TABLA 1. Clasificación del CCR en función del sistema TNM basado en el número de tumores (T), nódulos (N) y metástasis (M)		33
TABLA 2. Tabla con autoanticuerpos descritos para CCR con un AUC igual o superior al 75% individualmente o en combinación con otros autoantígenos		44
TABLA 3. Resumen de los plasmas empleados para el estudio de la desregulación proteica mediada por Δ Np73		65
TABLA 4. Lista de plasmas empleada para la identificación de dianas de autoanticuerpos mediante inmunoprecipitación seguida de MS		66
TABLA 5. Resumen de los plasmas empleados para el estudio de la seroreactividad diferencial a p73 y sus isoformas		66
TABLA 6. Plasmas empleados para la evaluación de la seroreactividad frente a PTPRN y sus dominios		66
TABLA 7. Datos de los plasmas empleados para el desarrollo del sensor electroquímico capaz de detectar autoanticuerpos frente a p53		67

TABLA 8. Resumen de los plasmas empleados para la evaluación del potencial diagnóstico de una firma de 8 autoanticuerpos frente a CCR y desarrollo del sensor electroquímico para su detección	67
TABLA 9. Lista de anticuerpos primarios y reactivos secundarios empleados en el trabajo ..	74
TABLA 10. Lista de clones empleados en la Tesis Doctoral obtenidos del repositorio DNASU	82
TABLA 11. Secuencias de los oligos empleados para los clonajes en el sistema Gateway de los cDNAs indicados	83
TABLA 12. Secuencias de los oligos empleadas para la evaluación de la presencia del gen diana en las muestras biológicas analizadas	86
TABLA 12. Secuencias de los oligos empleadas para la evaluación de la presencia del gen diana en las muestras biológicas analizadas	86

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Etapas del CCR.....	34
FIGURA 2. Modelo inicial propuesto para la transición adenoma-adenocarcinoma en CCR..	36
FIGURA 3. Esquema representativo de las diferentes isoformas de p53, p63 y p73 a nivel génico	39
FIGURA 4. Esquema representativo a nivel de proteína de p73 y las dos isoformas $\Delta Np73\alpha$ y $\Delta Np73\beta$ más comunes.....	40
FIGURA 5. Esquema de PTPRN y sus dominios	41
FIGURA 6. Esquema de la relación temporal entre el desarrollo del CCR y el uso de autoanticuerpos para detección y tratamiento de la enfermedad.....	42
FIGURA 7. Imagen representativa de una curva ROC y su correspondiente área debajo de la curva (AUC).....	43
FIGURA 8. Sistemas de expresión de proteínas más empleados en la actualidad.....	45
FIGURA 9. Esquema representativo de las cuatro técnicas más empleadas hasta la fecha para la identificación de autoanticuerpos y proteínas desreguladas en cáncer	47
FIGURA 10. Esquema general de un espectrómetro de masas (A) y de la espectrometría de masas en tándem (B).....	50
FIGURA 11. Esquema de trabajo utilizado para el marcaje metabólico (A) o inmunoprecipitación (B) acopladas a MS.....	51
FIGURA 12. Tipos de inmunoensayos ELISA.	54
FIGURA 13. Esquema representativo de la estregia seguida para la detección específica de proteínas mediante sensores eletroquímicos.....	56

CONTENIDO DEL CD ENTREGADO CON LA TESIS DOCTORAL:

Tesis en formato digital (PDF)

Información adicional de los artículos presentados:

Artículo 1. Tabla Suplementaria 5 (*Supplementary Table S5*)

Artículo 2. Tabla Suplementaria 5 (*Supplementary Table S5*)

RESUMEN/ SUMMARY

El cáncer colorrectal es uno de los tipos de cáncer más frecuentes y letales a nivel mundial. Esta letalidad se debe, en parte, a su diagnóstico tardío cuando decae drásticamente la posibilidad de tratar al paciente de manera satisfactoria. Además, su desarrollo en los individuos se asocia al desarrollo de otras patologías crónicas como la diabetes. Por ello, es de especial interés encontrar nuevos biomarcadores tempranos para la patología que, además, puedan trasladarse a herramientas clínicas que confieran un diagnóstico rápido, eficaz y no invasivo.

Las técnicas proteómicas ofrecen una alternativa versátil a la hora de identificar posibles biomarcadores patológicos. En el contexto del cáncer, la búsqueda de posibles biomarcadores mediante técnicas proteómicas se puede abordar a través de la identificación de proteínas desreguladas en la patología o mediante el estudio de la respuesta inmune humoral. La identificación de proteínas desreguladas permite conocer con una mayor profundidad los mecanismos que dan lugar a su aparición y progresión, por lo que no sólo permiten identificar posibles biomarcadores, sino que permiten diseñar posibles estrategias terapéuticas. Por otro lado, la respuesta inmune humoral en pacientes con cáncer aparece mucho antes que los síntomas clínicos, por lo que su estudio y la identificación de posibles autoanticuerpos podría servir para establecer una firma diagnóstica temprana trasladable a la clínica. De entre las técnicas proteómicas empleadas para la identificación de posibles biomarcadores, destacan los microarrays de proteínas y la espectrometría de masas. Ambas metodologías son complementarias entre sí, si bien es cierto que presentan ciertas limitaciones que necesitan ser solventadas para ampliar el proteoma e inmunoma asociado al cáncer colorrectal. Además, la gran cantidad de datos que se obtienen a raíz de utilizar dichas aproximaciones han de ser cotejados y validados mediante técnicas que, idealmente, se pudiesen integrar en la consulta hospitalaria para su traslado a los pacientes. El desarrollo de estas técnicas con potencial diagnóstico es otro de los retos actuales, ya que es necesario integrar un sistema de expresión proteica eficaz y fácilmente escalable a herramientas de detección con capacidad de multiplexado.

En este contexto, el objetivo principal de la Tesis Doctoral ha consistido en el empleo de diversas técnicas proteómicas (microarrays de anticuerpos y espectrometría de masas) para la detección de posibles biomarcadores y proteínas desreguladas en cáncer colorrectal. Además, se ha evaluado la capacidad diagnóstica de la respuesta inmune humoral en este tipo de cáncer, desarrollándose varias plataformas de validación o con capacidad de ser trasladados a la clínica.

En el primer bloque de la Tesis Doctoral, se ahondó en el proteoma e inmunoma asociado al cáncer colorrectal. Por un lado, se emplearon los microarrays de anticuerpos y la espectrometría de masas mediante SILAC para evaluar el efecto de la desregulación proteica asociada a la sobreexpresión de $\Delta Np73$ en la patología. $\Delta Np73$ es una de las proteínas de la familia p53 que parece verse involucrada en el desarrollo y progresión tumoral. Mediante estas técnicas, y empleando cultivos de líneas celulares de cáncer de colon con sobreexpresión de $\Delta Np73$, se identificaron moléculas desreguladas secretadas al medio que podría asemejarse al secretoma tumoral presente en la sangre de pacientes con cáncer colorrectal. Entre las proteínas identificadas, destacaron el eje EMAP-II-VEGFC-VEGFR3 y BDNF. La desregulación del eje EMAP-II-VEGFC-VEGFR3 puso de manifiesto el papel de $\Delta Np73$ en la formación de vasos sanguíneos y linfáticos. En cuanto a BDNF, también se ha visto que juega un papel importante en la linfangiogénesis y angiogénesis y, además, su detección en plasma de pacientes con cáncer colorrectal e individuos sanos mostró un potencial diagnóstico bastante superior al valor del marcador clínico para este tipo de cáncer. Por otro lado, se empleó la espectrometría de masas en tándem acoplada a procesos de inmunoprecipitación para identificar posibles dianas de

autoanticuerpos en pacientes con la patología. En total, se identificaron 31 posibles proteínas dianas de autoanticuerpos presentes en menos del 10% de todos los ensayos de inmunoprecipitación registrados. Hay que destacar, además, que varias de las proteínas identificadas pueden jugar un papel importante en cáncer o han sido previamente identificadas como biomarcadores de esta patología. Por último, de igual forma que ocurría para BDNF, la detección conjunta de autoanticuerpos frente a algunas de estas dianas permitió identificar a pacientes con cáncer colorrectal o individuos con lesiones premalignas de sujetos sanos con una elevada sensibilidad y especificidad.

En el segundo bloque de esta Tesis Doctoral, se estudió la seroreactividad a diferentes moléculas de manera diferencial. Por un lado, se evaluó la seroreactividad diferencial a las isoformas de la proteína $\Delta Np73$ ($\Delta Np73\alpha$ y $\Delta Np73\beta$) y se comparó con la obtenida para la forma canónica de la proteína, TAp73. Mediante estos estudios y ensayos de inhibición, se observó una seroreactividad diferencial entre las distintas isoformas, confiriéndoles distinta capacidad diagnóstica. Por otra parte, se estudió la respuesta inmune humoral a PTPRN en pacientes con cáncer de colon y/o con diabetes tipo 2. PTPRN es una receptor fosfotirosín-fosfatasa, cuya familia de proteínas se ha visto involucrada de diversas maneras en distintos tipos de cáncer. Además, es una diana de autoanticuerpos importante para los pacientes con diabetes tipo 1. En este trabajo, se vio que la presencia de anticuerpos frente a PTPRN y su dominio extracelular era capaz de distinguir a pacientes con cáncer de colon y pacientes con cáncer de colon y diabetes tipo 2 de individuos control, por lo que podría servir como posible marcador diagnóstico. Además, la presencia de estos autoanticuerpos pudo discriminar a pacientes con diabetes tipo 2 y con cáncer de colon de aquellos pacientes que únicamente sufrían diabetes tipo 2, pudiéndose emplear como molécula para distinguir entre dicha posible población de riesgo aquellos individuos susceptibles de desarrollar cáncer colorrectal. Por último, se desarrolló un procedimiento experimental para la expresión e inmovilización de autoantígenos difíciles de expresar previamente identificados mediante técnicas de proteómica. De esta forma, se pudo evaluar su potencial diagnóstico mediante ensayos de seroreactividad empleando muestras de pacientes con cáncer colorrectal y se desarrolló un sensor electroquímico con capacidad de multiplexado para su detección. La detección de estos autoanticuerpos permitió distinguir con un elevado potencial a pacientes con cáncer colorrectal y premalignos de aquellos individuos sanos o pacientes con otros tipos de cáncer, recalándose la especificidad de la medida. Además, debido a las características del sensor, puede trasladarse fácilmente a la clínica.

En definitiva, en esta Tesis Doctoral se ha hecho uso de diferentes herramientas proteómicas para la identificación de proteínas desreguladas en cáncer colorrectal y de posibles dianas de autoanticuerpos. Ambos resultados aportan información sobre el proceso molecular que conlleva a la formación tumoral y, además, sirven como posible elemento diagnóstico. Además, mediante ensayos de seroreactividad, se han propuesto diversas firmas diagnósticas para la detección temprana de la patología y/o individuos en riesgo de su desarrollo, llegándose a poner a punto una posible herramienta implementable en rutina clínica hospitalaria.

Colorectal cancer is one of the most frequent and lethal types of cancer worldwide. Its high mortality rate is due, mainly, to its late diagnosis when the options to successfully treat patients drastically decrease. Furthermore, its development is associated with the development of other chronic diseases (such as diabetes) that may exacerbate or further impair the lifestyle of the individuals. Therefore, there is an increasing need to find early disease biomarkers that could ideally be integrated into clinical tools to provide a fast, reliable, and non-invasive diagnosis.

Proteomic techniques offer a versatile alternative for the identification of potential pathological biomarkers. In cancer, the search for these biomarkers through proteomic techniques can be achieved through the identification of deregulated proteins associated to the tumoral process or through the study of the humoral immune response. The identification of deregulated proteins allows for a better understanding of the mechanisms that induce and maintain tumor formation and aggressiveness, so they can be exploited not only for disease diagnosis but also to design potential therapeutic strategies. On the other hand, the humoral immune response in cancer appears well before the clinical symptoms so its study and the identification of disease-related autoantibodies could help establishing an early diagnostic signature that could be used in a clinical setting. Among the different proteomic techniques used for the identification of potential disease biomarkers, protein microarrays and mass spectrometry are the most versatile. Both methodologies complement each other and have associated limitations that need to be overcome to expand the current knowledge of the colorectal cancer proteome and immunome. Moreover, the vast amount of data gathered through proteomic techniques need to be validated through other methodologies that should, ideally, be able to be used in a clinical setting for patients' management. The development of these methodologies with diagnostic potential is another of the current challenges in research since there is a need to integrate a reliable and easily scalable protein expression system into detection tools with multiplexing capabilities.

In this context, the main objective of this Doctoral Thesis has been the use of different proteomic techniques (antibody microarrays and mass spectrometry) for the detection of disease biomarkers and dysregulated proteins in colorectal cancer. Furthermore, the diagnostic potential of the humoral immune response has been evaluated, and different platforms with validation or clinical characteristics have been developed.

In the first part of the Doctoral Thesis, an in-depth study of the proteome associated to Δ Np73 in colorectal cancer was performed. Antibody microarrays and mass spectrometry analysis through SILAC was performed to evaluate the effect of Δ Np73 overexpression in colorectal cancer. Δ Np73 belongs to the p53-family of proteins and plays a role on colorectal cancer development and progression. Through these techniques and using colorectal cancer cell lines with overexpression of Δ Np73, numerous secreted molecules that could resemble the tumoral secretome present in the blood from colorectal cancer patients were identified. The axis EMAP-II-VEGFC-VEGFR3, and BDNF were among the identified proteins. A dysregulation in the axis EMAP-II-VEGFC-VEGFR3 identified Δ Np73 as a key component in blood and lymphatic vessels formation. Regarding BDNF, it has also been identified as a key component in lymphangiogenesis and angiogenesis. Moreover, its detection in plasma samples from colorectal cancer patients and healthy individuals showed high diagnostic ability in colorectal cancer. Mass spectrometry coupled to immunoprecipitation was used to identify potential autoantibody targets in colorectal cancer patients. A total of 31 proteins were identified as possible targets that appeared in less than 10% of all immunoprecipitation assays registered in CRAPome. Some of the identified proteins play an important role in cancer or have been previously identified as

biomarkers of the disease. Lastly, as seen for BDNF, the simultaneous detection of some of the antibodies allowed for the identification of colorectal cancer patients or premalignant individuals with high sensitivity and specificity.

In the second part of this Doctoral Thesis, evaluation of the seroreactivity to different molecules in a differential manner was performed. First, evaluation of the differential seroreactivity in colorectal cancer patients, premalignant individuals and healthy subjects to the isoforms of ΔNp73 ($\Delta\text{Np73}\alpha$ and $\Delta\text{Np73}\beta$) was carried out, comparing the results to the seroreactivity obtained for the canonical form of the protein (TAp73). Together with inhibition assays, these studies showed that the individuals possessed different seroreactivity to the isoforms, and that the isoforms possessed different diagnostic capacity. Second, evaluation of the humoral immune response to PTPRN in colorectal cancer patients and patients with colorectal and/or type 2 diabetes was performed. PTPRN is a phosphotyrosine-phosphatase receptor whose family has been involved in different cancer types. Moreover, it is an autoantibody target in type 1 diabetic patients. In this work, autoantibodies against PTPRN and its extracellular domain were able to detect patients with colorectal cancer and type 2 diabetes and colorectal cancer patients from type 2 diabetes patients and/or healthy individuals. These data suggest that these autoantibodies could be used to detect colorectal cancer and, more importantly, identify type 2 diabetic patients at risk of developing or with colorectal cancer from a cohort of type 2 diabetic patients. Lastly, an experimental design was developed for the expression and immobilization of previously identified by proteomic techniques of difficult-to-express proteins. Therefore, their diagnostic potential could be evaluated through seroreactivity analysis using plasma samples from colorectal cancer patients. An electrochemical biosensor with multiplexing ability was developed for the detection of the autoantibodies, which could discriminate the colorectal or premalignant patients from the healthy individuals or patients with other types of cancer. Moreover, the intrinsic characteristics of the biosensor makes it an interesting tool that could be implemented in a clinical setting.

In conclusion, in this Doctoral Thesis different proteomic techniques have been used for the identification of dysregulated proteins in colorectal cancer and autoantibody targets. Both results shed some light on the molecular processes that contribute to colorectal tumor initiation and progression. Moreover, these results can also be exploited as a diagnostic element. Furthermore, through seroreactivity analysis, a novel diagnostic signature has been proposed for the early detection of colorectal cancer, and a possible clinical diagnostic tool has been developed.

ABREVIATURAS

AAT	Antígeno asociado a tumor
ACG	Automatic gain control
ACN	Acetonitrilo
APBS	<i>Adaptive Poisson Boltzmann Solver</i>
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	Área debajo de la curva
BCA	Ensayo de ácido bicínico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
C	Concentración
CA19.9	Antígeno carbohidrato 19.9
CCR	Cáncer colorrectal
CDH3	Cadherina 3
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CHCHD3	Dominio tipo3 con estructura CHCH
CID	Disociación inducida por colisión
CIN	Inestabilidad cromosómica
COL6A1	Cadena alfa 1 de colágeno tipo VI
CTTNBP2NL	Proteína N-terminal como CTTNBP2
CXCR4	Receptor tipo 4 de quimioquinas CXC
DBD	DNA binding domain
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMP	Dimetil-pimelimidato-dihidroclorido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC3	Desmocolina-3
DSG2	Desmogleína 2
E^{0.1%}	Absorbancia de una muestra cuando se encuentra a 1g/l
EB	Tampón de equilibrado
EBNA1	Antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr
ECD	Dominio extracelular de PTPRN
ECGS	Suplemento de crecimiento endotelial
ECM	Medio celular endotelial
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMAP-II	Polipéptido endotelial de activación de monocitos II
ERP44	Proteína 44 del retículo endoplasmático
FBS	Suero fetal bovino
FKBP4	Protil isomerasa 4 de FKBP
FOBT	Prueba de sangre oculta en heces
GLO1	Glioxalasa 1
GTF2B	Factor de transcripción general tipo IIB
HIF	Factor inducible por hipoxia
HLEC	<i>Human Lymphatic Endothelial Cells</i>
HQ	Hidroquinona
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICD	Dominio intracelular de PTPRN

IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
iTRAQ	<i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i>
I	<i>Paso óptico</i>
LAMC2	Subunidad Gamma 2 de laminina
LB	Luria Bertani
LC-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida
LDHB	Lactato deshidrogenasa B
LGALS1	Galectina 1
LGALS3BP	Proteína de unión a galectina 3
M	Metástasis (de TNM)
m/z	Relación masa/carga
MAPKAPK3	Proteína quinasa 3 activada por MAP quinasas
MBs	Esferas magnéticas
MGST3	Glutation S-transferasa microsomal 3
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mesajero
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSI	Inestabilidad de microsatélites
MTT	3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
N	Nódulos (de TNM)
NAPPA	Microarrays de ácidos nucleicos programables
OD	Dominio carboxil-terminal de oligomerización
OEBA	<i>Institutional Organism for Animal Welfare</i>
OPD	o-fenilendiamina
P/S	Penicilina/Estreptomicina
p/v	Relación peso/volumen
PAGE-SDS	Geles 1D de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	PBS con 0.1% Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDCD6IP	Proteína de interacción de muerte celular programada
PFAS	Fosforibosilformilglicinamidina sintasa
PIM1	Proto-oncogen serina/treonina-quinasa Pim1
PKN1	Proteína quinasa N1
PMS	Espectro de masa peptídico
PrEST	<i>Protein-epitope signature tags</i>
PTP	Fosfotirosín-fosfatasas
PTPRF	Receptor fosfotirosín fosfatasa tipo F
PTPRN	Receptor de membrana fosfotirosín-fosfatasa tipo N
PTPRs	Receptores de membrana fosfotirosín-fosfatasas
PYGL	Glicógeno fosforilasa de hígado
qPCR	Reacción de polimerasa en cadena cuantitativa
QSOX1	Sulfhidril oxidasa 1

RLU	Unidades relativas de luminiscencia
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
S1RP1	Receptor fosfato 1 de esfingosina-1
SDHA	Subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa
SEM	Error estándar de la media
SEREX	Análisis serológico de librerías de expresión de cDNA recombinante
SERPA	Análisis proteómico de muestras de suero
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SPCEs	<i>Screen-printed carbon electrodes</i>
SRC	Proto-oncogen tirosín-quinasa Src
STK4	Serina/treonina-quinasa 4
SULF1	Sulfatasa 1
T	Tamaño de tumor (TNM)
TAD	Dominio amino-terminal de transactivación de p73
TAE	Tris-Acetato EDTA
TALDO1	Transaldolasa 1
TBS	Tampón Tris salino
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
THSD7A	Dominio 7A con trombopondina tipo 1
TMT	<i>Tandem Mass Tag</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
TRIM29	Proteína 29 que contiene motivos tripartitos
Trp	Triptófano
v/v	Relación volumen/volumen
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFC	Factor de crecimiento endotelial vascular tipo C
VEGFR3	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 3
WB	<i>Western blot</i>

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer es responsable de más de 8 millones de muertes a nivel mundial, situándose en segunda posición de mortalidad entre las enfermedades crónicas no infecciosas [1]. Pese a los avances en su diagnóstico y tratamiento, su prevalencia e incidencia ha aumentado en los últimos años debido al envejecimiento progresivo de la población, así como a la aparición de hábitos poco saludables, [1, 2].

Tanto la fisiopatología como la frecuencia de los distintos tipos de cáncer varía según su localización, siendo el cáncer colorrectal (CCR) el tercero más frecuente y el segundo más letal a nivel mundial [3, 4]. La elevada frecuencia se debe, en parte, al envejecimiento progresivo de la población y a los hábitos nutricionales actuales poco saludables en países desarrollados. Además, se está produciendo un aumento en las conductas consideradas como factores de riesgo del desarrollo de la enfermedad, como son el consumo de tabaco y alcohol, la obesidad y la falta de ejercicio. Así, se estima que en el 2035 la incidencia aumentará en 2.5 millones de casos nuevos [4, 5].

Se calcula que cada año se diagnostican a nivel mundial 1.80 millones de casos de CCR, correspondiendo al 10% de todos los tipos de cáncer, sólo por detrás del cáncer de pulmón y mama [4]. Una de las principales causas de su letalidad es su diagnóstico tardío cuando hay metástasis a órganos distales, ya que los pacientes en estadíos tempranos no suelen mostrar sintomatología [3]. En cuanto a su mortalidad, se estiman en 880000 casos anuales, sólo por detrás del cáncer de pulmón. En España, se diagnostican aproximadamente 37000 casos anuales, correspondiendo al 13.7% de todos los tipos de cáncer y convirtiéndolo en el cáncer de mayor incidencia si se tienen en cuenta ambos géneros. Por otro lado, fallecen aproximadamente 15000 personas al año, convirtiéndolo en el segundo cáncer más mortal. Esta mortalidad, así como la prevalencia a 5 años del 21.0% en Europa y del 7.5% en España, está muy relacionada con la etapa en la que se diagnostica el CCR. De esta forma, cuando se diagnostica en las etapas tempranas, se encuentra localizado (estadíos I y II), y la supervivencia a 5 años es del 89.9% y 71.3%, respectivamente. Por otro lado, si se diagnostica en las etapas más tardías cuando hay diseminación a ganglios linfáticos o metástasis (estadíos III y IV), la supervivencia llega a ser de sólo un 14.2% (Tabla 1) [6, 7].

Tabla 1. Clasificación del CCR en función del sistema TNM basado en el número de tumores (T), nódulos (N) y metástasis (M)

TNM	Tumor	Nódulo	Metástasis	Supervivencia a 5 años (%)
0	T0	N0	M0	
I	T1	N0	M0	89.9
II	T2	N0	M0	
IIA	T3	N0	M0	71.3
IIB	T4	N0	M0	
IIIA	T1, T2	N1	M0	
IIIB	T3, T4	N1	M0	
IIIC	Cualquier T	N2	M0	14.2
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	

Pese a la notable mejoría en la supervivencia a los 5 años cuando el CCR se diagnostica en etapas tempranas, es interesante recalcar que la mayoría de los casos de CCR se diagnostican en las

etapas más avanzadas (61% de todos los casos), lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que permitan un diagnóstico temprano eficaz.

1.1. Desarrollo del CCR

El desarrollo del CCR suele ocurrir a partir del crecimiento anormal de células no cancerosas (o pólipos) en la pared interna del colon o recto a lo largo del tiempo. Actualmente, se cree que las células precursoras de los pólipos necesarias para la iniciación y mantenimiento del proceso tumoral son células madre (*stem cells*) o células similares a las células madre (*stem cell-like cells*) que surgen a partir de la acumulación de alteraciones genéticas o epigenéticas que inactivan genes supresores tumorales, o bien, activan oncogenes [8, 9].

Los pólipos suelen ser hiperplásicos o adenomatosos. Los pólipos hiperplásicos no suelen dar lugar a CCR, aunque se recomienda su extirpación. Por otro lado, los pólipos adenomatosos (o adenomas) se consideran precancerosos (estadío 0), y pueden llegar a desarrollar el CCR. Durante el desarrollo de la tumorigénesis, las células comienzan a invadir la capa muscular (estadíos I-IIA), para pasar al peritoneo visceral (estadío IIB) y zonas adyacentes (estadío IIC) hasta invadir los nódulos linfáticos y tejidos cercanos (estadíos IIIA-IIIC) y producirse una metástasis distal de las células a través de los vasos sanguíneos (estadío IV).

Los estadíos del CCR se clasifican en función del grado de diseminación (0-IV), considerándose los estadíos 0-II como etapas tempranas y los estadíos III y IV como etapas avanzadas. En las etapas tempranas no hay diseminación a los ganglios linfáticos, mientras que en los estadíos III y IV hay diseminación a ganglios y, en el estadío IV, metástasis (Figura 1). Actualmente, los parámetros que se utilizan con mayor frecuencia para establecer el estadío en el que se encuentra el CCR son aquellos establecidos por la *American Joint Committee on Cancer*, que se basa en el sistema TNM. El sistema TNM evalúa el tamaño del tumor (T), la invasión a nódulos linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M) (Tabla 1).

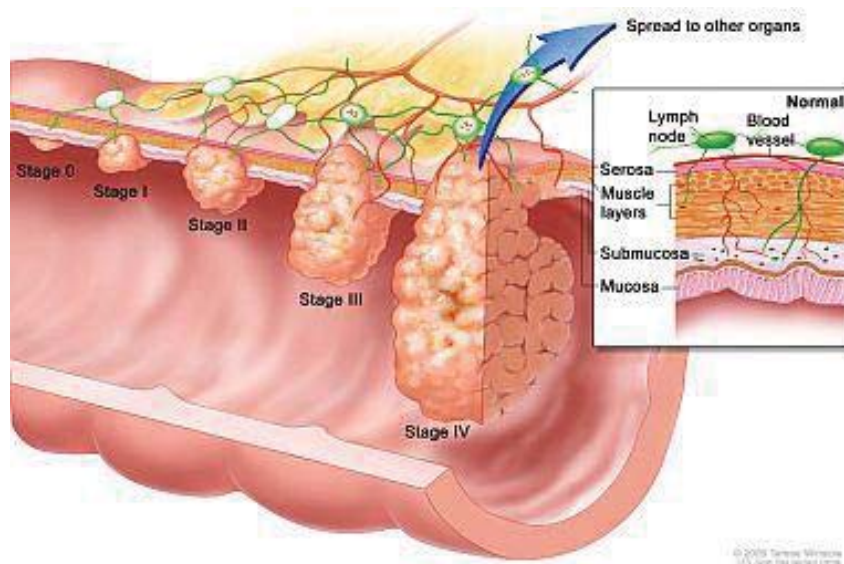


Figura 1. Etapas del CCR. Imagen adaptada del Instituto de Salud de Estados Unidos (NCI, NIH) [10].

1.2. Tipos de cáncer colorrectal

El CCR es una enfermedad heterogénea y de la que, aunque se desconocen los mecanismos exactos que llevan al desarrollo de la patología, se han observado tres subgrupos: hereditario, familiar y esporádico [11, 12]. El CCR hereditario y el familiar tienen un fuerte componente genético.

1.2.1. CCR hereditario

El CCR hereditario (5%-7% de todos los casos de CCR) engloba a un conjunto de pacientes con síndromes que acaban desarrollando CCR [13]. Este tipo de síndromes están asociados a alteraciones genéticas específicas por lo que se pueden llevar a cabo pruebas genéticas que determinen su presencia. Pueden dividirse en síndromes sin poliposis y síndromes con poliposis. Los síndromes con poliposis suelen ser más fáciles de diagnosticar debido a la presencia de pólipos.

Entre los síndromes que cursan sin poliposis se encuentra el síndrome de Lynch, que puede predisponer al desarrollo de varios tipos de cáncer, no solo el CCR [14, 15]. Este tipo de CCR surge por la presencia de mutaciones en los sistemas de reparación del DNA asociados a la inestabilidad de microsatélites (MSI) [16, 17]. Los pacientes se suelen diagnosticar de manera temprana por lo que se suelen poder tratar con éxito. Por otro lado, la Poliposis Adenomatosa Familiar cursa con numerosos adenomas en el colon y recto a edades tempranas debido, principalmente, a alteraciones en el gen APC, que produce inestabilidad cromosómica (CIN) y CCR [17].

1.2.2. CCR familiar

El CCR familiar ocurre en aproximadamente el 10%-20% de los casos de CCR [18] y presenta características bastante heterogéneas. Aunque sus alteraciones moleculares específicas se desconocen y no se ha descrito una alteración genética específica, su aparición podría deberse a una combinación de factores genéticos y ambientales. Los individuos cuyos familiares en primer grado (padres e hijos) han tenido pólipos adenomatosos presentan una elevada probabilidad de desarrollo de este tipo de CCR, por lo que es recomendable realizar pruebas diagnósticas de forma regular a partir de los 40 años [19-21].

1.2.3. CCR esporádico

El CCR esporádico es el más común y se suele desarrollar a partir de inestabilidades cromosómicas y de microsatélites, y a través de acumulaciones de daño en el DNA como consecuencia de factores ambientales no heredables. De entre los factores ambientales relacionados con el CCR, destacan las dietas ricas en carnes rojas y pobres en fibra, el tabaquismo y el alcohol [22-24].

Aunque no exista una única vía de señalización implicada en el desarrollo del CCR esporádico, en la mayoría de los casos la primera mutación suele ocurrir en el gen *APC*, encargado de frenar el crecimiento de las células, por lo que se produce un crecimiento descontrolado que conlleva a la tumorigénesis. En el CCR esporádico, se propusieron una serie de alteraciones genéticas en cromosomas y en oncogenes y genes supresores de tumores como *KRAS* o la familia de p53 que originaban la transformación de un epitelio normal a un tumor maligno [25-29]. De esta forma, en el modelo propuesto se iniciaría el CCR con la delección del gen *APC* (60% de los casos) seguida de mutaciones en *KRAS* que producen el crecimiento y la progresión de adenoma a adenocarcinoma para completarse finalmente con la inactivación o mutación de p53 (Figura 2). Sin embargo, hoy en día esta secuencia de eventos se considera demasiado simplista, ya que se ha visto que puede haber desregulación simultánea de numerosos oncogenes y genes supresores de tumores [30].

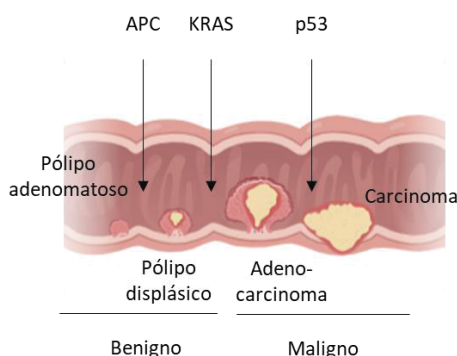


Figura 2. Modelo inicial propuesto para la transición adenoma-adenocarcinoma en CCR. Imagen realizada empleando Biorender.

Hasta la fecha, se han descrito tres mecanismos moleculares consecuencia de mutaciones somáticas que conllevan al desarrollo de este tipo de CCR: la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad de microsatélites y el fenotipo hipermetilado de las islas CpG [31].

La inestabilidad cromosómica, definida como la ganancia o pérdida de cromosomas, se detecta en un elevado número de pacientes con CCR, siendo la región que contiene al gen *TP53* la que se pierde con mayor frecuencia [26, 32]. Por otro lado, la inestabilidad de microsatélites (secuencias cortas de DNA repetidas y distribuidas a lo largo del genoma) se encuentra asociada a defectos en los procesos de reparación del DNA, alterándose así los procesos de replicación que producen inserciones y deleciones en los microsatélites. Es interesante recalcar que en los tipos de CCR en los que se dan estas alteraciones, raras veces se encuentra mutado el gen que codifica para la proteína KRAS o PI3K, recalándose el hecho de que la aparición de CCR esporádico no se debe siempre a la misma secuencia de eventos [33]. Por último, el fenotipo hipermetilador de las islas CpG produce tumores con una elevada hipermetilación del DNA que conlleva a la inactivación de genes supresores de tumores [34, 35]. En este caso, se producen alteraciones en *BRAF*, pero no en *TP53* o *APC* [36, 37].

1.3. Diagnóstico

El diagnóstico se suele realizar bien a través de pruebas de imagen y exploración mediante técnicas invasivas de las posibles zonas afectadas, o bien, a través del cribado molecular de proteínas asociadas a la patología.

Dado que la mayoría de los pólipos y cánceres benignos no cursan con síntomas clínicos, el diagnóstico de los pacientes con CCR suele ocurrir en las etapas más avanzadas, cuando se presentan los síntomas clínicos que permiten su identificación (heces en sangre, pérdida de peso, etc) [38]. Cuando hay sospecha de posible CCR, o bien en controles rutinarios, se suele llevar a cabo la prueba de sangre oculta en heces (FOBT) que evalúa la presencia de hemoglobina que indicaría la posible presencia de CCR. Esta prueba es bastante sencilla y poco invasiva, pero carece de una alta sensibilidad en estadios tempranos de la patología y puede llegar a producir un elevado número de falsos positivos, requiriéndose un método de detección más invasivo para la confirmación de CCR ante un resultado positivo de FOBT, como es la colonoscopia [39, 40]. La colonoscopia permite el estudio del colon entero, localizando lesiones malignas para su extirpación seguida de quimioterapia [41-43]. Por tanto, cuánto menos extendido esté el tumor en el momento de su diagnóstico, mayor probabilidad de curación. Sin embargo, la baja sensibilidad del FOBT en estadios tempranos sigue provocando que el CCR se diagnostique preferentemente en estadios avanzados, dificultándose su tratamiento.

En cuanto al cribado molecular, en CCR no existe ningún marcador lo suficientemente específico y sensible que permita su diagnóstico definitivo en clínica. Sin embargo, se suele realizar un cribado molecular frente a la presencia del antígeno carcinoembrionario (CEA) que se utiliza para la monitorización postoperatoria [44, 45]. Dado que el CEA se encuentra elevado en sueros de pacientes con distintos tipos de cáncer, así como en condiciones no neoplásicas, aunque se detecten niveles elevados en pacientes, no permite la detección de CCR, el cual se debe diagnosticar con otras técnicas más invasivas como la colonoscopia. Además, el CEA se encuentra elevado únicamente en pacientes en estadios tardíos por lo que no permite la detección temprana del CCR (cuando se puede tratar con mayor éxito). Otro marcador que se mide en clínica es el CA19.9, aunque también se desaconseja su uso para el diagnóstico de los pacientes [46].

1.4. Tratamiento

El tratamiento del CCR depende, en gran medida, del estadio en el que se diagnostica. De esta forma, si no se ha producido diseminación, la primera opción de tratamiento es la resección o cirugía local para eliminar las lesiones, aunque si el tumor es de un tamaño considerable, se suele eliminar parte del colon. Además, en cuanto se produce diseminación a los ganglios linfáticos, éstos se eliminan también, recomendándose quimioterapia si se considera que hay riesgo de recidiva. Por otro lado, si el cáncer se ha extendido de forma considerable a otros órganos, es posible que no se pueda operar, por lo que se recomienda quimioterapia para disminuir la carga tumoral antes de proceder a la cirugía [47].

2. BIOMARCADORES EN CÁNCER

Los biomarcadores son moléculas cuya presencia sirve como indicador específico de un determinado proceso biológico. Su grado de utilidad depende de su especificidad, sensibilidad y facilidad de medición. Estos biomarcadores pueden ser moleculares (proteínas, DNA tumoral circulante, miRNAs, etc.), histológicos, radiográficos o fisiológicos.

En función de la información que aportan, los biomarcadores se pueden clasificar como biomarcadores diagnósticos, pronósticos o predictivos [48, 49].

Otra forma de clasificación de los biomarcadores es en función de sus características moleculares, siendo los marcadores genómicos y los marcadores proteómicos los más comunes. Los biomarcadores genómicos se basan en la comparación de los diferentes perfiles de expresión génica para determinar la presencia de un estado patológico. Los biomarcadores proteómicos, por otra parte, se basan en la comparación del fenotipo de la célula consecuencia del nivel de expresión del conjunto de proteínas o sus alteraciones presentes en un organismo en un momento dado.

En cáncer, además de ayudar en su diagnóstico, pueden servir para valorar la respuesta al tratamiento de un paciente o el pronóstico de la enfermedad. Pese a que la tumorigénesis tiene su origen en la acumulación de alteraciones genéticas a lo largo del tiempo, los marcadores proteómicos son los que han mostrado una mayor utilidad, aunque no hay muchos disponibles actualmente en clínica [50-53].

Como ya se ha mencionado, no existen biomarcadores específicos para el diagnóstico del CCR, y los que se utilizan en clínica (CEA y el CA19.9) permiten evaluar el estado postoperatorio de un paciente [54]. Actualmente, se está empezando a realizar el cribado de CCR a través de KRAS, BRAF, SMAD, la MSI y las células circulantes [55]. Sin embargo, todos los estudios apuntan a que

no existe un marcador único para la identificación de la patología, por lo que es necesaria la búsqueda de una firma diagnóstica mínima capaz de detectar el CCR con elevada especificidad y sensibilidad.

Dentro de las diferentes estrategias para la búsqueda de biomarcadores en cáncer, destaca el estudio de la desregulación proteica que ocurre como consecuencia de la patología y la evaluación de la respuesta inmune de nuestro organismo frente a ella. De esta forma, si se conocen aquellas proteínas que se encuentran alteradas durante la patología, o la respuesta de nuestro organismo frente al desarrollo tumoral, podrían encontrarse biomarcadores proteicos tempranos con elevada sensibilidad y especificidad que detecten el proceso patológico y sean capaces de distinguir su tipología empleando métodos menos invasivos.

2.1. Proteínas desreguladas en cáncer

Durante el desarrollo del proceso tumoral, se van acumulando alteraciones a nivel genético que se acaban traduciendo en alteraciones proteicas. Estas alteraciones producen la aparición de la tumorigénesis y de las propiedades celulares asociadas a este proceso (mayor proliferación, agresividad, metástasis, resistencia a tratamiento...). Existen numerosas alteraciones genéticas y proteicas descritas que conducen a un proceso oncogénico o que son resultados de este, como puede ser la desregulación en cáncer a nivel general de proteínas fosfotirosín-fosfatasa (PTP) o p53. A nivel más específico, en CCR, como ya se ha mencionado, juega un papel importante la proteína APC.

2.1.1. APC

Como se ha mencionado anteriormente, las alteraciones en el gen *APC* suelen ser las principales desencadenantes del CCR esporádico, aunque no de manera exclusiva. APC es una proteína implicada en la migración celular y formación del huso mitótico a través de su interacción con los microtúbulos. Por tanto, al verse alterada esta interacción, se produce una incorrecta segregación cromosómica que desencadena la aneuploidía y CIN [56-60]. Además, también contribuye probablemente al fallo mitótico al verse afectada la formación del huso [61]. Por otra parte, la CIN se ve exacerbada por la acumulación de β -catenina, consecuencia de la ausencia de APC que produce una incorrecta activación de la vía Wnt [56, 62-64].

2.1.2. Familia de proteínas p53

Otra de las proteínas implicadas en el desarrollo del CCR es p53. El gen que codifica para la proteína p53 se encuentra alterado en aproximadamente el 50% de todos los tumores sólidos. En CCR, se encuentra mutado en el 50-75% de los casos, presentando mutaciones, polimorfismos y una expresión diferencial entre el tejido tumoral y el tejido normal [65-77]. p53, considerado el guardián del genoma, es un factor de transcripción implicado en la respuesta al daño de DNA, estrés oxidativo, señales de proliferación, regulación del ciclo celular y apoptosis [78]. En CCR, frente a CIN, puede llegar a producir arresto en las fases G1, G2/M del ciclo celular, apoptosis o senescencia [65-73]. Sin embargo, mientras que la función y desregulación de p53 se ha estudiado de forma extensa, mucho menos conocido resulta el papel que tiene el resto de las proteínas de la familia p53 en el desarrollo del proceso tumoral.

Además de la proteína p53, la familia de p53 incluye a las proteínas p63 y p73. Todas ellas presentan un dominio de organización similar entre ellas y numerosas isoformas producto del *splicing* alternativo susceptibles a sufrir modificaciones post-traduccionales. A nivel estructural, p53, p63 y p73 poseen un dominio amino-terminal de transactivación (TAD), un dominio altamente conservado de unión al DNA (DBD; DNA binding domain) y un dominio carboxilo-terminal de oligomerización (OD) (Figura 3) [79]. Entre las tres proteínas, p63 y p73 son las más

similares estructuralmente, aunque el mayor grado de homología entre las tres proteínas se encuentra en el DBD [80].

Debido a que poseen tres promotores (uno de ellos detectado *in silico*) existen numerosas isoformas para las tres proteínas producidas por el *splicing* alternativo y los diferentes sitios de iniciación de la traducción [81, 82]. En total, se han descrito hasta 40 proteoformas teóricas para p73, y 20 y 10 para p53 y p63, respectivamente.

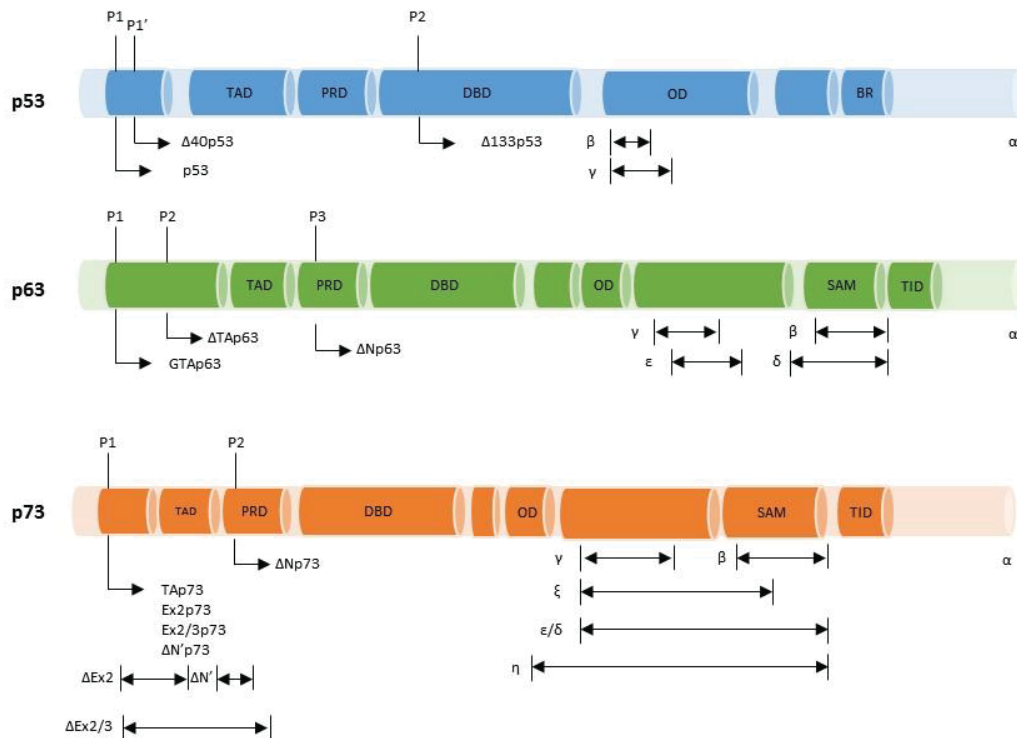


Figura 3. Esquema representativo de las diferentes isoformas de p53, p63 y p73 a nivel génico. TAD: dominio de transactivación; PRD: dominio rico en prolina; DBD: dominio de unión al DNA; OD: dominio de oligomerización; SAM: motivo sterile-alpha; TID: dominio de transactivación-inhibición; BR: región básica.

p63 y p73, al igual que p53, se encuentran mutadas en muchos cánceres y tienen un importante papel como supresores tumorales [83-85]. Sin embargo, pese a que se ha demostrado que p63 y p73 actúan de forma independiente de p53, la mayoría de los estudios del papel de esta familia de proteínas se han centrado en p53 y alguna de sus isoformas más comunes, obviándose la importancia del resto de proteínas de la familia. A nivel génico, p63 y p73 no se suelen encontrar mutadas en cáncer, pero presentan expresión aberrante durante la patología [82, 86]. Las isoformas canónicas de las proteínas (TAp63 y TAp73) pueden inducir parada del ciclo celular, senescencia, reparación del DNA y apoptosis frente a tratamientos quimioterapéuticos [87-89], mostrando potencial como supresores tumorales. En cambio, las isoformas que no poseen parte del dominio de transactivación en el amino-terminal (isoformas ΔN) (Figura 4) parecen poseer propiedades oncogénicas, encontrándose sobreexpresadas en una gran cantidad de tumores y se correlacionan con un mal pronóstico de la patología [86]. Este papel dual de la familia de proteínas sugiere que la regulación positiva de las isoformas ΔN puede llegar a inactivar las isoformas TA durante la tumorigénesis.

Dentro de las proteínas de la familia p53, se ha descrito la desregulación de p73 en varios tipos de cáncer [90]. El papel que juega esta proteína depende, en gran medida, de la isoforma que se vea involucrada. De forma general, las isoformas de TAp73 completas poseen potencial como supresor tumoral [91], mientras que las que no poseen parte del dominio de transactivación en

el amino-terminal poseen propiedades oncogénicas (Figura 4) [92, 93]. Concretamente, TAp73 se ha visto asociada a un pronóstico más favorable en tumores cerebrales [94] y en cáncer de pulmón [95]. Por el contrario, la expresión de variantes Δ TAp73 predice en tumores ginecológicos y CCR un mal pronóstico al afectar a la resistencia a terapias y agresividad del tumor [90, 96]. Por otro lado, en pacientes con tumores cerebrales, tumores hepatocelulares, cáncer de pulmón, cáncer gástrico y cáncer colorrectal, la sobreexpresión de Δ Np73 se asocia con un peor pronóstico [97-101]. Además, aunque en CCR se encuentre documentada la relación de la sobreexpresión de Δ Np73 a un peor pronóstico, se desconocen sus moduladores transcripcionales, los cuales podrían ser interesantes dianas diagnósticas o terapéuticas [90, 102].

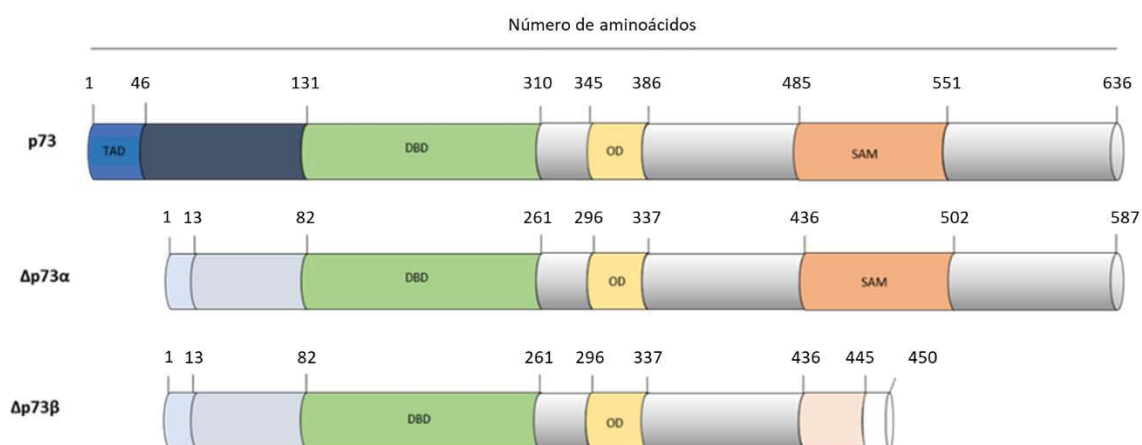


Figura 4. Esquema representativo a nivel de proteína de p73 y las dos isoformas Δ Np73 α y Δ Np73 β más comunes.

2.1.3. Receptores fosfotirosín-fosfatasa

Otra disregulación proteica común que ocurre durante el desarrollo del cáncer es la señalización aberrante de fosfotirosinas, causadas en parte, por alteraciones en proteínas tirosín-quinasa o tirosín-fosfatasas que producen un desequilibrio en la fosforilación y activación de las vías de señalización implicadas, pudiendo verse afectada la adhesión celular (proceso importante para el desarrollo de la tumorigénesis) [103]. Un ejemplo de esta señalización aberrante en cáncer es la que se produce por las alteraciones en receptores de membrana fosfotirosín-fosfatasas (PTPRs), que tienen funciones antagonizantes con las proteínas tirosín-quinasa.

La familia de proteínas PTPRs (compuesta por 21 receptores, la mayoría huérfanos) puede tener funciones oncogénicas o actuar como supresores tumorales [104]. Aunque se desconocen las señales extracelulares involucradas en su control, estas proteínas se han visto involucradas en la regulación del sistema inmune, el desarrollo vascular y el desarrollo del sistema nervioso [105-108]. Dentro de la familia PTPR, el receptor PTPR tipo N (PTPRN) se ha visto involucrado en varias patologías crónicas, incluyendo distintos tipos de cáncer (aunque su papel no está claro) y en la diabetes tipo 1 [109-114] .

PTPRN, también conocido como IA-2, es un receptor fosfotirosín-fosfatasa que cuenta con un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (Figura 5). Esta proteína se procesa en los islotes pancreáticos y células neuroendocrinas, jugando un papel importante en la secreción hormonal y de neurotransmisores [111, 114-116]. En cáncer, se ha visto involucrado en el carcinoma hepatocelular y en glioblastoma, considerándose en ambos casos un marcador pronóstico desfavorable [111, 112]. Además, su hipermetilación y su elevada

expresión se asocia a una menor supervivencia en pacientes con cáncer de ovario y con un mayor crecimiento tumoral y proliferación celular en cáncer de pulmón de células pequeñas, respectivamente [113, 114].

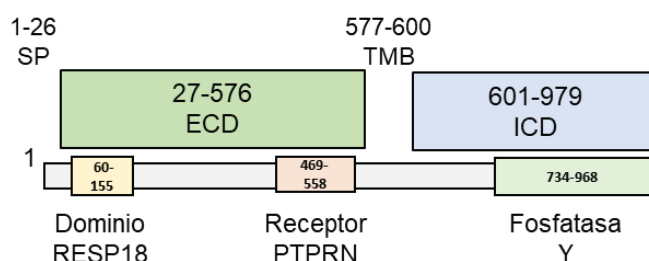


Figura 5. Esquema de PTPRN y sus dominios. SP: péptido señal; ECD: dominio extracelular; ICD: dominio intracelular; TMB: dominio transmembrana.

En la diabetes tipo 1, la presencia de anticuerpos frente a PTPRN se puede emplear como biomarcador de la enfermedad y para detectar a aquellos individuos asintomáticos [109, 117-121]. Estos anticuerpos se han descrito frente al dominio extracelular e intracelular [122, 123]. Hasta la fecha, existen numerosos estudios con resultados ambiguos sobre la relación entre la diabetes y el CCR, aunque en líneas generales se aprecia una mayor tendencia a desarrollar lesiones premalignas si se padece esta patología [124-130].

2.2. Respuesta inmune humoral

Dado que la mayoría de los pacientes con CCR se diagnostican en etapas tardías, cuando aparecen los síntomas clínicos y cuando se dificulta su tratamiento, es necesaria la búsqueda de nuevos marcadores tempranos del proceso tumoral que incrementen el porcentaje de supervivencia de los pacientes. En este sentido, la respuesta inmune humoral ofrece una alternativa interesante a los biomarcadores convencionales ya que puede detectarse en los estadios tempranos de la patología cuando aún es posible un correcto tratamiento y curación de los pacientes.

La respuesta inmune humoral es un proceso que se ha observado en patologías crónicas como el cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. En cáncer, esta respuesta inmune puede desencadenarse durante la formación y progresión tumoral [131-133]. Durante el proceso de desarrollo tumoral, se producen numerosas alteraciones a nivel genético que se traducen en alteraciones proteicas. De esta forma, las células tumorales (o las que se convertirán en patológicas) pueden producir autoantígenos o neoantígenos. Estos autoantígenos, o antígenos asociados a tumor (AAT) son proteínas que han sufrido mutaciones, plegamiento incorrecto, truncadas, sobreexpresadas o con un incorrecto *splicing* o degradación aberrante [133-138]. En respuesta a dichas alteraciones, el sistema inmune humoral produce autoanticuerpos frente a estas moléculas que se pueden encontrar en el plasma o suero de los pacientes [139, 140]. Debido a la amplificación del sistema inmune, la detección de estos autoanticuerpos se puede realizar 2-3 años antes de la aparición de los síntomas clínicos de la patología, lo que ayudaría a su diagnóstico temprano (Figura 6). Además, al poder medirse con una simple analítica, se podría llevar a cabo el diagnóstico de la enfermedad mediante métodos mucho menos invasivos que la colonoscopia. Todas estas características convierten la detección de la respuesta inmune humoral en un candidato idóneo como posible estrategia en el diagnóstico temprano del cáncer [141-143].

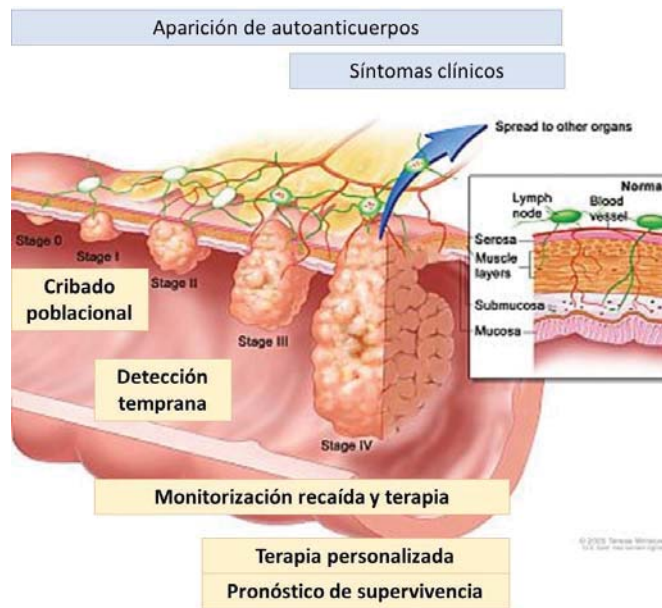


Figura 6. Esquema de la relación temporal entre el desarrollo del CCR y el uso de autoanticuerpos para detección y tratamiento de la enfermedad. Imagen adaptada del Instituto de Salud de Estados Unidos (NCI, NIH) [10].

Dentro de las distintas proteínas relacionadas con el proceso tumoral, p53 es considerado el autoantígeno por excelencia en cáncer ya que se han encontrado autoanticuerpos frente a él en hasta un 40% de los pacientes de cáncer, dependiendo del tipo cáncer. Por tanto, aunque no es específico de ningún tipo tumoral, es un candidato ideal para formar parte en paneles de cribado poblacional para la detección de la patología por su elevada especificidad [133, 144-147]. A pesar del fuerte nexo entre el resto de las proteínas de la familia de p53 con el proceso oncogénico y su presencia en sueros de pacientes carentes de seroreactividad a p53, se conoce poco del posible papel del resto de proteínas de esta familia (y sus numerosas isoformas) como posibles dianas de autoanticuerpos.

2.2.1. Autoantígenos en CCR

Existen numerosos autoantígenos descritos en CCR que aparecen en sueros de pacientes [148, 149]. Sin embargo, no todos los estudios aportan información sobre su poder diagnóstico, normalmente expresado como el área debajo de la curva (AUC) de las denominadas curvas características operativas del receptor (más conocidas como curvas ROC, acrónimo inglés *Receiver Operating Characteristic*) (Figura 7). Generalmente, para que un marcador se considere útil, su área debajo de la curva tiene que ser superior al 75%. Las curvas ROC, además, aportan información sobre la sensibilidad (definida como la relación entre el número de positivos y la suma del número de verdaderos positivos y falsos negativos) y especificidad (definido como la relación entre el número de negativos y la suma del número de verdaderos negativos y falsos positivos). De esta forma, la sensibilidad de un marcador es su capacidad para detectar la patología en individuos que la padecen, mientras que la especificidad es su capacidad de identificar la ausencia de la enfermedad en los individuos que no la padecen. De esta forma, según su capacidad diagnóstica, los marcadores pueden producir falsos positivos ante una especificidad baja (“detectar” la enfermedad en individuos que no la padecen) y falsos negativos ante una sensibilidad baja (no detectar la patología en individuos que la padecen).

Las proteínas encontradas en CCR como posibles marcadores séricos con un área superior al 75% se encuentran detalladas en la Tabla 2. Estas proteínas (incluyendo las que poseen AUC inferiores a la ideal o sin información sobre su poder diagnóstico) suelen estar relacionadas con procesos implicados en el desarrollo tumoral (ciclo celular, transducción de señales, proliferación y apoptosis). Sin embargo, debido a la alta heterogeneidad de la respuesta humoral entre los pacientes, así como las distintas características de las técnicas empleadas para su detección, existe una gran variedad de proteínas identificadas, siendo muy pocas las que coinciden entre estudios. De entre los autoantígenos que aparecen en varios estudios, se encuentran p53, MUC1, c-MYC, survivina, ANXA4, CEA y p62, destacándose su papel en la patología [148, 150]. Sin embargo, el uso de estas proteínas como posibles biomarcadores específicos de CCR tiene sus limitaciones, como es su baja sensibilidad. Por tanto, se necesita encontrar una firma diagnóstica de autoanticuerpos de CCR lo suficientemente sensible y específica que permitiese identificar y clasificar el tipo tumoral.

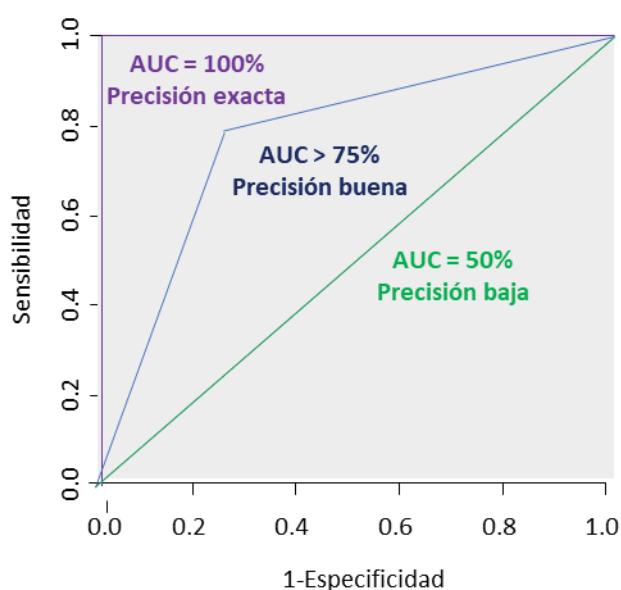


Figura 7. Imagen representativa de una curva ROC y su correspondiente área debajo de la curva (AUC). La curva ROC, así como su AUC, sensibilidad y especificidad, permite discriminar entre grupos e identificar la probabilidad de falsos positivos y falsos negativos.

La búsqueda de AATs empleando técnicas ómicas posibilita la identificación de dianas de autoanticuerpos que puedan servir para el diagnóstico. Además, la identificación de estas proteínas de forma simultánea puede permitir distinguir pacientes con la patología de individuos control con mayor especificidad y sensibilidad que si se detecta una proteína únicamente [150].

La identificación de posibles AATs basados en la caracterización de la respuesta humoral mediante técnicas proteómicas se ha llevado a cabo en pacientes con CCR [151-153]. De esta forma, se llegaron a identificar 19 AAT con buen potencial diagnóstico empleando microarrays de proteínas comerciales [153, 154]. Por otro lado, otro estudio permitió identificar varios péptidos que se desplegaron en fagos T7 [155]. Mediante microarrays comerciales, se identificaron y validaron, entre otras, MAPKAPK3, PIM1, STK4 y SRC. Es de destacar también que hay proteínas que se tuvieron que descartar durante su validación inicial debido a su complejidad de obtención, como PKN1. Por otra parte, el análisis mediante microarrays de fagos identificó péptidos inmunoreactivos de SULF1 y GTF2B, así como péptidos correspondientes a la ya identificada STK4. Pese a que se pudo evaluar el poder diagnóstico de algunos de los AATs descritos mediante ambas metodologías, se tuvo que descartar la inclusión de algunas de estas

proteínas en inmunoensayos que pudiesen servir como herramientas en clínica debido a que son moléculas difíciles de expresar y/o purificar con problemas de degradación y agregación durante los distintos pasos de su obtención y almacenamiento.

Tabla 2. Tabla con autoanticuerpos descritos para CCR con un AUC igual o superior al 75% individualmente o en combinación con otros autoantígenos.

Poder diagnóstico de la detección individual de los autoanticuerpos frente a las proteínas diana				
Proteína diana	Referencia	AUC (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
ANXA4	[156]	79	85	62
SEC61β	[157]	80	79	75
RPH3AL	[158]	84	73	84
Poder diagnóstico de la detección simultánea de los autoanticuerpos frente a las proteínas diana				
Proteína diana	Referencia	AUC (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
6 péptidos de fagos + CEA	[159]	97	92	96
5 péptidos de fagos	[160]	97	90	92
MAPKAPK3 + ACVR2B + PIM1	[153]	85	83	74
MAPKAPK3 + ACVR2B	[153]	85	83	74
6 péptidos de fagos	[159]	93	83	88
SULF1 + NHSL1 + MST1 + GTF2B + SREBF2 + GRN	[155]	78	74	72
ANXA4 + CEA	[156]	84	72	79
SEC61b + CEA	[157]	84	71	89

El hecho de que una gran cantidad de estas proteínas hayan tenido que ser descartadas para el análisis por su complejidad, así como la inexistencia actual de una firma diagnóstica mínima, subraya la necesidad de buscar nuevas estrategias para la identificación de posibles AAT, así como el desarrollo de metodologías que permitan su estudio e inclusión en herramientas diagnósticas con capacidad de ser trasladadas a la clínica.

3. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Existen diversos sistemas de expresión de proteínas que se emplean en función de la cantidad que se necesita y de los requerimientos del estudio. Entre estos sistemas, los que se emplean con mayor frecuencia son los sistemas de expresión en bacteria, los sistemas de expresión en células de insecto, los sistemas de expresión en células de mamífero y los sistemas de expresión basados en extractos de líneas celulares (sistemas de expresión *in vitro*) (Figura 8) [161-171].

Como ya se ha mencionado anteriormente, la expresión de proteínas diana de autoanticuerpos en cáncer suele ser un proceso complejo, ya que suelen ser quinasas, receptores de membrana, o bien, proteínas grandes y con numerosas modificaciones post-traduccionales. Por tanto, a la hora de diseñar nuevas metodologías para la detección de dianas de autoanticuerpos, es necesario escoger un sistema de expresión de proteínas que reúna todos estos requisitos con el menor gasto económico y de tiempo.

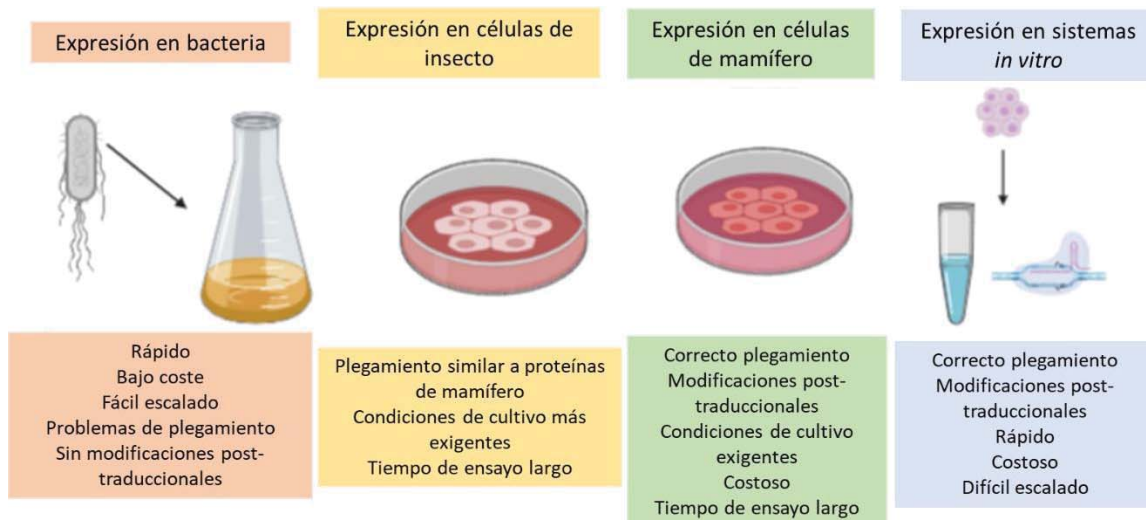


Figura 8. Sistemas de expresión de proteínas más empleados en la actualidad.

3.1. Expresión de proteínas en bacteria

La expresión de proteínas en bacteria es una de las metodologías más empleadas por su facilidad, rapidez, bajo coste y fácil escalado. Sin embargo, presenta diversas limitaciones si se requieren proteínas de sistemas eucarióticos. Cuando se expresan estas proteínas en los sistemas bacterianos, no suelen ser funcionales ya que las bacterias son incapaces de producir su correcto plegamiento proteico y modificaciones post-traduccionales. Además, debido a su complejidad, suele haber numerosos problemas con su purificación ya que pueden degradarse durante el proceso o almacenamiento o encontrarse en cuerpos de inclusión.

3.2. Expresión de proteínas en células de insecto

Para solucionar los problemas de expresión de proteínas que surgen de la expresión en bacteria (modificaciones post-traduccionales y plegamiento correcto), se pueden emplear células de insecto. Estos sistemas de expresión permiten producir modificaciones similares a las presentes en células de mamífero, por lo que las proteínas son funcionalmente similares. Se suelen emplear baculovirus que expresan las proteínas al infectar las células de insecto. Sin embargo, las condiciones de cultivo son más exigentes que los sistemas bacterianos en cuanto a su mantenimiento y tiempo de ensayo.

3.3. Expresión de proteínas en células de mamífero

Los sistemas de expresión basados en células de mamífero son los ideales a la hora de producir proteínas humanas, ya que poseen toda la maquinaria necesaria para su correcto plegamiento y modificaciones post-traduccionales que convierten a las proteínas en funcionales. Pese a las ventajas que aportan, las condiciones de cultivo son exigentes y costosas, necesitándose varias semanas para obtener cantidades relevantes de proteína.

3.4. Expresión *in vitro* de proteínas

Los sistemas de expresión *in vitro* emplean extractos de líneas celulares para la expresión de las proteínas. Estos extractos proteicos contienen la maquinaria necesaria para llevar a cabo las modificaciones post-traduccionales necesarias, así como para producir el correcto plegamiento de las proteínas, por lo que ofrecen una alternativa bastante llamativa a los sistemas de expresión proteica más convencionales ya que se pueden obtener las proteínas en cuestión de horas. De esta forma, se evita también la degradación proteica asociada a los numerosos

procesos intracelulares y de purificación y almacenamiento. Sin embargo, su bajo rendimiento y su elevado coste hacen difícil que el procedimiento se pueda escalar a niveles industriales.

La rapidez con la que este sistema de expresión proteica permite obtener las proteínas de estudio, así como el hecho de que permite obtener proteínas con sus correspondientes modificaciones post-traduccionales, lo convierten en un candidato ideal para que se acople a nuevas metodologías emergentes de detección de autoanticuerpos en los que la producción de sus dianas se produzca *in situ* para evitar problemas de degradación y almacenamiento.

4. TÉCNICAS PROTEÓMICAS

El proteoma se define como todas aquellas proteínas producidas por un organismo en un determinado estado fisiológico o patológico en un momento dado. La proteómica engloba a un conjunto de metodologías de alto rendimiento que permiten la identificación de proteínas (proteómica cualitativa), el análisis comparativo de los cambios en los niveles de expresión del conjunto de proteínas (proteómica cuantitativa), el análisis de los cambios químicos producidos en las proteínas modificando su actividad biológica (modificaciones post-traduccionales) y el análisis de las interacciones proteína-proteína [172]. Las técnicas proteómicas (como la electroforesis 2D, la espectrometría de masas y los microarrays de proteínas) buscan la identificación de proteínas y sus interacciones a nivel celular en un determinado estado fisiológico o patológico. De esta forma, permiten el estudio de la desregulación proteica que se produce en un estado patológico en comparación con el estado basal. Estas tecnologías pueden, por tanto, ser importantes a la hora de desarrollar nuevas herramientas diagnósticas e identificar nuevas dianas terapéuticas.

Dentro de la proteómica, se pueden distinguir dos ramas: la proteómica cualitativa y la proteómica cuantitativa. La proteómica cualitativa se basa en la identificación del proteoma de una muestra en un determinado estado biológico, pudiéndose analizar la presencia o ausencia de las proteínas de estudio. La proteómica cuantitativa, por otro lado, permite cuantificar las proteínas presentes en al menos una muestra de estudio comparada con una muestra de referencia. Entre dichas técnicas, se encuentran principalmente los microarrays y la espectrometría de masas, y las no tan extendidas técnicas de SERPA y SEREX, utilizadas para identificar proteínas diana de autoanticuerpos en sueros de pacientes o empleando librerías de cDNA, respectivamente (Figura 9) [173].

En un principio, los primeros estudios que se realizaron para intentar identificar el proteoma asociado al CCR se llevaron a cabo empleando geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D PAGE) y, posteriormente geles 2D DIGE, mejorándose así la sensibilidad de detección [174-176]. Sin embargo, las proteínas identificadas aparecieron en otros estudios proteómicos no relacionados con el CCR, lo que indica que no son proteínas específicas de la patología, sino del cambio que se produce en la homeostasis celular frente a alteraciones o señales de estrés [177]. Por tanto, para conocer más a fondo la desregulación proteica que ocurre de forma específica

en el CCR es necesario enriquecer las fracciones proteicas a estudiar (fraccionamiento subcelular) o emplear métodos de identificación más versátiles.

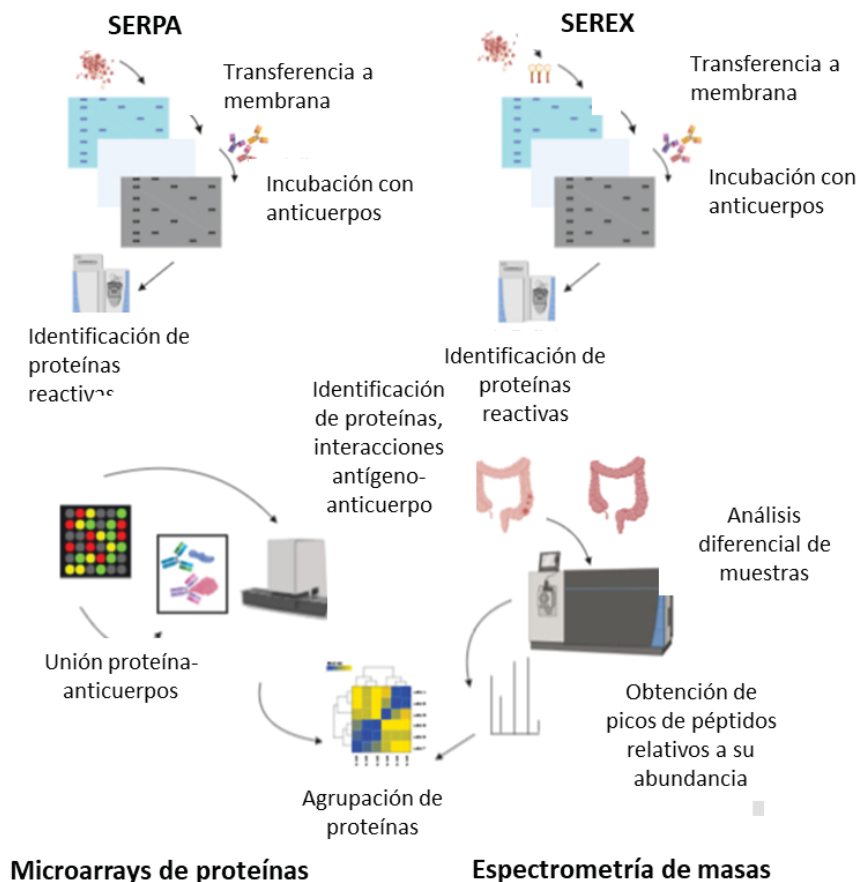


Figura 9. Esquema representativo de las cuatro técnicas más empleadas hasta la fecha para la identificación de autoanticuerpos y proteínas desreguladas en cáncer. Imagen realizada con Biorender.

En el contexto de la respuesta inmune humoral, el uso de diferentes técnicas proteómicas para la identificación de posibles autoantígenos en pacientes con cáncer ofrece numerosas ventajas. Sin embargo, dado que la respuesta inmune frente al proceso tumoral ocurre de forma limitada a determinados epítomos, no todos los pacientes de un determinado tipo de cáncer presentan autoanticuerpos frente a los mismos antígenos, como se puede evidenciar en el caso de p53. Por tanto, si se quiere emplear la respuesta inmune como herramienta diagnóstica, es necesario identificar una firma diagnóstica mínima para que el cribado de pacientes sea lo más sensible y específico posible a un determinado tipo de cáncer.

Una de las limitaciones de los estudios actuales es que la identificación de autoanticuerpos circulantes en plasma se suele llevar a cabo empleando muestras que se obtienen en el momento del diagnóstico, lo cual puede suponer un problema a la hora de identificar autoanticuerpos que aparezcan en las etapas más tempranas [131, 178, 179]. Esta limitación suele hacer necesario una validación posterior de los resultados de manera extensa empleando un elevado número de muestras obtenidas en distintos estadios. De entre las técnicas proteómicas, se ha estudiado el inmunoma mediante SERPA y se han realizado cribados serológicos empleando librerías de expresión a partir de cDNA (SEREX), microarrays de proteínas

derivados de lisados de células tumorales, microarrays recombinantes, librerías de fagos y homogeneizados tumorales [155, 160, 180-189].

4.1. SERPA

SERPA es una técnica que permite el estudio del inmunoma que combina la electroforesis 2D, el inmunoblotting y la espectrometría de masas. Las muestras de estudio se corren en los geles para transferirlas a membranas de nitrocelulosa que se incuban con los sueros de interés. Los puntos con mayor intensidad se analizan mediante espectrometría de masas para identificar aquellas proteínas más inmunoreactivas. Esta técnica permite el estudio de autoanticuerpos que reconocen proteínas con modificaciones post-traduccionales o diversas isoformas, aunque se ve altamente limitada por la baja sensibilidad y resolución de los geles 2D [190]. Sin embargo, al basarse la técnica en el uso de proteínas desnaturalizadas, éstas, así como las proteínas muy hidrofóbicas e hidrofílicas pueden no detectarse [173, 190]. Hasta la fecha, se ha empleado para identificar AATs en linfoma, carcinoma de células renales, cáncer de ovario y CCR, entre otros [191-194].

4.2. SEREX

SEREX es una técnica de alto rendimiento que permite el estudio de proteínas seroreactivas. Consiste en la inserción del cDNA de la muestra de estudio en el fago λ o T7, que se transfiere a membranas para incubarlas con sueros de pacientes. De entre las limitaciones de esta técnica, destacan la imposibilidad y la necesidad de secuenciar el cDNA de los fagos o de estudiar las modificaciones proteicas ya que únicamente pueden expresar sus proteínas en su estructura primaria [195]. Además, los AATs que se identifican suelen ser proteínas nucleares (factores de transcripción y/o proteínas de expresión ubicua) que no suelen presentar mutaciones o alteraciones en su estructura ni producir una respuesta inmune humoral lo suficientemente fuerte ni mantenida en el tiempo [196-198].

4.3. Microarrays

Los microarrays son herramientas de alto rendimiento que, en función de lo que tengan impreso, pueden emplearse para el estudio de interacciones proteicas (tales como la interacción antígeno-anticuerpo) o para comparar el proteoma de dos estados biológicos diferentes.

4.3.1. Microarrays de anticuerpos

Los microarrays de anticuerpos tienen impresos en su superficie anticuerpos monoclonales, policlonales o fragmentos de anticuerpos frente a cientos o miles de proteínas. Pueden emplearse para el estudio de la interacción anticuerpo-antígeno de forma que se identifique la disregulación proteica en diversas muestras (extracto celular, medio condicionado, muestras biológicas de pacientes, etc). Para detectar las interacciones, normalmente se marca la muestra a estudiar con fluorescencia o se utiliza un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, y la señal se detecta a través de un escáner de microarrays. Después de escanear el microarray, el análisis de los datos permite identificar aquellas proteínas que interaccionan específicamente con el anticuerpo de captura. Una de las ventajas de la tecnología de microarrays de anticuerpos es la posibilidad de detectar y monitorizar los niveles de expresión de una gran cantidad de proteínas de forma simultánea usando pequeños volúmenes de las muestras a analizar.

4.3.2. Microarrays de proteínas recombinantes

Los microarrays de proteínas recombinantes contienen impresos en su superficie miles de proteínas recombinantes humanas y se encuentran disponibles comercialmente. En cáncer, se emplean para la identificación de autoanticuerpos presentes en suero o plasma de pacientes

que reconocen las proteínas (autoantígenos) presentes en la superficie del array [151-153], teniendo como ventaja la identificación de epítomos conformacionales al reconocerse la estructura 3D de la proteína [173]. Las proteínas que contienen impresas se conocen con antelación, lo que facilita la validación posterior de aquellas que son seroreactivas. Sin embargo, al ser conocidas, limita la identificación de posibles autoantígenos que sean proteínas menos convencionales a las que se suelen incluir en los microarrays o de autoantígenos con modificaciones post-traduccionales [173]. Además, otra de las limitaciones que tienen es la necesidad de expresar y purificar las proteínas e imprimirlas, lo que convierte a los microarrays en herramientas costosas.

4.3.3. Microarrays de proteínas naturales

Los microarrays de proteínas naturales contienen impresas proteínas aisladas a partir de tumores y líneas celulares, de forma que mantienen las modificaciones post-traduccionales presentes en el modelo de estudio. De esta forma, se identifican autoanticuerpos que son reactivos únicamente a determinadas proteínas cuando han sufrido mutaciones o *splicing* alternativo. Sin embargo, al ser proteínas naturales y provenir del modelo de estudio, puede que alguna de las proteínas diana de los autoanticuerpos se encuentren en bajas concentraciones y, por tanto, no se puedan detectar en el microarray. Además, la identificación de autoantígenos es dependiente de la presencia de dichas proteínas en los sistemas modelo empleados para obtener las proteínas [173].

4.3.4. Microarrays de fagos

Los microarrays de fagos son una buena alternativa al descubrimiento de biomarcadores, ya que no hay sesgo de impresión hacia un determinado grupo de proteínas. El cDNA de una fuente biológica específica se inserta en el genoma de los fagos T7, los cuales lo despliegan en su cápside. Estos fagos se seleccionan mediante rondas de *biopanning* empleando sueros o plasmas de individuos de estudio que unen aquellos fagos que expresan las proteínas seroreactivas. Los fagos seroreactivos se imprimen en membranas de nitrocelulosa para identificar aquellos con potencial biomarcador mediante secuenciación del cDNA insertado en el genoma del fago [155, 199-201].

4.3.5. Microarrays de ácidos nucleicos programables (NAPPA)

En los microarrays tipo NAPPA, se imprimen los cDNAs codificantes para distintas proteínas en la superficie, y se traducen a proteínas empleando lisados de reticulocito mamífero. No hay necesidad de expresión y purificación, pero tienen problemas de reproducibilidad [202, 203].

4.4. Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS)

La espectrometría de masas (MS) es actualmente la técnica proteómica más versátil que se puede emplear para la búsqueda de posibles biomarcadores. En general, se considera una herramienta más útil que los microarrays de proteínas ya que puede aportar información sobre los cambios en el proteoma a nivel de abundancia de proteínas o de modificaciones post-traduccionales. Además, tiene la ventaja de poder identificar proteínas menos convencionales cuyos anticuerpos no se suelen encontrar impresos en los microarrays, aunque se ha visto que ambas técnicas son complementarias y permiten identificar distintas proteínas desreguladas.

La MS permite la identificación y cuantificación de proteínas en función de su relación masa/carga. Como paso previo a la MS, las muestras se separan mediante cromatografía en función del tipo de muestra a analizar. Los espectrómetros de masas constan de una fuente de

ionización, un analizador de masas y un detector de iones. La muestra se carga y se ioniza a través de la fuente de forma que permite que la muestra se desplace a través del dispositivo. Durante el desplazamiento de la muestra, ésta pasa por un campo magnético o eléctrico producido por el analizador, de forma que desvían su trayectoria en función de su relación masa/carga. Los iones que pasan a través del analizador llegan al detector de iones que amplifica la señal de la muestra para su identificación (Figura 10A).

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) acopla dos espectrómetros de masas. De esta forma, los iones que salen del primero se separan en el segundo en función de su relación masa/carga. Este tipo de espectrometría suele emplearse para la secuenciación de proteínas ya que los fragmentos resultantes pueden analizarse mediante programas bioinformáticos para analizar a qué proteína corresponden y pueden emplearse para realizar predicciones de secuencias enteras (Figura 10B).

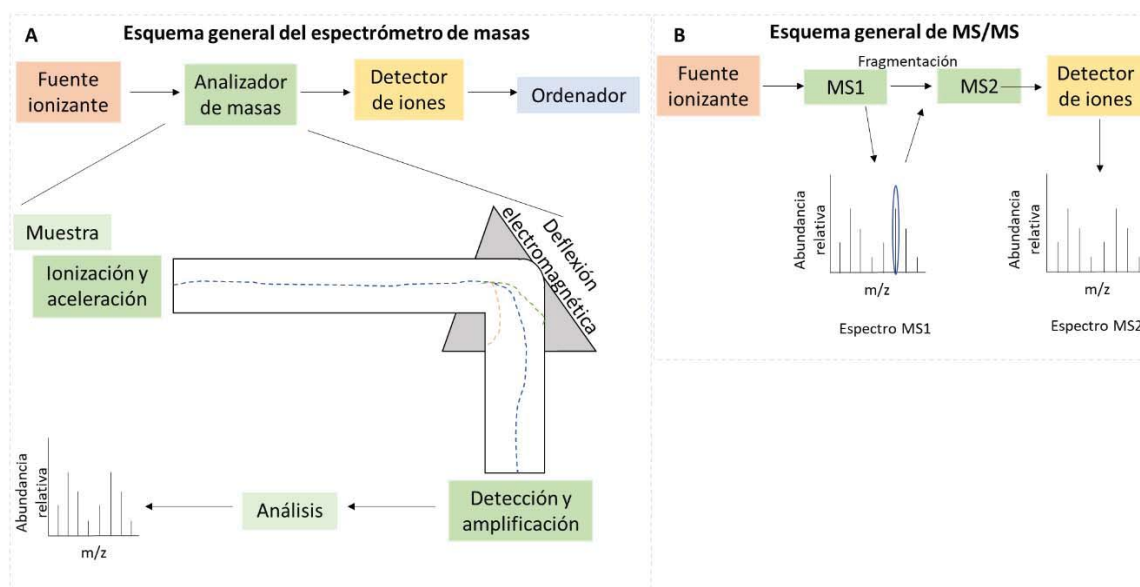


Figura 10. Esquema general de un espectrómetro de masas (A) y de la espectrometría de masas en tándem (B).

Existen numerosos espectrómetros de masas, como son los espectrómetros de masas basados en tiempo de vuelo y los espectrómetros de masas de trampa iónica cuadrupolo. Los espectrómetros de masas basados en tiempo de vuelo (*Time of Flight*; TOF) se basan en la fragmentación mínima de las muestras por la fuente de energía. Los iones se aceleran por el campo eléctrico y su velocidad (*time of flight*) depende de la relación masa/carga y se mide el tiempo que tardan en alcanzar al detector. Los espectrómetros de masas de trampa iónica, por otra parte, inyectan los iones de la muestra en la trampa para su manipulación en función del estudio (aislar iones de rango con relación masa/carga específica) mientras que el resto se expulsa. Los iones aislados se disocian en fragmentos mediante excitación de forma sucesiva. Para obtener el espectro, se extraen los iones hacia el detector. En esta Tesis Doctoral, se utilizaron el LTQ-Orbitrap Velos y el Q-Exactive. El LTQ-Orbitrap está formado por dos analizadores y una trampa iónica lineal modificada con doble detector acoplada a un analizador de masas electroestáticos (Orbitrap). El Q-Exactive es un tipo de LC-MS/MS que hace uso de la selección de iones precursores en el cuadrupolo con la detección de masa exacta de alta resolución.

Para poder cuantificar los datos obtenidos mediante MS es necesario realizar un marcaje previo de las muestras a comparar que permita visualizar los cambios que se producen en el proteoma,

de forma que la variación de intensidad de cada péptido identificado es directamente proporcional a la variación de la abundancia de dicho péptido en las muestras. Además, si no se quiere realizar ningún tipo de marcaje, se pueden utilizar estrategias *label free*, teniendo que realizarse cálculos computacionales que permitan distinguir la cantidad de péptidos presentes en cada condición a estudiar.

4.4.1. Marcaje metabólico

Un abordaje para identificar biomarcadores de una patología es el marcaje metabólico estable de aminoácidos empleando isótopos (SILAC, del inglés *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*) acoplado a LC-MS/MS. Este abordaje permite analizar el contenido proteico completo de una determinada muestra y compararlo con una de referencia [204, 205]. Además, permite su cuantificación y no se ve restringida al análisis de las proteínas que se hayan seleccionado para la metodología, como ocurre con los microarrays de anticuerpos y proteínas recombinantes.

En esta técnica, las muestras a analizar se marcan *in vitro* o *in vivo* mediante la incorporación de isótopos en las proteínas utilizando aminoácidos marcados. Cada muestra para analizar se marca con distintos isótopos y se mezclan para su análisis conjunto por LC-MS/MS ya que el marcaje no interfiere con las propiedades químicas de las moléculas. Los picos de los péptidos de las diferentes muestras pueden cuantificarse al compararse entre sí para determinar el péptido y ratio proteico.

En este marcaje, se suelen emplear lisinas y argininas marcadas que se incorporan en las proteínas sintetizadas por las células al añadirlas al medio de cultivo. De esta forma, el marcaje con SILAC en combinación con la digestión con tripsina permite comparar de dos a tres situaciones biológicas en función de los marcajes que se usen: muestras sin marcaje, muestras marcadas con $^{12}\text{C}_6\text{-Arg/Lys}$ ($^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_4\text{-Arg}$ y $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_2\text{-Lys}$) y $^{13}\text{C-Arg/Lys}$ ($^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4\text{-Arg}$ y $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2\text{-Lys}$). En combinación con la digestión con tripsina, permite marcar todos los péptidos de las muestras salvo el extremo C-terminal (Figura 11A). La cuantificación e identificación de los péptidos se hace posteriormente mediante LC-MS/MS.

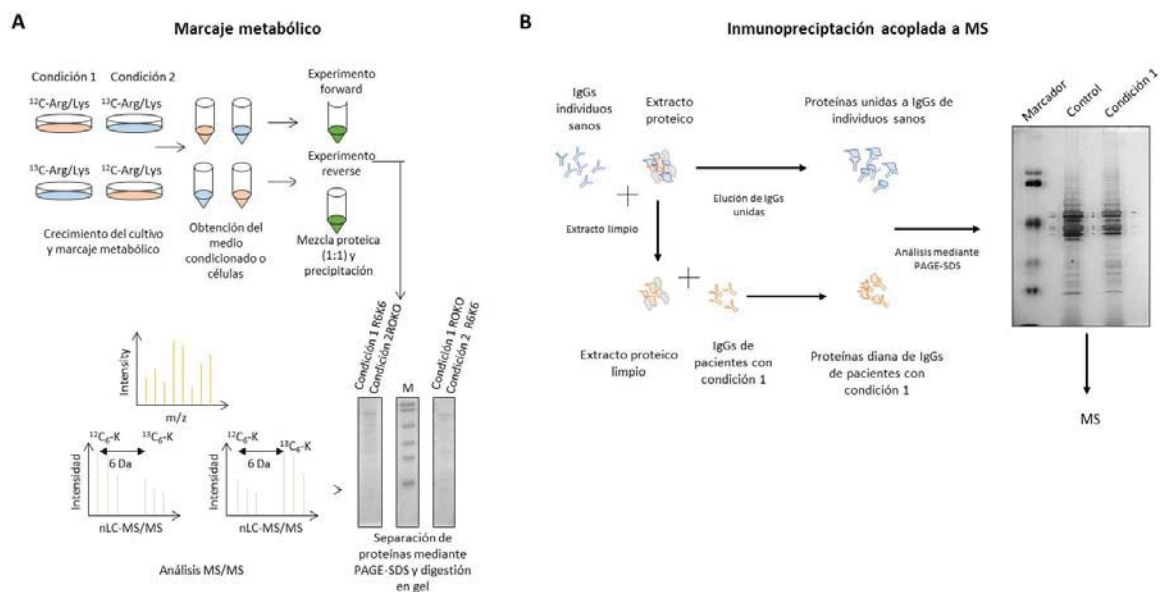


Figura 11. Esquema de trabajo utilizado para el marcaje metabólico (A) o inmunoprecipitación (B) acopladas a MS.

4.4.2. Marcaje con reactivos isobáricos

Otra estrategia que se suele seguir para el marcaje de las muestras de MS es el marcaje isobárico. Este tipo de marcaje se realiza *in vitro* y se basa en la unión covalente de reporteros químicos marcados isotópicamente que se unen directamente a los péptidos. Los reactivos constan de un grupo reportero que produce la señal, un grupo reactivo de unión al extremo N-terminal a través de los grupos amino y un grupo de balance de masas. Al ser isobáricos, el mismo péptido marcado con distintos reporteros tiene la misma masa molecular por lo que eluyen y fragmentan de manera simultánea.

El marcaje isobárico puede ser mediante *Tandem Mass Tag* (TMT) o *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification* (iTRAQ) [206-212]. Al igual que en el marcaje metabólico, los picos de intensidad detectados por el espectrómetro de masas son directamente proporcionales a la cantidad de péptido en la muestra y, gracias al marcaje diferencial de las mismas, se pueden comparar sus niveles en distintos estados fisiológicos y patológicos. Los iones marcados, que aportan información sobre la cantidad de péptidos presentes, se liberan durante el proceso de fragmentación en el espectrómetro de masas. En este proceso, se rompe el enlace entre el grupo reportero y el grupo de balance de masas, por lo que se liberan los iones reporteros monocargados de distinta masa para cada muestra marcada, lo que permite su cuantificación y comparación relativa. Mediante iTRAQ, se pueden llegar a marcar hasta 8 muestras o estados biológicos, correspondientes a un marcaje de relación masa/carga (m/z) de 113-121. Por otro lado, el TMT permite marcar hasta 16 muestras de manera simultánea, correspondiéndose a una relación m/z comprendida entre 126 y 134 [213].

4.4.3. *Label free* MS

La MS libre de marcaje requiere analizar los datos obtenidos mediante programas bioinformáticos para poder comparar la abundancia de proteínas obtenidas en cada muestra. Este tipo de metodología permite evitar alguno de los problemas asociados a las metodologías de MS con marcaje, como puede ser el tiempo de marcaje requerido, o un marcaje incompleto. Para la comparación entre muestras, se puede emplear la intensidad de los péptidos obtenidos para cada muestra o los espectros obtenidos de cada péptido (PMS). De esta forma, la primera aproximación es una medida directa, mientras que el conteo de PMS (conocido como *spectral counting*) se consideraría una medida indirecta.

Pese a que esta metodología permite evitar los problemas derivados del marcaje, las réplicas técnicas que se realizan han demostrado que no todos los péptidos se comparten entre análisis [214].

4.4.3.1. Inmunoprecipitación seguida de MS/MS

Dado que la MS es una herramienta que permite identificar diferencias en el proteoma de las muestras que se aportan, éstas pueden ser tratadas previamente mediante metodologías complementarias para el estudio de condiciones concretas. En el contexto de la respuesta inmune humoral, se puede acoplar la MS a estudios de inmunoprecipitación para identificar, dentro de un conjunto de proteínas obtenidas de distintas fuentes, aquellas que son inmunoreactivas a los anticuerpos presentes en los pacientes a estudiar [215]. Esta metodología de identificación de dianas de autoanticuerpos aporta numerosas ventajas sobre las más convencionales, ya que permite la identificación de autoanticuerpos utilizando proteínas no

desnaturalizadas. De esta forma, no se pierden los epítomos conformaciones discontinuos que son los que se han descrito como más abundantes [216].

La inmunoprecipitación consiste en emplear anticuerpos específicos para aislar sus proteínas diana dentro de un conjunto más amplio de proteínas. De esta forma si se acopla a la MS, se puede estudiar la interacción de complejos proteicos empleando un anticuerpo específico frente a una de las dianas o llevar a cabo el análisis de la respuesta inmune humoral si se inmovilizan autoanticuerpos de pacientes, de forma que quedan retenidas todas aquellas proteínas diana de autoanticuerpos (Figura 11B). En cualquier caso, los anticuerpos que se empleen han de ser lo suficientemente específicos y selectivos para evitar al máximo los falsos positivos y falsos negativos.

Una de las estrategias más comunes a seguir para la eliminación de estos falsos positivos es el *precleaning* de la muestra. Para ello, se incuban las esferas necesarias para la inmunoprecipitación (habitualmente esferas de agarosa conjugadas con proteína A o G) con los extractos a analizar, de forma que se eliminan aquellas proteínas que reaccionan de forma inespecífica con la agarosa conjugada. La muestra que se ha sometido al *precleaning* se incuba con los anticuerpos anclados a la agarosa conjugada para formar el inmunoprecipitado que se eluye y se carga en geles de poliacrilamida para su posterior digestión por tripsina o bien se digiere en solución para su análisis mediante MS/MS.

Para la identificación de falsos positivos, se suele recurrir a programas bioinformáticos que aportan información sobre resultados previos de MS. Uno de estos programas es el CRAPome (<https://www.crapome.org/>), centrado en estudios realizados en muestras de *Homo Sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*. Esta base de datos contiene información sobre las proteínas que han aparecido en distintos estudios de MS acoplados a métodos de purificación de las muestras basados en afinidad, como puede ser la inmunoprecipitación. De esta forma, atendiendo a los resultados que se han registrado previamente, se puede ver la frecuencia con la que aparece una determinada proteína en función del método empleado para así poder deducir si se trata de un falso positivo.

5. VALIDACIÓN DE RESULTADOS PROTEÓMICOS

Uno de los principales desafíos del empleo de las técnicas proteómicas es la cantidad masiva de datos que generan y que requieren validación. Una de las estrategias más comunes para la validación de los resultados de proteómica, en especial para aquellos relativos a la respuesta inmune, es a través de los inmunoensayos. Estos inmunoensayos emplean anticuerpos específicos frente a las dianas detectadas que permiten evaluar si las proteínas identificadas se encuentran en las muestras de estudio y si los resultados pueden trasladarse a una mayor cohorte de muestras.

5.1. Ensayos tipo ELISA

Entre los inmunoensayos más empleados para la validación de resultados derivados del estudio de la respuesta inmune humoral, se encuentran los ensayos tipo ELISA, que pueden ser directos,

indirectos, tipo sándwich o competitivos en función del tipo de respuesta que se quiera validar (Figura 12).

5.1.1. ELISA directo

En este tipo de inmunoensayos, se inmoviliza la muestra que contiene el antígeno a estudiar en placa o en esferas para ensayos de suspensión y se incuba con un anticuerpo primario marcado que desarrolla una señal cuantificable (colorimétrica, luminiscente...) y directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente. Es un tipo de ensayo rápido, pero con bastante fondo, y se puede emplear para evaluar la presencia de proteínas desreguladas en muestras de interés.

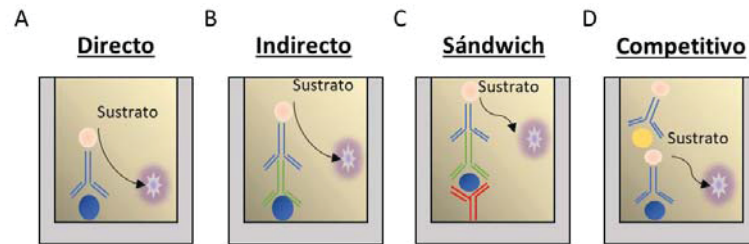


Figura 12. Tipos de inmunoensayos ELISA.

5.1.2. ELISA indirecto

El procedimiento experimental es similar al ELISA directo, pero empleando un anticuerpo primario sin marcar que es reconocido por un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente y que produce la señal cuantificable y directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente. Se emplea también para evaluar la presencia de proteínas desreguladas en las muestras de estudio.

Para el estudio de la respuesta inmune humoral, se pueden emplear sueros como anticuerpos primarios, de forma que queden retenidas aquellas IgGs que reconocen al antígeno (autoanticuerpos) y que serán posteriormente reconocidas por un anticuerpo secundario marcado que reconozca IgGs de la especie de estudio.

5.1.3. ELISA tipo sándwich

En este tipo de inmunoensayo, se inmoviliza el anticuerpo de captura en la placa o en las esferas. Este anticuerpo se incuba con la muestra que se quiere analizar, de forma que quede retenido el antígeno. Posteriormente, se incuba el complejo proteico con un anticuerpo primario de detección, que reconoce al antígeno, y con un anticuerpo secundario de detección marcado enzimáticamente que lleva a cabo la reacción cuantificable y proporcional a la cantidad de antígeno inmovilizado. El ELISA tipo sándwich se puede emplear para evaluar la cantidad de proteína diana presente en la muestra o para el estudio de la respuesta inmune humoral.

Para el estudio de la respuesta inmune humoral, se puede emplear el ELISA tipo sándwich inmovilizando el antígeno diana de los autoanticuerpos, de forma que el anticuerpo primario sean las IgGs presentes en las muestras de estudio-sueros. El anticuerpo secundario marcado enzimáticamente reconoce IgGs de la especie en evaluación, de forma que la señal que

desarrolla es directamente proporcional a la cantidad de autoanticuerpos presentes en las muestras de estudio que se han unido a las dianas inmovilizadas.

5.1.4. ELISA competitivo

El ELISA competitivo es un tipo de inmunoensayo que se emplea para evaluar la presencia de proteínas que se suelen encontrar en bajas cantidades en las muestras de estudio, siendo la señal que se obtiene inversamente proporcional a la cantidad de proteína presente. Además, puede emplearse para estudios de inhibición útiles a la hora de evaluar reactividad cruzada entre isoformas.

En estos ensayos, se incuban los antígenos de estudio con el anticuerpo primario, de forma que se forman los complejos antígeno-anticuerpo. Esta mezcla se incuba con el inhibidor inmovilizado en la superficie de estudio, que también puede unirse al anticuerpo primario. De esta forma, los complejos antígeno-anticuerpo anteriormente formados no se pueden unir a la superficie, por lo que se descartan, uniéndose únicamente los antígenos que quedaron libres en el paso anterior. Posteriormente, se incuba con un anticuerpo secundario marcado que reconoce al anticuerpo primario unido al inhibidor, desarrollando una señal cuantificable y proporcional a la cantidad de anticuerpo que quedó retenida.

5.2. Sensores electroquímicos

En cáncer, las pruebas de diagnóstico actuales suelen ser altamente invasivas y/o incómodas para los pacientes, como son las colonoscopias y mamografías. Por tanto, uno de los retos actuales en clínica es desarrollar plataformas que permitan el diagnóstico de una enfermedad con elevada especificidad y sensibilidad, en etapas tempranas y a bajo coste y en poco tiempo. Además, interesa que la prueba sea lo menos invasiva y agresiva posible y que permita un cribado poblacional correcto. En este sentido, entre otras alternativas para la validación de resultados proteómicos, como el ELISA y el Luminex, los sensores electroquímicos ofrecen una alternativa interesante como herramienta diagnóstica y de cribado debido a su rapidez, bajo coste, fiabilidad, y capacidad de multiplexado y miniaturización.

Hasta la fecha, los sensores electroquímicos se han empleado en una amplia variedad de campos gracias a su elevada versatilidad, como en el análisis alimentario, el análisis de la presencia de endotoxinas y virus y la detección y monitorización de biomarcadores tumorales [147, 186, 217-220]. En cáncer, estos inmunosensores electroquímicos han permitido evaluar la presencia de posibles marcadores tumorales previamente descritos en muestras biológicas atractivas para el diagnóstico en clínica por su fácil obtención, como el plasma de pacientes [221-223]. Esta metodología ha demostrado ser capaz de detectar la presencia de las proteínas con una gran sensibilidad y especificidad empleando un volumen mínimo de muestra y tiempo corto de ensayo. Además, se ha podido cuantificar la presencia de varias proteínas de manera simultánea, lo que podría trasladarse a la detección de una firma diagnóstica mínima basada en biomarcadores genómicos y proteómicos.

Entre todos los tipos de sensores, a la hora de evaluar la presencia de proteínas desreguladas o la respuesta inmune humoral, destacan los inmunosensores electroquímicos basados en la interacción antígeno-anticuerpo.

Para desarrollar sensores que detecten la presencia de proteínas desreguladas, se inmovilizan los anticuerpos de captura en esferas magnéticas y se incuban con las muestras a analizar, de forma que los anticuerpos inmovilizados se unen a las proteínas diana. Posteriormente, mediante la utilización de imanes y gracias a las esferas magnéticas, se separan los complejos

anticuerpo-proteína de la muestra, que se incuban con un anticuerpo secundario de detección que permite el desarrollo de una señal amperométrica cuantificable y proporcional a la cantidad de proteína presente (Figura 12).

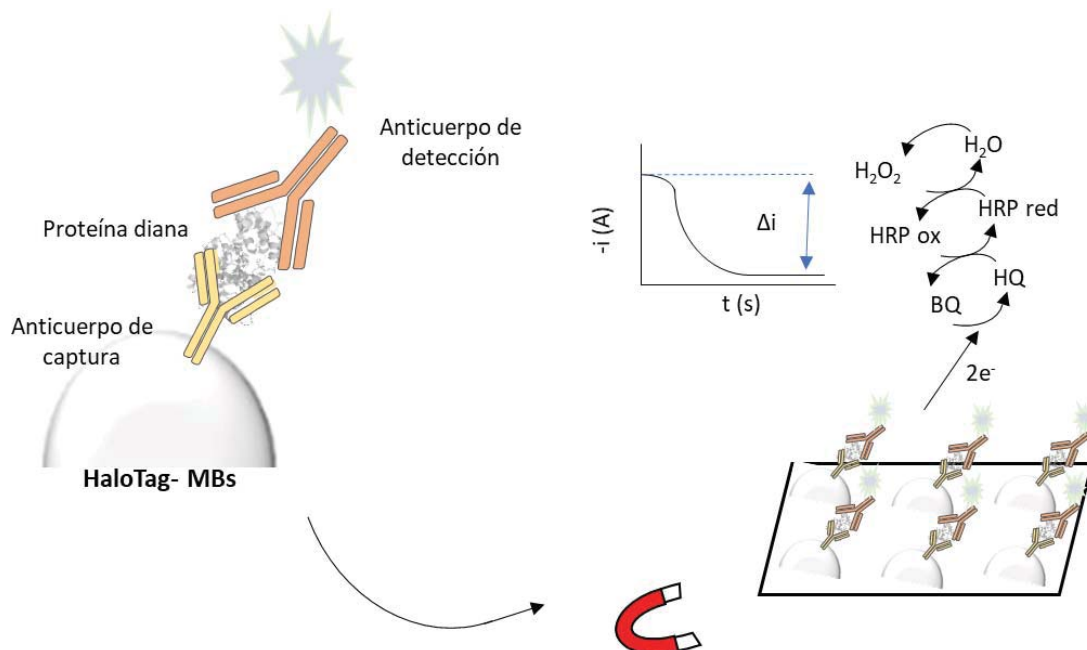


Figura 13. Esquema representativo de la estrategia seguida para la detección específica de proteínas mediante sensores electroquímicos.

6. PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS

Uno de los retos del uso de las técnicas de alta densidad como la proteómica es el manejo de los datos que se obtienen debido a su elevado volumen. Para ello, se suelen emplear programas bioinformáticos que ayuden en el cribado de los resultados y en la identificación de posibles falsos positivos. Como se ha mencionado anteriormente, la identificación de posibles falsos positivos en estudios de MS suele realizarse mediante el CRAPome. Por otro lado, el cribado inicial de los datos obtenidos libres de proteínas inespecíficas permite un análisis *in silico* para seleccionar posibles biomarcadores de la patología para su posterior validación, evitándose así la validación experimental de todos los datos obtenidos.

Para los estudios de proteómica, existen numerosos programas bioinformáticos y bases de datos (*Ingenuity Pathway Analysis*, STRING, DAVID...) que permiten analizar las interacciones existentes entre las proteínas identificadas, así como las funciones celulares en las que se ven implicadas. Por otro lado, para los estudios centrados en cáncer, existen programas y bases de datos específicos para evaluar la desregulación de las moléculas identificadas a nivel proteico y de DNA como Oncomine, cBioPortal, *Human Protein Atlas*, o UALCAN; entre otros.

6.1. Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

El IPA (www.ingenuity.com) permite el análisis, integración e interpretación de datos obtenidos a partir de experimentos ómicos. Así, mediante diferentes algoritmos y utilizando únicamente las redes de interacción publicadas hasta la fecha, se identifican relaciones, mecanismos,

funciones y vías de señalización relevantes relacionados con los cambios observados en el estudio.

6.2. STRING

El programa STRING (<http://string-db.org/>) permite obtener mapas de interacción y rutas de señalización entre las proteínas que se identifiquen en los estudios. Este programa es una base de datos que contiene las interacciones proteicas directas (físicas) e indirectas (funcionales) tanto conocidas como predichas. De esta forma, el programa agrupa las proteínas en función de sus redes de interacción con otras proteínas, obteniéndose así los mapas de interacción.

6.3. Oncomine

La base de datos Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>) contiene información obtenida a través de experimentos centrados en el estudio del cáncer en tejido empleando microarrays de DNA. De esta forma, permite analizar la expresión génica diferencial en distintos tipos tumorales comparando tejidos pareados: tejido patológico y tejido sano adyacente [224].

6.4. cBioPortal

El cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) permite el análisis multidimensional de bases de datos genómicas de cáncer [225, 226]. Aporta información sobre alteraciones a nivel génico (mutaciones, deleciones, amplificaciones, expresión aberrante de mRNA y microRNA, metilación del DNA) descritas en distintas bases de datos, como el *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), para los distintos tipos de cáncer. Además, algunas bases de datos permiten obtener información sobre desregulaciones proteicas y fosforilaciones específicas de las proteínas.

6.5. Human Protein Atlas

El *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>) permite visualizar la distribución de las proteínas humanas dentro de las células, tejidos y órganos integrando resultados obtenidos a partir de diversos estudios de alta densidad [227-229]. Dentro del programa, cuenta con seis subdivisiones con distintos enfoques: *Tissue Atlas*, *Cell Atlas*, *Pathology Atlas*, *Blood Atlas*, *Brain Atlas* y *Metabolic Atlas*.

Para los estudios de proteómica en cáncer, destacan particularmente el *Tissue*, *Cell* y *Pathology Atlas*. El *Tissue Atlas* muestra la distribución de las proteínas en tejidos y órganos, mientras que el *Cell Atlas* muestra la distribución subcelular de proteínas. El *Pathology Atlas* aporta información sobre el efecto de la proteína en la supervivencia de los pacientes con distintos tipos de cáncer, lo cual permite conocer si son marcadores de pronóstico.

6.6. UALCAN

La base de datos UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) permite el estudio *in silico* de datos obtenidos a partir de experimentos ómicos relacionados con el cáncer empleando bases de datos públicas. De esta forma, permite el estudio de desregulaciones a nivel proteico, genético y epigenético [230].

6.7. DAVID

La base de datos DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) permite profundizar en las relaciones existentes entre una lista de genes, de forma que se pueden identificar funciones biológicas comunes, relaciones funcionales entre los genes y relaciones entre los genes aportados y

diversas patologías, entre otros. Además, permite realizar agrupamientos y buscar genes con funcionalidad similar, así como identificar aquellas proteínas que interactúan entre sí.

En este contexto, el trabajo de esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio del proteoma y la respuesta inmune humoral en cáncer colorrectal mediante el uso de técnicas proteómicas y ensayos funcionales. Con ello, se ha buscado tener un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en su desarrollo y se ha identificado una firma diagnóstica temprana de la patología cuantificable mediante un sensor electroquímico fácilmente trasladable a la clínica.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha consistido en identificar y validar biomarcadores en cáncer colorrectal mediante inmunómica y proteómica para su posterior integración en plataformas diagnósticas de la patología. Para ello, se han empleado técnicas proteómicas (microarrays de anticuerpos y/o espectrometría de masas) para el estudio de la desregulación proteica asociada a la sobreexpresión de $\Delta Np73$ en líneas celulares de cáncer colorrectal y para la identificación de autoantígenos en cáncer colorrectal. Además, se ha evaluado la respuesta inmune humoral y su poder diagnóstico frente a diversas proteínas asociadas al desarrollo tumoral (proteínas de la familia p53 y fosfotirosín-fosfatasas) o previamente descritas como dianas de autoanticuerpos. Por último, los resultados se han integrado en plataformas para el diagnóstico de la patología.

Para llevar a cabo todo el estudio, el trabajo se dividió en 2 bloques:

Bloque 1: Identificación y validación funcional de biomarcadores en cáncer colorrectal mediante técnicas proteómicas.

- Identificación de proteínas desreguladas debido a la sobreexpresión de $\Delta Np73$ (proteína de la familia p53) mediante proteómica cuantitativa (SILAC y microarrays de anticuerpos).
- Identificación de autoantígenos en cáncer colorrectal mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masas.

Bloque 2: Estudio de la respuesta inmune humoral en cáncer colorrectal como elemento diagnóstico y validación de posibles plataformas diagnósticas.

- Estudio de la seroreactividad diferencial frente a las isoformas de $\Delta Np73$ y evaluación de su papel diagnóstico.
- Estudio de la respuesta inmune humoral frente a PTPRN en cáncer colorrectal y su relación con el proceso tumorigénico.
- Desarrollo de plataformas diagnósticas que permitan la expresión e inmovilización de autoantígenos difíciles de expresar y desarrollo de metodologías multiplexadas para la detección del cáncer colorrectal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PLASMA Y SUEROS

En esta Tesis Doctoral se han empleado plasmas de pacientes con CCR, individuos con lesiones de colon premalignas (adenoma de bajo y alto grado), cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, e individuos control (asintomáticos e individuos sanos con colonoscopia negativa). Con el fin de anonimizar las muestras, se asignó a las muestras en cada estudio un código de referencia distinto. Las tablas con toda la información de las muestras empleadas para cada bloque se encuentran en el material suplementario de esta Tesis Doctoral y en el material suplementario de los artículos. Las muestras de plasma se obtuvieron de los biobancos del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), del Hospital La Paz (IdiPAZ) y del Instituto IMDEA de Alimentación (plataforma Genyal). Además, en todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y la aprobación los respectivos Comités Éticos para el estudio de la búsqueda de biomarcadores en CCR y su validación (CEI PI 45): el Comité Institucional de Ética del IdISSC del Hospital Clínico San Carlos, del Hospital La Paz y del Instituto de Salud Carlos III y la Universidad Autónoma de Madrid. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su uso [153-155, 218]. Las muestras de plasmas de pacientes con cáncer de mama y pulmón, con cáncer de ovario, y de pacientes diabéticos fueron cedidas por Jordi Camps y Maritxell Arenas, Luis San Frutos, y Custodia García, respectivamente, siguiendo todas las normativas y preceptos legales.

1.1. Plasmas empleados en el estudio de la desregulación proteica mediada por ΔNp73

Para evaluar la presencia de las proteínas identificadas como desreguladas debido a la sobreexpresión de ΔNp73 , se obtuvieron muestras de plasma del Biobanco IdISSC del Hospital Clínico San Carlos (Madrid, España) y del Hospital La Paz (IdiPAZ). En total, se emplearon 60 plasmas de pacientes con CCR, individuos premalignos de CCR (individuos en la unidad de alto riesgo de desarrollo de CCR por antecedentes familiares y adenomas de alto y bajo grado) e individuos control (individuos sanos con colonoscopia negativa) (Tabla 3). Las muestras se guardaron a -80°C hasta su uso [153-155, 218].

Tabla 3. Resumen de los plasmas empleados para el estudio de la desregulación proteica mediada por ΔNp73 .

Grupo		Muestras (hombre/mujer)	Edad (años; mediana $\pm$ desviación estándar)
Control		6/14	61 $\pm$ 23
Premalignos	Patológico	11/6	59 $\pm$ 6
CCR		11/9	72 $\pm$ 10

1.2. Plasmas empleados en la búsqueda de autoantígenos de CCR mediante IP acoplada a LC-MS/MS

Para el análisis de la seroreactividad, se emplearon 32 plasmas de pacientes de CCR, 18 plasmas de pacientes premalignos (adenomas de bajo o alto grado) y 30 plasmas de individuos control (individuos asintomáticos e individuos con colonoscopia negativa o individuos con FOBT positiva y colonoscopia negativa) (Tabla 4).

Tabla 4. Lista de plasmas empleada para la identificación de dianas de autoanticuerpos mediante inmunoprecipitación seguida de MS.

Fase de Identificación		
Grupo	Muestras (hombre/mujer)	Edad (años; mediana $\pm$ desviación estándar)
CCR (estadío III)	3/0	79 $\pm$ 5
CCR (estadío IV)	1/4	68 $\pm$ 5
Control	3/5	41 $\pm$ 4
Fase de Validación		
Grupo	Muestras (hombre/mujer)	Edad (años; mediana $\pm$ desviación estándar)
CCR	15/17	66 $\pm$ 12
Premalignos	12/6	59 $\pm$ 7
Control	12/18	51 $\pm$ 10

1.3. Plasmas empleados en el análisis de la presencia de autoanticuerpos frente a p73 y sus isoformas

Para el análisis de la presencia de autoanticuerpos específicos a p73 y sus isoformas en pacientes con cáncer, se evaluó un panel de 145 plasmas de pacientes de CCR, individuos premalignos (adenoma de alto y bajo grado) e individuos sanos control (individuos sanos e individuos positivos a FOBT con colonoscopia negativa) (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los plasmas empleados para el estudio de la seroreactividad diferencial a p73 y sus isoformas.

Grupo		Muestras (hombre/mujer)	Edad (años; mediana $\pm$ desviación estándar)
Control	Asintomáticos	12/29	46 $\pm$ 7
	Colonoscopia negativa	10/17	55 $\pm$ 10
Premaligno		16/18	60 $\pm$ 7
CCR	Estadíos I y II	7/7	75 $\pm$ 9
	Estadío III	8/3	75 $\pm$ 10
	Estadío IV	6/12	66 $\pm$ 12

1.4. Plasmas empleados para la evaluación de la seroreactividad a PTPRN y sus dominios intra- y extracelular

Para el estudio de la presencia de autoanticuerpos frente a PTPRN y sus dominios, se emplearon 10 muestras de pacientes con CCR, 10 muestras de individuos control, 10 muestras de individuos con diabetes y 8 muestras de individuos con CCR y diabetes (Tabla 6).

Tabla 6. Plasmas empleados para la evaluación de la seroreactividad frente a PTPRN y sus dominios.

Grupo	Muestras (hombre/mujer)	Edad (años; mediana $\pm$ desviación estándar)
Control	4/6	44 $\pm$ 11
Diabéticos	7/3	65 $\pm$ 12
CCR	6/4	70 $\pm$ 12
CCR y diabéticos	5/3	65 $\pm$ 8

1.5. Plasmas empleados en la puesta a punto de un sensor electroquímico para la detección de autoanticuerpos frente a p53

En el estudio, se incluyeron un total de 62 individuos pertenecientes a la unidad de seguimiento del Hospital Clínico San Carlos por su elevado riesgo de desarrollo de CCR (antecedentes familiares sin relación a una enfermedad hereditaria y prueba FOBT positiva) (Tabla 7). En todos los casos, se obtuvieron 1 ó 2 muestras de tejido distintas de los pacientes para su análisis en la unidad de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. Todas las muestras se obtuvieron entre junio 2015 y marzo 2016, antes de empezar ningún tratamiento a los pacientes. Además, se utilizaron 4 muestras de pacientes de CCR y 2 muestras de pacientes con cáncer de ovario del Hospital La Paz (Madrid) y del Hospital Puerta de Hierro (Madrid).

Tabla 7. Datos de los plasmas empleados para el desarrollo del sensor electroquímico capaz de detectar autoanticuerpos frente a p53.

Grupo	Muestras (hombre/mujer)	Edad (años; mediana $\pm$ desviación estándar)
Individuos en la unidad de seguimiento	29/33	60 $\pm$ 7
CCR	3/1	57 $\pm$ 5
Cáncer de ovario	0/2	-

1.6. Plasmas empleados en la evaluación del potencial diagnóstico de autoantígenos difíciles de expresar y desarrollo de un inmunosensor electroquímico para su detección

Para el estudio de la capacidad diagnóstica de autoanticuerpos frente a autoantígenos difíciles y fáciles de expresar, se emplearon 125 muestras de pacientes de CCR, individuos premalignos (adenomas de bajo y alto grado) e individuos control (individuos sanos asintomáticos, individuos con colonoscopia y FOBT negativas y pacientes con cáncer de pulmón y mama) (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de los plasmas empleados para la evaluación del potencial diagnóstico de una firma de 8 autoanticuerpos frente a CCR y desarrollo del sensor electroquímico para su detección.

Grupo	Muestras (hombre/mujer)	Edad (años; mediana $\pm$ desviación estándar)
Control	Colonoscopia negativa/asintomáticos	42 $\pm$ 7
	Otros cánceres	64 $\pm$ 12
Patológico	Premalignos	60 $\pm$ 7
	CCR	69 $\pm$ 11

2. MUESTRAS DE TEJIDO

En los estudios de evaluación de la seroreactividad específica a las isoformas de p73, se emplearon tejidos de pacientes de CCR, individuos premalignos (adenoma de alto y bajo grado) y controles con el fin de determinar mediante qPCR si Δ Np73 era mejor marcador pronóstico que TAp73 en cáncer colorrectal. Estos tejidos correspondían a individuos cuyos plasmas se usaron en el estudio.

Las muestras de tejido se analizaron mediante histopatología y se obtuvieron del Biobanco IdISCC e IdIPAZ, pertenecientes a la red Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III cofinanciada con fondos FEDER. Las muestras se obtuvieron entre junio de 2015 y marzo de 2016 antes de que los pacientes empezasen ningún tratamiento.

3. LÍNEAS CELULARES

3.1. HCT116

El estudio de la desregulación proteica en CCR mediada por la sobreexpresión de Δ Np73 se llevó a cabo empleando la línea celular de cáncer de colon HCT116, obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC®).

Para obtener líneas HCT116 control o con sobreexpresión de Δ Np73 estable, las células se transfectaron con los plásmidos pEF1 α -IRES-GFP (plásmido vacío) o pEF1 α - Δ Np73 β -IRES-GFP (plásmido de expresión de Δ Np73) cedidos por la Dra. Marín y el Dr. Marqués (Instituto de Biomedicina, Universidad de León, España) empleando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Tras la transfección, y pasadas varias semanas, se seleccionaron las células con sobreexpresión de Δ Np73 mediante *sorter* empleando GFP como marcador de selección.

Las células HCT116 se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Corning) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS; Corning), 2 mM L-glutamina (Gibco), 1% Penicilina/estreptomicina (P/S; Corning) y 0.25 μ g/ μ l de amfotericina B (Corning) a 37°C y 5% de CO₂.

3.2. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) y *Human Lymphatic Endothelial Cells* (HLEC)

Para los estudios de angiogénesis y linfangiogénesis derivados de los resultados de la desregulación proteica mediada por la sobreexpresión de Δ Np73 en CCR se emplearon las líneas HUVEC y HLEC, obtenidas de Innoprot.

Las células HUVEC se cultivaron en medio celular endotelial (ECM; Innoprot) suplementado con 5% de FBS inactivado; 1% de suplemento de crecimiento endotelial (ECGS) y 1% de P/S. Las células HLEC se cultivaron en placas recubiertas de fibronectina y medio ECM suplementado de la misma manera que el medio ECM de las células HUVEC. Los experimentos realizados con las células HUVEC y HLEC se llevaron a cabo entre los pases 2-6.

3.3. SW480, SW620, KM12C y KM12SM

La línea celular SW480 epitelial tumorigénica de carcinoma colorrectal humano con inestabilidad de microsatélites es poco metastática. La línea celular SW620 se obtuvo del nódulo linfático del mismo paciente del que se obtuvo la línea celular SW480 [231-233]. La línea KM12C es una línea celular epitelial derivada de un carcinoma colorrectal humano con poca capacidad metastática. Presenta inestabilidad de microsatélites y de cromosomas. La línea celular KM12SM altamente metastática hacia hígado presenta también inestabilidad de microsatélites y cromosómica [234].

Las líneas celulares SW480 y SW620 se obtuvieron de la ATCC. Las células KM12C y KM12SM se obtuvieron del I. Fidler's laboratory (MD Anderson Cancer Center). Para crecerlas y mantenerlas, se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% FBS inactivado, L-Glutamina y P/S a 37°C y 5% CO₂. Las cuatro líneas celulares se emplearon para la inmunoprecipitación de autoantígenos de cáncer colorrectal. Además, las líneas celulares KM12C y KM12SM se emplearon para los ensayos de silenciamiento de PTPRN.

4. EXTRACCIÓN DE RNA

En esta Tesis Doctoral, se extrajo RNA de células para evaluar la expresión génica de distintos marcadores mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semi-cuantitativa y cuantitativa (qPCR).

4.1. Extracción de RNA de extractos celulares

Para la extracción de RNA de extractos celulares se combinó el uso de TRIzol (Life Technologies) con RNeasy Mini Kit (Qiagen). Brevemente, se levantaron las células (5×10^7) con tripsina-EDTA (Gibco) o con tampón fosfato salino (PBS; 0.8% NaCl (p/v), 0.02% KCl (p/v), 0.02% KH_2PO_4 (p/v) y 0.3% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (p/v), pH 7.3)- 4 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se obtuvo el pellet de las células a estudiar mediante centrifugación de 5 min a 1000 rpm. El uso de Tripsina o PBS-EDTA dependió de la finalidad del estudio. De esta forma, si se emplea para evaluar la presencia de proteínas de membrana (estudios de silenciamiento de PTPRN), se requiere PBS-EDTA ya que no las fragmenta.

Una vez se obtuvo el pellet, se resuspendió en 1 ml de TRIzol que se utilizó para homogeneizar la muestra mediante pipeteo. El TRIzol es un compuesto ácido que permite el homogeneizado de la muestra y contiene isotiocianato de guanidina junto con fenol. El isotiocianato de guanidina produce la desnaturalización de proteínas, mientras que el fenol, al ser un compuesto orgánico produce la separación de fases. Además, al aportar un pH ácido, permite la separación del RNA del DNA. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente en el que el TRIzol ejerce su función, se añadieron 200 μl de cloroformo para ayudar a formar la separación de fases ya que su diferencia de densidad con respecto al agua es mucho mayor que la del fenol. Se agitó la muestra y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente antes de centrifugar a 12000 g durante 5 min a 4°C. De esta forma se obtuvieron tres fases: una fase inferior (orgánica) en la que se encuentran los lípidos y DNA, una interfase que contiene proteínas y una fase superior (acuosa) que contiene RNA. La fase superior acuosa se transfiere a un nuevo tubo libre de RNAsas y se le añadieron 0.5 volúmenes de etanol. Tras su agitación, se cargaron en las columnas de aislamiento y purificación del *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Tras su centrifugación, se eliminó el eluido y se lavaron las columnas con los tampones de lavado comerciales siguiendo sus indicaciones. Para la obtención del RNA, primero se secaron las columnas por completo mediante centrifugación a temperatura ambiente y 12000 g durante 2 min y, posteriormente, se eluyó el RNA mediante dos centrifugaciones consecutivas con 50 μl de agua DEPC. El RNA que se obtiene se cuantificó en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

5. SÍNTESIS DE cDNA

Se sintetizó cDNA a partir del RNA de las muestras de estudio para poder llevar a cabo estudios de expresión génica. El cDNA de las muestras se sintetizó a partir del RNA total utilizando dos kits: *SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen) y *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYtech).

5.1. *SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen)

El *SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen) se empleó para la síntesis de cDNA de los estudios de microarrays de proteínas y SILAC. Para ello, se preparó la mezcla RNA/cebador para 1 μg de muestra añadiendo el volumen de muestra correspondiente a 1 μl de oligo(dT)20 50 μM , 2.5 μl de mezcla dNTP 10 mM y H_2O tratada con DEPC hasta 25 μl . Las muestras se incubaron durante 5 min a 65°C y se transfirieron inmediatamente a 55°C. Mientras tanto, se preparó la mezcla para la síntesis de cDNA mezclando 3 μl de H_2O tratada con DEPC, 5 μl de tampón RT 10x, 10 μl de MgCl_2 25 mM, 5 μl de DTT 0.1 mM, 1 μl *RNAse out* y 1 μl de SuperScript III. Se calentó la muestra a 55°C y se añadieron 25 μl a cada tubo de RNA/cebador, incubándose durante 50 min a 55°C. Pasado este tiempo, se pararon las reacciones a 85°C durante 5 min y se dejaron reposar en hielo. Se les añadió 1 μl de RNasa H y se incubaron durante 20 min a 37°C antes de su uso o su almacenamiento a -80°C.

5.2. NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYtech)

El kit de síntesis de cDNA *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYtech) se empleó para obtener cDNA a partir del RNA de las líneas celulares. Para ello, se siguieron las instrucciones de la casa comercial. Brevemente y por reacción: en hielo se añadieron 10 µl de *NZYRT 2× Master Mix*, 2 µl de *NZYRT Enzyme Mix*, la cantidad de RNA deseada y H₂O DEPC (H₂O_{mq} agitada a 37°C durante 4 h y autoclavada durante 20 min) hasta 20 µl. Se incubó la mezcla a 25°C durante 10 min para una posterior incubación a 50°C durante 30 min. Finalmente, se inactivó la reacción dejándola durante 5 min a 98°C antes de enfriarla en hielo. Posteriormente, se añadió 1 µL de *NZY RNase H* y se incubó a 37°C durante 20 min.

6. GELES DE AGAROSA PARA VISUALIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1. Geles de agarosa para la comprobación de la integridad del RNA y la visualización de muestras de DNA

Para comprobar la integridad del RNA obtenido, se prepararon geles de agarosa al 1% (peso/volumen (p/v)) en Tris-Acetato EDTA (TAE; 40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.5) 1x y se tiñeron con GelRed (Biotium). En los geles, se cargó 1 µg de muestra y se corrieron a 100 V durante 45 min antes de visualizar las bandas empleando el revelador de geles *UVP UVsolo touch* (Analutikjena).

Para comprobar el correcto tamaño de los vectores de expresión empleados en el estudio y su concentración, se cargaron 200 ng de los vectores diluidos en H₂O_{mq} y 2 µl de tampón de carga SAB 6x (azul de xilencianol 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v)) en geles de agarosa al 0.7-1% (p/v) en TAE 1x y teñidos con GelRed. Los geles se corrieron a 100 V durante 45 min antes de visualizar las bandas en un equipo *UVP UVsolo touch* (Analutikjena).

Los fragmentos procedentes de reacciones de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%-2% (p/v) en TAE 1x y teñidos con GelRed. A los tubos de PCR se les añadió 4 µl de tampón de carga SAB 6x (azul de xilencianol 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v)). El gel se corrió a 100 V durante 45 min antes de visualizar las bandas para su posterior cuantificación mediante el programa *Quantity One* (BioRad). Como control interno se empleó GAPDH.

7. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR

Para la purificación de los productos de PCR (*ver apartado 24.1*), se siguieron dos estrategias de trabajo. En el caso de que mediante PCR se obtuviese una única banda, se empleó el kit *Wizard PCR Preps DNA Purification System*. Si se observaron varios fragmentos, se purificó el fragmento de interés de geles de agarosa de bajo punto de fusión. Los geles se corrieron a 4°C durante 2 h y 80 V hasta que se produjo una amplia separación de las bandas para su purificación mediante el *Wizard PCR Preps DNA Purification System*.

8. LISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

Para obtener el extracto proteico de las células estudiadas en esta Tesis Doctoral, las células se levantaron con PBS-EDTA 4 mM y se centrifugaron 5 min a 250 g. El pellet que se obtuvo se lisó empleando el tampón RIPA comercial (Sigma Aldrich) o preparado en el laboratorio (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v) (Sigma Aldrich), 0.1% SDS (v/v) (Merck) y 0.1% desoxicolato sódico al 0.1% (v/v) (Sigma Aldrich), pH 7.35) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa diluidos 1:100 (Medchemexpress).

9. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON METANOL-CLOROFORMO

Para la precipitación de proteínas mediante metanol-cloroformo, se partió de un volumen de 100 µl de muestra al que se le añadieron 400 µl de metanol. Tras su agitación en un vórtex, se añadieron 100 µl de cloroformo y se volvió a agitar la muestra antes de añadir 300 µl de H₂O_{mg}. Tras una nueva agitación, la muestra se centrifuga durante 2 min a 12000 g. De esta forma, aparecen tres capas, encontrándose las proteínas en la interfase ya que los residuos hidrofílicos se exponen hacia la capa superior (acuosa) y los hidrofóbicos hacia la inferior (orgánica). Se eliminó la capa superior acuosa y se añadieron 400 µl de metanol. Se agitó la muestra y se centrifugó durante 3 min a 12000 g. Se eliminó el metanol teniendo especial cuidado en no tocar el pellet. Se secó por completo la muestra mediante Speed-Vac.

10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

10.1. Determinación de la concentración de extractos proteicos

La concentración de las muestras proteicas se determinó mediante dos métodos. Por un lado, se empleó el método basado en la reacción colorimétrica del ácido bicinónico (BCA) empleando el kit comercial *Pierce BCA protein assay kit* (Thermo Fisher Scientific), o bien se empleó el método del triptófano (Trp) [235-237].

Para comprobar una correcta cuantificación de la concentración proteica e integridad de la muestra, se cargaron 10-20 µg de todas las muestras en geles 1D de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) para su posterior tinción con Azul de Coomassie o inmunodetección tras transferencia a membrana de nitrocelulosa utilizando anticuerpos frente a las proteínas de carga (*apartados 11 y 12*).

10.2. Determinación de la concentración de proteínas puras

La concentración de las proteínas puras se calculó obteniendo un espectro de absorbancia de la muestra desde 240 nm a 350 nm empleando el espectrofotómetro Beckman DU-7 y una cubeta de cuarzo con paso óptico de 1 cm. Con esta información, y haciendo uso de la ecuación de Lambert-Beer se calculó la concentración (C) de las muestras tomándose la absorbancia a 280 nm (longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos y sus cadenas laterales):

$$A = E^{0.1\%} \times C \times l$$

Siendo, $E^{0.1\%}$ el coeficiente de extinción molar al 0.1% (equivalente al valor de absorbancia de la muestra cuando se encuentra a 1 g/l (0.1% p/v) y se utiliza una cubeta de paso óptico (l) de 1 cm). Se utilizó el $E^{0.1\%}$ calculado con el programa *ExPASy Prot Param tool* [238]).

11. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (PAGE-SDS)

Para el análisis de las muestras de origen proteico se realizaron electroforesis en geles PAGE-SDS a distintas concentraciones de acrilamida del gel separador en función del tamaño de las proteínas de interés. Las electroforesis se realizaron en discontinuo [239, 240]. Los geles y la electroforesis se llevaron a cabo utilizando el sistema Mini-Protean III (Bio-Rad). Los geles presentaban un espesor de 0.75 mm aplicando primero el gel separador y, tras su polimerización, se preparó el gel concentrante a un porcentaje de acrilamida del 4%. Una vez polimerizado por completo, se sumergieron los geles en tampón de electroforesis (25 mM Tris pH 8.4, 0.14% glicina (p/v) 0.1% SDS (p/v)) y se cargaron 10-25 µg de muestra previamente diluidas en tampón de aplicación (50 mM Tris-HCl 50, pH 6.8, 10% glicerol (v/v), 0.01% azul de bromofenol (p/v) y 0.1% SDS (p/v)) con β-mercaptoetanol al 0.5% (v/v) y calentadas a 95°C

durante 15 min. A la cubeta se le aplicó una corriente de 25 mA por gel hasta que el azul de bromofenol presente en el tampón de aplicación de las muestras saliese del gel. Tras la electroforesis, se tiñeron los geles con una solución de azul de Coomassie R-250 (0.25% de Brilliant Blue R-250 (p/v), 45% de metanol (v/v) y 9% de ácido acético glacial) durante 10 min para poder visualizar las proteínas de la muestra tras varios lavados con solución de desteñido (7.5% de ácido acético glacial (v/v)). Alternativamente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la inmunodetección de proteínas.

En el caso de geles PAGE-SDS para su posterior análisis mediante proteómica tras digestión con tripsina de las bandas del gel, la tinción se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C y agitación con azul de Coomassie coloidal (para 500 ml: 10% (p/v) de sulfato amónico, 20% (p/v) etanol 100%, 0.04% (p/v) azul de Coomassie G-250, 3% (v/v) de ácido ortofosfórico, H₂O_{mq} hasta 500 ml) para su posterior desteñido con sucesivos lavados de H₂O_{mq}.

Para visualizar el contenido proteico aislado mediante la IP utilizando tinción con plata, las proteínas separadas en un gel PAGE-SDS se fijaron incubando dicho gel durante 1 h o 16 h con 12% ácido acético (v/v), 50% metanol (v/v) y 0.05% de 37% de formaldehído (v/v). Se lavó el gel con tres lavados de 20 min con 50% de etanol (v/v). Posteriormente, se añadió 0.2 g/l de tiosulfato sódico al gel durante 1 min y agitación y se lavó tres veces durante 20 s con H₂O_{mq}. Después, se incubó el gel con 0.2% de nitrato de plata (p/v) y 0.075% de 37% de formaldehído durante 20 min y agitación. Se volvió a lavar el gel dos veces con H₂O_{mq} durante 20 s y agitación y se desarrolló la tinción añadiendo 6% carbonato sódico (p/v) y 0.05% (v/v) de formaldehído al 37% en agitación y durante un máximo de 10 min. La reacción se paró con tres lavados de H₂O_{mq} y añadiendo una disolución de 12% ácido acético (v/v), 50% metanol (v/v). La tinción se fijó mediante incubación durante 20 min con 50% metanol (v/v).

12. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT Y DOT BLOT)

La inmunodetección de proteínas permite determinar su presencia en una determinada muestra, así como comparar sus niveles con otras muestras de estudio. En esta Tesis Doctoral, se han llevado a cabo estudios mediante *Western Blot* (WB) y dot blot.

Las membranas de WB se obtienen a partir de la transferencia de proteínas de muestras cargadas y separadas en geles PAGE-SDS, como se ha mencionado anteriormente. Para ello, tras correr el gel, se procede a realizar la transferencia de proteínas empleado los equipos de BioRad. La transferencia puede realizarse en semi-húmedo y húmedo, habiéndose utilizado ambas metodologías en este trabajo [241, 242]. En ambos casos, se equilibran las membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra, GE Healthcare) sobre las que se transfieren las proteínas, papeles Whatman y esponjas en el caso de las transferencias en húmedo en tampón de transferencia (48 mM Tris, 0.0375% SDS (p/v), 39 mM glicina y 20% metanol (v/v)) junto con el gel para su equilibrado. A la hora de montar la transferencia, hay que prestar atención a la situación de los electrodos. Dado que las proteínas se encuentran cargadas negativamente por la acción del SDS, el gel y la membrana se deberán colocar de forma que las proteínas migren en la dirección de la membrana. En el caso de las transferencias en húmedo, se cubrió la cubeta de tampón de transferencia. La transferencia se lleva a cabo durante 90 min a 100 V.

Por otra parte, para el análisis mediante dot-blot, las muestras se cargan directamente sobre la membrana de nitrocelulosa empleando un soporte de 96 pocillos (BioRad) mientras se conecta una bomba de vacío para optimizar su absorción a la membrana.

Una vez se tienen las muestras a analizar inmovilizadas en las membranas, se procede a su bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente empleando 3% leche en PBS (p/v) con 0.1% Tween 20 (PBST) (v/v) o 3% de albúmina de suero bovino (BSA) (p/v) en 0.1% de PBST (v/v) para los anticuerpos biotinilados para evitar la unión de la estreptavidina a la biotina de la leche. Tras el bloqueo, se incuban las membranas toda la noche a 4°C con los anticuerpos de estudio. La concentración de los anticuerpos varía en función de su sensibilidad y tipo de ensayo (Tabla 9). Tras esta incubación, se lavan las membranas con PBST 0.1% (v/v) de manera extensa y, si el anticuerpo primario no está marcado, se incuban 1 h a temperatura ambiente con su anticuerpo secundario a las concentraciones indicadas en la Tabla 9. Tras esta incubación, se vuelven a lavar las membranas con PBST y las proteínas reactivas se visualizan empleando los siguientes reactivos de revelado en función de las necesidades: *SuperSignal West Pico Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific) y *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific). Estos reactivos hacen uso del luminol, de forma que al interactuar con la HRP conjugada al anticuerpo secundario (o primario si se encuentra marcado), se desarrolla una señal luminiscente que se puede detectar en los equipos *Amersham Imager 680* (GE Healthcare) y *Fujifilm LAS-3000 Imager* (Fujifilm). Las bandas se cuantificaron y densitometraron empleando el programa *Quantity One* (BioRad) y usando RhoGDi o actina como control de carga.

En esta Tesis Doctoral, se hizo uso de la inmunodetección de proteínas para evaluar la presencia de autoantígenos identificados mediante técnicas proteómicas (*ver apartado 26*) en distintas muestras y para evaluar la correcta expresión de las proteínas necesarias para llevar a cabo los inmunoensayos (*ver apartado 10*). Además, se usó para determinar si la concentración de proteínas de las muestras estaba bien cuantificada.

13. MODELADO *IN SILICO* DE LAS PROTEÍNAS

Para el estudio de la seroreactividad diferencial de p73 y sus isoformas $\Delta\text{Np73}\alpha$ y $\Delta\text{Np73}\beta$, primero se modelaron las proteínas empleando programas informáticos con el fin de evaluar si las diferencias a nivel estructural podían dar lugar a un reconocimiento antigénico distinto. Para ello, se generaron modelos estructurales en formato PDB empleando el programa Phyre. Las estructuras finales en 3D se obtuvieron con el programa PyMOL (Schrödinger). El potencial electrostático de superficie se predijo con el programa *Adaptive Poisson Boltzmann Solver* (APBS).

14. OBTENCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO DE CÉLULAS HCT116- ΔNp73 Y HCT116-CONTROL

Para obtener el medio condicionado, se sembraron 6×10^5 células HCT116- ΔNp73 y HCT116-control en placas de 100 mm con DMEM. A las 6-8 h, se cambió el medio por 10 ml de ECM. El medio condicionado se obtuvo a las 72 h y se centrifugó a 1500 rpm durante 6 min para sedimentar las células y restos celulares del medio.

15. MARCAJE DEL CONTENIDO PROTEICO DEL SECRETOMA DE LAS CÉLULAS HCT116 E HIBRIDACIÓN CON MICROARRAYS DE ANTICUERPOS

Para la búsqueda de posibles proteínas alteradas en CCR mediada por la sobreexpresión de ΔNp73 , se emplearon los microarrays de anticuerpos *RayBio Label-Based (L-series) Human Antibody Arrays 493* (RayBioTech). Estos microarrays están compuestos por dos subarrays idénticos, de forma que en un único microarray se evalúa el secretoma de las células HCT116-control y el secretoma de las células HCT116 con sobreexpresión de ΔNp73 . Estos subarrays tienen impresos, por duplicado, anticuerpos frente a citoquinas, quimioquinas, adipoquinas,

factores de crecimiento y angiogénicos, proteasas, receptores solubles y moléculas de adhesión, así como controles positivos y negativos. De esta forma, se puede detectar y comparar con una muestra de referencia la desregulación proteica de las muestras de estudio. Además, las muestras se marcan directamente con biotina, eliminando las posibles interacciones inespecíficas con un segundo anticuerpo.

Tabla 9. Lista de anticuerpos primarios y reactivos secundarios empleados en el trabajo.

Anticuerpos primarios						
Diana	Clonalidad	Fuente	Aplicación	Dilución	Casa comercial	Referencia
BDNF			Dot blot/ELISA	1:80	RayBiotech	ELH-BDNF
EMAP-II			ELISA	1:100	Elabscience	E-EL-H0204
ERP44	Policlonal	Conejo	WB/IHC	1:1000/ 1:100	Elabscience	E-AB-17493
GST	Monoclonal	Ratón	WB	1:5000	Cell Signaling	2624
GST	Policlonal	Conejo	ELISA	1:100	GE Healthcare	27457701
HaloTag	Monoclonal	Ratón	WB/ELISA	1:1000	Promega	G921A
LGALS3BP	Monoclonal	Ratón	Dot blot	1:1000	SCBT	sc-365338
MAPKAPK3	Monoclonal	Ratón	ELISA	1:1000	Abnova	H00007867-M02
p53	Monoclonal	Ratón	ELISA	1:1000	SCBT	sc-126
p73	Monoclonal	Ratón	WB	1:1000	Pierce	38c674.2
RhoGDi	Policlonal	Conejo	Dot blot	1:1000	SCBT	sc-360
SCGD1B2	Policlonal	Conejo	WB/IHC	1:1000/ 1:100	Elabscience	E-AB-16568
SRC	Policlonal	Cabra	ELISA	1:1000	R&D Systems	AF3389
TALDO1	Policlonal	Conejo	WB/IHC	1:1000/ 1:100	Elabscience	E-AB-17133
TRIM29	Policlonal	Conejo	WB/IHC	1:1000/ 1:100	Elabscience	E-AB-13932
VEGFC			ELISA	1:80	RayBiotech	ELH-VEGFC
VEGFR3			Dot blot, ELISA	1:80	RayBiotech	ELH-VEGFR3
Anticuerpos o reactivos secundarios marcados con HRP						
Nombre	Clonalidad	Fuente	Aplicación	Dilución	Casa comercial	
HRP anti-human IgG	Policlonal	Cabra	ELISA	1:10000	Jackson	
HRP anti-mouse	Policlonal	Cabra	WB/ELISA	1:2500	Dako	
HRP anti-rabbit	Policlonal	Cabra	WB	1:3000	BioRad	
HRP anti-human-IgG	Policlonal	Cabra	ELISA	1:3000	Dako	
HRP anti-human-IgG-biotin	Policlonal	Cabra	ELISA	1:10000- 1:20000	Jackson	
HRP-streptavidin			Dot-blot/ELISA	1:200/1:1000	Raybiotech	

Para obtener el secretoma, las células se crecieron y mantuvieron en medio DMEM con 10% FBS y 100 unidades/ml de P/S a 37°C y 5% de CO₂. Para obtener el medio condicionado, se

sembraron 5×10^6 células HCT116-control y 5×10^6 células HCT116- Δ Np73 para obtener confluencia celular a las 24 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con medio sin suero durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se volvieron a lavar con PBS y se dejaron 48 h con medio sin suero en presencia de P/S. La viabilidad celular superior al 95% se comprobó mediante 0.4% de *trypan blue* (Invitrogen). Se recogió el sobrenadante (medio condicionado) y se centrifugó a 1500 g para eliminar los posibles restos celulares o células del medio. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del Trp [243]. Para ello, se calcula la cantidad de Trp presente en cada muestra tras su desnaturalización empleando 8 M urea, 100 mM Tris, pH 8.5 midiendo la fluorescencia a 350 nm tras excitación a 295 nm. Una vez se obtiene la cantidad de Trp presente en cada muestra empleando una recta patrón de Trp, se obtiene la concentración utilizando el factor de corrección del Trp.

Para tener una mayor robustez de los resultados, la incubación del medio condicionado de las células con los microarrays se realizó con dos réplicas biológicas. Para ello, una vez marcadas las proteínas con biotina, se incubaron en dos subarrays de dos microarrays distintos. Para el marcaje con biotina, se incubaron 30 μ g del medio condicionado con la solución de marcaje de la casa comercial durante 30 min a temperatura ambiente y agitación suave. La reacción se detuvo con 3 μ l de la solución de parado aportada por la casa comercial y las muestras se dializaron para eliminar la biotina no unida. Se volvió a medir la concentración de la muestra mediante el método del Trp y se incubaron 3.3 μ g de las muestras biotiniladas en 400 μ l del tampón de bloqueo comercial en cada subarray a 4°C durante toda la noche. Antes de la incubación de los arrays con la muestra, éstos se atemperaron durante 15 min a 4°C. Se dejaron otros 15 min a temperatura ambiente y, finalmente, 1 h en campana de flujo laminar. Posteriormente, se incubó cada subarray con 400 μ l de tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente, asegurándose de que no quedaban burbujas en la superficie. Pasado este tiempo, se retiró el tampón de bloqueo de cada subarray y se añadieron los 3.3 μ g de muestra en 400 μ l de tampón de bloqueo. Al día siguiente, se lavaron los microarrays de forma extensa y se detectaron las proteínas unidas mediante su incubación con Cy3-estreptavidina durante 2 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Tras esta incubación, se lavaron los microarrays siguiendo y empleando los reactivos de la casa comercial. Finalmente, se llevó a cabo un último lavado con H_2O_{mq} durante 5 min y los arrays se secaron mediante centrifugación a 250 g durante 10 min. Se escanearon los microarrays con el láser de 532 nm para detectar la estreptavidina marcada con Cy3 empleando el escáner GenePix 4000B (Axon). Las imágenes se generaron y procesaron empleando el programa GenePixPro 7.1 [153, 155, 244].

El análisis, normalización y cuantificación de las imágenes obtenidas se hizo mediante el programa GenePixPro 7.1. Cada *spot* se definió mediante una plantilla (*.gal) aportada por la casa comercial. Como punto de corte para determinar la presencia de alteraciones proteicas se emplearon ratios ≥ 1.5 o ≤ 0.67 para las células HCT116-DNp73 frente a las células HCT116-control.

16. PROTEOMICA CUANTITATIVA DE LAS CÉLULAS HCT116 MEDIANTE SILAC

Para el marcaje metabólico (SILAC, del inglés *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*) de las células HCT116- Δ Np73 y las células control, éstas se crecieron y mantuvieron en DMEM (*Dundee Cell Products*) en presencia de [$^{12}C_6$]-L-Lisina y [$^{12}C_6$]-L-arginina ligeras o [$^{13}C_6$]-L-lisina y [$^{13}C_6$]-L-arginina pesadas (*Dundee Cell Products*) y 10% de FBS dializado junto con 100 unidades/ml de P/S a 37°C y 5% de CO_2 . Para asegurar que la incorporación de los aminoácidos marcados era superior al 98%, se llevaron a cabo al menos 6 duplicaciones [245]. Además, para evitar posibles problemas derivados del sesgo del marcaje, se hicieron experimentos *forward* y

reverse. Es decir, ambos medios condicionados se marcaron con los aminoácidos ligeros y con los pesados.

Para obtener el medio condicionado, se incubaron las células durante 48 h en DMEM-SILAC sin suero. Mediante una solución del 0.4% de *trypan blue* (Invitrogen), se determinó que la viabilidad celular era superior al 95%. Las proteínas presentes en el medio condicionado se precipitaron empleando metanol/cloroformo (*ver apartado 9*) y se cuantificaron mediante el método del Trp. Posteriormente, se mezclaron 25 µg de proteínas procedentes del medio condicionado SILAC de las células HCT116-ΔNp73 con 25 µg de proteínas procedentes del medio condicionado SILAC de las células HCT116-control (ratio 1:1). Las muestras se cargaron en un gel al 15% de PAGE-SDS y se corrieron a 25 mA hasta la salida del frente. El gel se tiñó con azul de Coomassie coloidal (Invitrogen). Se cortaron los carriles con los experimentos *forward* y *reverse* en 10 trozos, para proceder a su desteñido con 50 mM bicarbonato amónico y 50% acetonitrilo (ACN). Finalmente, se deshidrataron con ACN y se secaron para su rehidratación y digestión a 30°C toda la noche con 12.5 ng/µl de tripsina en 50 mM de bicarbonato amónico. Los péptidos se extrajeron a 37°C usando 100% ACN seguido de 0.5% TFA. Finalmente, se secaron y limpiaron con ZipTip con 0.6 µl de resina C18 (Millipore) para su posterior reconstitución en 5 µl de 0.1% ácido fórmico y 2% ACN para su análisis mediante MS.

17. ENSAYOS DE PROTEÓMICA PARA LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA DE AUTOANTICUERPOS

Otra de las estrategias que se siguió para buscar nuevas dianas de autoanticuerpos fue la inmunoprecipitación de sus antígenos y su posterior identificación mediante MS/MS empleando *pools* de plasmas. El empleo de *pools* de plasma en lugar de plasmas individuales permite paliar el efecto de la heterogeneidad individual, enriqueciendo la muestra en aquellos autoanticuerpos más frecuentes en pacientes.

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación, se hicieron dos *pools* de plasma de pacientes de 100 µl. El primero de ellos, denominado *pool* de CCR contenía 3 plasmas de pacientes con CCR en estadio III y 5 plasmas de pacientes con CCR en estadio IV. El segundo *pool* (*pool* sano), por otra parte, contenía 8 plasmas de individuos sanos con colonoscopia negativa (Tabla 4). Para aislar las IgGs de las muestras, se incubaron los *pools* separados en 600 µl de 20 mM fosfato sódico pH 7 con 200 µl de esferas de agarosa con Proteína G (Santa Cruz Biotechnology) durante 90 min a temperatura ambiente y suave agitación. Las esferas de agarosa con proteína G permiten el anclaje de las IgGs. Tras la incubación, se lavaron las esferas 6 veces con 600 µl 20 mM de fosfato sódico pH 7. Las IgGs unidas se eluyeron con 300 µl de 0.1 M glicina pH 2.7 y se neutralizaron con 1 M Tris pH 8.8. Los anticuerpos se separan de la agarosa gracias al pH ácido de la muestra que debilita la interacción hidrofóbica entre el anticuerpo y las esferas. El correcto aislamiento de las IgGs se visualizó mediante tinción con azul de Coomassie tras ser cargadas en un gel PAGE-SDS (*ver apartado 11*). La concentración del eluido se midió utilizando un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Tras aislar las IgGs purificadas de ambos *pools*, se inmovilizaron de forma covalente a las esferas de agarosa. Para ello, se incubaron 200 µg de las IgGs purificadas durante 2 h con 100 µl de la agarosa con Proteína G en 600 µl de tampón 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 (TBS). Se lavaron las esferas con 200 mM trietanolamina pH 8.9 antes del anclaje covalente de las IgGs a las esferas con 50 mM DMP (200 ml trietanolamina + 0.017 g dimetil-pimelimidato-dihidrocloreto (DMP) (Sigma Aldrich)) durante 1 h a temperatura ambiente y 25 rpm. El lavado con trietanolamina cambia el TBS por una solución con amina terciaria que no reaccionará con

el DMP ni con los anticuerpos a la hora del anclaje covalente. Se lavaron las esferas con 600 μ l de trietanolamina y se bloquearon con 600 μ l de etanolamina. Las IgGs que no se unieron covalentemente se eluyeron con 400 μ l de 0.1 M glicina en 2 M urea pH 2.7, y se equilibraron con 100 μ l de tampón TBS pH 7.4.

Para la inmunoprecipitación de las proteínas seroreactivas, se realizó un *precleaning* de 5 mg de extracto proteico proveniente de las líneas celulares KM12C, KM12SM, SW480 y SW620. Para ello, se incubaron con 20 μ l de agarosa con Proteína G previamente equilibrada con tampón de lisis celular RIPA. Este paso permitió eliminar las proteínas que interaccionaban de forma inespecífica con la agarosa. Posteriormente, se incubó el extracto celular con las esferas de agarosa que contienen las IgGs de los individuos sanos inmovilizadas a 4°C durante toda la noche y suave agitación. Al día siguiente, se recoge el extracto celular “limpio” de proteínas seroreactivas a IgGs de pacientes sanos para su posterior uso. Por otro lado, las esferas con las IgGs de individuos sanos se lavaron 10 veces con 600 μ l del tampón de lavado (TBS-0.2% Triton) y se centrifugan antes de eluir las proteínas unidas a los anticuerpos con 100 μ l 0.1 M glicina pH 2.7. Las proteínas se neutralizaron con 20 μ l de 2M bicarbonato amónico pH 8.8.

Para la identificación de las proteínas seroreactivas a las IgGs de los pacientes con CCR el extracto celular limpio se incubó con las esferas de agarosa con Proteína G que tenían unidas covalentemente estas IgGs. El protocolo que se siguió a partir de ese punto fue el mismo que se empleó para obtener las proteínas unidas a los autoanticuerpos de pacientes sanos.

Para la identificación de las proteínas mediante LC-MS/MS, se concentró el 50% del producto eluido en geles de PAGE-SDS (*ver apartado 11*) y se digirió en gel con tripsina siguiendo protocolos previamente establecidos [237, 246-249]. Previamente se había verificado la correcta obtención de proteínas mediante tinción con plata del 25% del producto eluido cargado en geles PAGE-SDS al 10% (*ver apartado 11*).

18. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

18.1. Espectrometría de masas de muestras de experimentos SILAC

Para el análisis mediante espectrometría de masas de los experimentos de SILAC (*ver apartado 16*), el digerido triptico se cargó en una pre-columna de 2cm *C18-A1 ASY-Column* (Thermo Fisher Scientific) de la que se eluyeron a una columna *Biosphere C18* (C18, 75 μ m de diámetro interno, 10 cm de longitud, 3 μ m de tamaño de partícula; NanoSeparations). Posteriormente, se separaron empleando un gradiente de 170 min desde 0-35% de tampón B (tampón A: 0.1% de ácido fórmico/2% de ACN; tampón B: 0.1% de ácido fórmico en ACN) empleando un flujo de 300 nl/min en el *nanoEasy HPLC* (Proxeon) acoplado a una fuente de iones *nanoelectrospray* (Proxeon). El espectro se obtuvo empleando el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) en la configuración positiva de iones. El espectro completo (*full-scan*) de MS (m/z 400-1200) se obtuvo estableciendo un valor de 1000000 a una resolución de 60000 y a una m/z de 400. Los 15 iones más intensos se seleccionaron para su fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID) en la trampa lineal de iones con un valor de 10000 y una energía de colisión normalizada del 35%. Se permitió el cribado por estado de la carga iónica precursora y la selección precursora monoisotópica, mientras que los iones cargados de forma individual y los estados de carga sin asignar se rechazaron. La exclusión dinámica se permitió con repeticiones de 1 y una duración de exclusión de 30 s. Los espectros de masas en formato *.raw se analizaron empleando el *Human Swiss Prot database* (SwissProt_57.15.fasta) empleando la herramienta de búsqueda MASCOT (version 2.3, Matrix Science) y el *Proteome Discoverer* (versión 1.4.1.14, Thermo Fisher Scientific). Los parámetros de búsqueda incluyeron

un máximo de dos cortes perdidos, la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, y la oxidación de metionina, acetilación del N-terminal y ^{13}C -Arg y ^{13}C -Lys como modificaciones variables. La tolerancia de la masa precursora y fragmentada se fijó a 10 ppm y 0.8 Da, respectivamente. Los péptidos identificados se validaron con el algoritmo Percolator con un *threshold* de 0.01. La cuantificación relativa de los péptidos identificados se llevó a cabo con el *Proteome Discoverer*. Para cada par SILAC, el programa determina el área del cromatograma del ion obtenido y lleva a cabo la relación “pesado/ligero”. Las relaciones proteicas se calculan como la media de todos los péptidos únicos cuantificados pertenecientes a una determinada proteína. Las relaciones de las proteínas en su estado pesado y ligero se emplearon como *fold-change*. El punto de corte del *fold-change* de las proteínas desreguladas se calculó mediante pruebas basadas en permutación previamente descritas en otros trabajos [250]. Las proteínas cuantificadas poseían al menos un péptido en el experimento *forward* y en el experimento *reverse* y con una variabilidad $\leq 20\%$.

La normalización de los datos se llevó a cabo eliminando el 5% de los valores más extremos y determinando el valor promedio de los datos restantes para normalizar los valores de las relaciones. De esta forma, se minimiza el efecto de los valores más extremos. Por último, dado que la conversión metabólica arginina-prolina puede afectar a la exactitud de la cuantificación en algunos tipos celulares, se investigó esta conversión en las células HCT116. Empleando la prolina pesada como modificación variable, se vio que menos del 1% de los péptidos conteniendo prolina se encontraban marcados de forma pesada en las células HCT116.

18.2. Espectrometría de masas de la inmunoprecipitación de proteínas diana de autoanticuerpos

Para la identificación de las proteínas diana de autoanticuerpos obtenidas mediante inmunoprecipitación, la separación de los péptidos tripticos se llevó a cabo en el sistema *Easy-nLC 1000 nano system* (Thermo Fisher Scientific). Para cada análisis, se cargaron las muestras en precolumnas Acclaim PepMap 100 (Thermo Fisher Scientific) y se eluyeron en una RSLC PepMap C18 de 15 cm de largo y 50 μm de diámetro interno y 2 μm de tamaño de partícula (Thermo Fisher Scientific). El ratio del flujo de la fase móvil fue de 300 nl/min usando 0.1% de ácido fórmico en agua (solvente A) y 0.1% de ácido fórmico en 100% de ACN (solvente B). El perfil del gradiente se estableció de la siguiente manera: 0%-35% de solvente B durante 90 min, 35%-100% de solvente B durante 4 min y 100% de solvente B durante 8 min. Se inyectaron 4 μl de cada muestra.

El análisis de MS se hizo empleando un espectrómetro de masas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). Para la ionización, se emplearon 2000 V de tensión de unión líquida y una temperatura capilar de 270°C. El método de barrido completo empleó una relación m/z de 400-1500 para la selección de masas, una resolución del Orbitrap de 70000 (a m/z 200), un valor de *target automatic gain control* (ACG) de 3×10^6 y tiempos de inyección máximos de 100 ms. Tras el barrido, los 15 iones precursores más intensos se seleccionaron para su fragmentación mediante MS/MS. La fragmentación se llevó a cabo empleando una energía de colisión normalizada de 27 y los escáneres de MS/MS se obtuvieron a partir de una masa m/z de 100 y empleando un ACG diana de 2×10^5 , una resolución de 17500 (a una m/z de 200), un *threshold* de intensidad de 8×10^3 , ventana de aislamiento de unidades 2 m/z y un tiempo máximo de inyección de 100 ms. Para el cribado del estado de carga se rechazaron los iones sin asignación, cargados monosiotópicamente y mayores o iguales a 7 iones protonados. Se estableció un tiempo de exclusión dinámico de 20 s para discriminar iones previamente seleccionados.

Los datos de MS se analizaron con el *Proteome Discoverer* (versión 1.4.1.14) (Thermo Fisher Scientific) empleando secuencias de trabajo estandarizadas. Los archivos *.raw de los espectros de masas se analizaron empleando SwissProt_2016_10.fasta, y la base de datos *Homo sapiens (human)* (20121 secuencias de proteínas) usando la herramienta de búsqueda Mascot (version 2.6.0, Matrix Science). La tolerancia de la masa precursora y fragmentada se fijó en 10 ppm y 0.02 Da, respectivamente. Los parámetros de búsqueda incluyeron un máximo de dos cortes perdidos, la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, y la oxidación de metionina, acetilación del N-terminal y fosforilaciones como modificaciones variables. Los péptidos identificados se filtraron con el algoritmo Percolator con un valor *threshold* de 0.01 [251].

19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICO DE LAS TÉCNICAS PROTEÓMICAS

Para el análisis de los datos obtenidos por proteómica, se emplearon distintas bases de datos.

19.1. DAVID

La base de datos DAVID (versión 6.8) se empleó para investigar el enriquecimiento de las fracciones subcelulares, actividad funcional y funciones de las proteínas cuantificadas en los estudios de microarrays de anticuerpos y espectrometría de masas de muestras marcadas mediante SILAC.

19.2. *Ingenuity Pathway Analysis*

El IPA (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) se empleó para identificar vías de señalización afectadas y predecir las funciones biológicas de las proteínas identificadas en los distintos ensayos.

19.3. STRING

El STRING (<http://string-db.org/>) se utilizó para predecir los *clusters* de interacciones directas e indirectas entre las proteínas identificadas en los distintos estudios. A lo largo de la Tesis Doctoral se utilizaron la versión 9.1 y 10.5 y un enriquecimiento de agrupamiento MCL de 2 con un valor de confianza de 0.4.

19.4. Exocarta

La base de datos Exocarta se empleó para identificar si las proteínas potencialmente desreguladas en los estudios de microarrays de anticuerpos y espectrometría de masas de muestras marcadas por SILAC se habían previamente identificado en estudios de exosomas para correlacionarlas con una externalización por vías de secreción no clásicas.

19.5. CRAPome

La base de datos CRAPome se empleó para buscar aquellas proteínas que habían aparecido con anterioridad en ensayos de inmunoprecipitación basados en esferas de agarosa. Así, aquellas proteínas que aparecían en más del 10% de los ensayos registrados se consideraron falsos positivos [252].

19.6. Oncomine

La base de datos Oncomine se empleó para evaluar si existía información previa de la desregulación génica a nivel de tejido normal y tumoral (y en función del estadio tumoral de CCR) de aquellas proteínas identificadas mediante inmunoprecipitación y MS [224].

19.7. UALCAN

La base de datos UALCAN permitió obtener *heatmaps* de expresión génica en tejido normal frente a tejido tumoral de los genes de las proteínas identificadas mediante inmunoprecipitación y MS [230].

19.8. cBioPortal

El cBioPortal se empleó para identificar alteraciones a nivel genético de los genes de las proteínas identificadas mediante los ensayos de inmunoprecipitación y MS [225].

19.9. Human Protein Atlas

El *Human Protein Atlas* se empleó para analizar si las proteínas identificadas mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masas se habían asociado previamente con el pronóstico de CCR y otros tipos tumorales [227, 253].

20. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS MEDIANTE EL SISTEMA GATEWAY

Para la obtención de las proteínas identificadas en los estudios de proteómica para su validación posterior se empleó el Sistema Gateway (Invitrogen). Este sistema permite obtener los genes de las proteínas de interés en poco tiempo y sin uso de enzimas de restricción. Brevemente, se parte del gen de interés flanqueado por sitios attB de recombinación o de un vector donante (pDONR221 o pENTR223) compatible con el sistema Gateway que contiene el gen de interés también flanqueado por los sitios de recombinación.

Si se parte únicamente del gen de interés, éste se debe insertar en los plásmidos donantes vacíos mediante la reacción de la BP clonasa (Invitrogen). Estos plásmidos vacíos contienen resistencia a kanamicina y una región codificante de un *cassette* de muerte celular flanqueada por sitios attB. De esta forma, al transferirse el gen de interés, las bacterias sobreviven y se seleccionan mediante resistencia a antibiótico. Para ello, se mezclan 150 ng del plásmido vacío con 15-150 ng del gen de interés y tampón TE pH 8 hasta 8 µl. Posteriormente, se añaden 2 µl de la BP clonasa y se deja incubar toda la noche a 25°C. Al día siguiente, se detiene la reacción con 1 µl de 2 µg/µl de proteinasa K a 37°C durante 10 min. Para aislar el plásmido conteniendo el gen de interés producto de la reacción, se transforman 25 µl de bacterias *E. coli* TOP10 o *E. coli* DH5α con 2.5 µl de la reacción BP, dejándola 30 min en hielo para darle posteriormente un choque térmico de 30 s a 42°C. Después, se dejan 5 min en hielo y se le añade rápidamente 1 ml de medio SOC (*Super optimal broth with catabolite repression*; para 1 l: 5 g de extracto de levadura, 20 g de triptona, 0.584 g de NaCl, 0.186 g de KCl, 2.4 g de MgSO₄; enrasar con H₂O) para permitir la recuperación de las bacterias y se dejan a 37°C y agitación durante 1 h antes de su centrifugación a 2300 g durante 5 min. Se elimina el sobrenadante hasta aproximadamente 100 µl y se plaquean en placas de Luria Bertani (LB)-agar (para 1 l: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, 15 g de agar; enrasar con H₂O) suplementadas con 40 µg/ml de kanamicina. Las placas se dejan a 37°C toda la noche. Una vez se tienen las colonias de bacterias en las placas, se seleccionan algunas para su amplificación individual en otra placa de LB-agar. Al día siguiente, se hace un cribado para determinar cuáles de ellas poseen el plásmido de interés. Este cribado se hizo mediante minis de colonias o mediante *colony screening* por PCR.

Mediante minis de colonias, se resuspendieron las colonias de manera individual en 40 µl de tampón de lisis (para 25 ml: 0.25 ml de 1 M Tris pH 7.4, 0.25 ml de 10 M NaOH, 0.5 ml 0.5 M EDTA, 1.25 ml SDS 20% (p/v), 22.75 ml H₂O_{mq}) y se neutralizaron con una mezcla de 5 µl de tampón 6x de carga de DNA con azul de bromofenol (30% glicerol (v/v), 0.025% azul de xilencianosl (w/v) y 0.025% (p/v) de azul de bromofenol) y 3 µl de 1 N HCl. Se dejó la mezcla a -

80°C un mínimo de 30 min y se centrifugaron las bacterias 15 min a 12000 g y 4°C. El sobrenadante, que contiene el plásmido junto con las proteínas solubles y DNA genómico, se cargó en geles de 0.7% de agarosa (p/v) para su electroforesis.

Alternativamente, mediante *colony screening* por PCR, se resuspendió una colonia en 50 µl de H₂O_{mq} autoclavada. En 20 µl finales de PCR, se añadieron 4 µl de 5 M betaína, 5 µl del H₂O_{mq} con la colonia, 2 µl del tampón 10x rTaq, 1.6 µl de mezcla de dNTPs, 0.1 µl rTaq (5 U/µL), 1 µl de 10 µM del oligo *forward*, 1 µl de 10 µM del oligo *reverse* y de H₂O_{mq} autoclavada hasta un volumen final de 20 µl. Se empleó un programa de 95°C durante 10 min para lisar las células seguido de 30 ciclos de 95°C (1 min), 55°C (1 min) y 72°C (3 min). Por último, se aplicó un programa de 72°C (10 min).

Una vez identificadas las colonias portadoras de los plásmidos de interés, se seleccionan 2-3 para su crecimiento en LB (para 1 l: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl; enrasar con H₂O) suplementado con su antibiótico correspondiente. De esta forma, se obtuvieron cultivos de bacterias que, en teoría, expresan únicamente el plásmido transformado que les confiere la resistencia al antibiótico. A partir de los cultivos líquidos de pequeña (8 ml) y gran (250 ml) escala se purificaron los plásmidos siguiendo el protocolo de los kits *High Purity Plasmid Miniprep Kit* (Neobiotech) y *NucleoBond® Xtra Midi kit* (Macherey-Nagel), respectivamente. La secuencia de los plásmidos se verificó mediante secuenciación.

Una vez se tienen los genes en los plásmidos compatibles con el sistema Gateway, los genes de interés se transfieren a los vectores de expresión deseados que también tienen que ser compatibles con este sistema. Para ello, deben contener un *cassette* de muerte celular flanqueado por secuencias attB y resistencia a antibiótico (normalmente ampicilina) distinta a la presente en los vectores donantes. De esta forma, si la transferencia del gen de un vector a otro se hace correctamente, se reemplaza el *cassette* de muerte celular por el gen de interés, sobreviviendo aquellas bacterias portadoras de nuestro gen de interés y resistentes también al nuevo antibiótico. Brevemente, se añaden 50-150 ng del vector donante, 150 ng del vector de expresión deseado y tampón TE pH 8 hasta 8 µl. Posteriormente, se añaden 2 µl de la mezcla de enzima LR Clonase™ y se deja incubando la reacción toda la noche a 25°C. Al día siguiente, se detiene la reacción de la misma manera en la que se detiene la reacción BP (descrita anteriormente). Para la obtención de los plásmidos purificados, se sigue el mismo esquema de trabajo que para la obtención de los vectores donantes, pero empleando 100 µg/ml de ampicilina como antibiótico de selección. La secuencia de los plásmidos se verifica mediante secuenciación.

20.1. Vectores de expresión *in vitro*

Para la obtención de los vectores de expresión proteica *in vitro* se empleó el Sistema Gateway descrito en la sección anterior. Para ello, se obtuvieron plásmidos codificantes para el cDNA de las proteínas en vectores flexibles pDONR221 o pENTR223 del repositorio de plásmidos DNASU (<https://dnasu.org/DNASU/>) (Tabla 10) [254]. La región codificante para los genes se transfirió desde estos vectores a los vectores de expresión pANT7_cHalo, pJFT7_nHalo o pANT7_cGST mediante la reacción de la LR clonase (Invitrogen) a 25°C toda la noche, basada en la recombinación homóloga de los sitios attB presentes en ambos plásmidos.

Los plásmidos vacíos pJFT7_nHalo y pANT7_cGST se obtuvieron del DNASU. El plásmido pANT7_cHalo, por otra parte, se obtuvo en el laboratorio a partir de la digestión del plásmido pANT7_cGST con las enzimas de restricción *XhoI* y *BstBI*. El plásmido digerido se empleó para subclonar el cDNA codificante de HaloTag amplificado mediante PCR usando el plásmido pFN18a

como molde y los oligos *forward* y *reverse* 5'-AAACTCGAGATGGCAGAAATCGGT-3' y 5'-AAATTCGAATTAACCGGAAATCTC-3' (IDT Integrated DNA technologies). Tras la purificación, el producto de PCR se digirió con *XhoI* y *BstBI* para su posterior ligación con el plásmido digerido pANT7_cGST y transformación en bacterias *E. coli* DB3.1 que se crecieron en LB con cloranfenicol y ampicilina para seleccionar las bacterias portadoras del vector pANT7_cHalo. El plásmido se purificó usando el kit *NucleoBond Xtra Midi kit* (Macherey-Nagel Inc.).

Tabla 10. Lista de clones empleados en la Tesis Doctoral obtenidos del repositorio DNASU

Gen	Clon
CHCHD3	HsCD00353217
COTL1	HsCD00399694
CTTNBP2NL	HsCD00081874
ERP44	HsCD00511305
FKBP4	HsCD00512122
GTF2B	HsCD00079856
KAT6A**	25181 ID
MAPKAPK3	HsCD00288419
MGST3	HsCD00353113
MYO10	HsCD00746161
p63	HsCD00514479
p73	HsCD00404040
pANT7_cGST	EvNO00023103
pJFT7_nHalo	EvNO000424503
PIM1	HsCD00829650
PKN1	HsCD00005729
PTPRN	HsCD00514128
SCGB1D2	HsCD00516064
SPCS2	HsCD00352343
SRC	HsCD00295578
STK4	HsCD00504206
SULF1	HsCD00295816
TALDO1	HsCD00510011
THSD7A*	MmCD00336622
TP53	HsCD00001270
TRIM29	HsCD00399582
*Debido a la elevada identidad de secuencia entre el gen humano y el de ratón se empleó el gen de <i>Mus musculus</i> .	
** Se obtuvo de Addgene	

Los vectores pANT7_cHalo, pJFT7_nHalo y pANT7_cGST permiten la expresión *in vitro* de las proteínas fusionadas al HaloTag en el C- o N-terminal, así como a GST en el C-terminal, respectivamente [144, 145, 255]. Además, como controles de los ensayos, se emplearon vectores de expresión que permiten la expresión de HaloTag. La secuencia de todos los vectores se verificó por secuenciación antes de su uso.

En el caso de los vectores conteniendo KAT6A, THSD7A y PKN1, al no encontrarse en el formato compatible para transferencia mediante LR clonase, primero se obtuvo la secuencia del gen

codificante flanqueada por los extremos attB mediante PCR empleando oligos específicos (Tabla 11). El producto de PCR se cargó en geles de agarosa de bajo punto de fusión y se aisló empleando los kits *Wizard PCR Preps DNA Purification System* (Promega) y *GenElute™ Gel Extraction* (Sigma Aldrich). Una vez aislado, se llevó a cabo la reacción BP, que inserta los genes de interés flanqueados por la región attB en el vector pDONR221. Una vez obtenido el gen en el vector, se llevó a cabo la reacción LR para insertar los genes en los vectores pANT7_cHalo o pJT7_nHalo. Las isoformas $\Delta Np73\alpha$ y $\Delta Np73\beta$ se amplificaron mediante PCR usando oligonucleótidos específicos (Tabla 11) y el pcDNA3.1 conteniendo dichos cDNAs (cedidos por la Dra. Gemma Domínguez). Los productos de PCR se clonaron en el vector pDONR221 por reacción de clonasa BP y, posteriormente, se transfirieron a los vectores pANT7_cGST para expresión *in vitro* o a vectores pANT7_cHaloHis desarrollados en el laboratorio para la expresión en bacteria [256] y así obtener las isoformas expresadas acopladas a GST o HaloTag en el C-terminal, respectivamente.

Tabla 11. Secuencias de los oligos empleados para los clonajes en el sistema Gateway de los cDNAs indicados.

	Secuencia del oligo forward	Secuencia del oligo reverse
ECD gateway	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGGTGCCAAGCCCTGTC	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcGCGCATGGGTGAGGTGCT
ICD gateway	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGCGGCAGCATGCGCGG	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcCTGGGCAGGGCCTTGAG
KAT6A gateway	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGGGAGTGACTGGTCCC	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcTATGACTGGAGTCCAGCG
PKN1 gateway	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGGCCAGCGACGCCGTG	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcCAAGCAGCCCCGCCAC
THSD7A gateway	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGGCTCAAGGCGACACC	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcTCAGTGGTGATGGTG
$\Delta Np73\alpha$ gateway	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGCTGTACGTCGGTGAC	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcGTGGATCTCGGCCTCCGT
$\Delta Np73\beta$ gateway	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGCTGTACGTCGGTGAC	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcGGGCCCCAGGTCCTCAATGG

20.1.1. Vectores de expresión *in vitro* para los dominios intra- y extra-celular de PTPRN

El estudio de la seroreactividad frente a PTPRN se llevó a cabo evaluando dicha seroreactividad frente a la proteína entera y a sus dominios extra-celular (ECD) e intra-celular (ICD). Con ello, se buscó no sólo identificar una posible seroreactividad diferencial, sino también evaluar el dominio de la proteína que causaba dicha reactividad.

Para obtener los distintos dominios de PTPRN, se utilizó el plásmido conteniendo PTPRN obtenido a través del repositorio DNASU (<https://dnasu.org/DNASU/>). Para obtener el ECD, se diseñaron oligos específicos que permitían la amplificación mediante PCR de la secuencia de nucleótidos del ECD hasta el dominio transmembrana flanqueada por sitios attB. El ICD se obtuvo, por otra parte, empleando oligos que permitían la amplificación mediante PCR del dominio desde su inicio (al terminar el dominio transmembrana) hasta su extremo C-terminal (Tabla 11). Una vez obtenidos los productos de PCR, se clonaron en vectores pDONR221 y pANT7_cHalo siguiendo el mismo esquema de trabajo empleado para THSD7A, KAT6A y PKN1 (apartado 20.1).

20.2. Vectores de expresión para expresión en bacteria

Las proteínas p73, Δ Np73 α y Δ Np73 β se expresaron en bacteria empleando el vector pANT7_HisHalo, que permite su obtención como proteínas de fusión a 6xHis_HaloTag en el C-terminal.

Para ello, se siguió el mismo esquema de trabajo para la obtención de los plásmidos de expresión *in vitro* descritos en el apartado anterior para p53, p73, Δ Np73 α y Δ Np73 β , pero empleando el vector de expresión final pANT7_HisHalo. La secuencia de todos los vectores se verificó mediante secuenciación.

21. EXPRESIÓN *IN VITRO* DE LAS PROTEÍNAS

Para poder llevar a cabo los ensayos de seroreactividad y evaluar el potencial diagnóstico de las proteínas identificadas, así como desarrollar una metodología que permitiese la expresión de proteínas difíciles de expresar, se emplearon los sistemas de expresión *in vitro* libre de células. En esta Tesis Doctoral, se emplearon los sistemas basados en extractos de células HeLa y reticulocitos de conejo.

21.1. Expresión *in vitro* de proteínas empleando lisados de células HeLa

El kit de expresión *1-Step Human Coupled IVT Kit HeLa cell lysate* (Thermo Fisher Scientific) se empleó para la expresión de los autoantígenos identificados mediante IP acoplada a LC-MS/MS, así como los autoantígenos GTF2B, MAPKAPK3, PIM1, PKN1, p53, SRC, STK4, SULF1 y PTPRN y sus dominios ICD y ECD.

Para ello, tomando un volumen final de 25 μ l escalable según las necesidades, se mezclaron 12.5 μ l del lisado de HeLa, 2.5 μ l de proteínas accesorias, 5 μ l de la mezcla de reacción, 1 μ g de plásmido y H₂O libre de nucleasas hasta 25 μ l. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 90 min. Para comprobar la integridad de las muestras proteicas y la presencia de las proteínas diana se cargaron 0.67 μ l en geles PAGE-SDS al 10% para su posterior tinción con Azul de Coomassie e inmunodetección (*ver apartados 11 y 12*) en membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra) empleando un anticuerpo monoclonal frente al HaloTag (Promega) y un anticuerpo secundario acoplado a HRP que reconoce las IgGs de ratón (Tabla 9). La señal luminiscente se desarrolló con el *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) y se detectó con el *Amersham Imager 680* (GE Healthcare).

21.2. Expresión *in vitro* de proteínas empleando lisado de reticulocitos de conejo

Los estudios centrados en la valoración mediante ELISA luminiscente de la seroreactividad diferencial de p73 y sus isoformas se realizaron utilizando el sistema de expresión *in vitro* de las proteínas *T7 reticulocyte lysate* (Promega). Además, la puesta a punto del sensor electroquímico empleando la detección de autoanticuerpos frente a p53 como prueba de concepto también empleó este sistema de expresión *in vitro*.

Para la expresión en 50 μ l (escalable según las necesidades) se mezclan 40 μ l de *TnT® Quick Master Mix*, 1 μ l de 1 mM metionina, 1 μ g de DNA y H₂O libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 μ l. Posteriormente, se incubó 90 min a 30°C. Si no se usa de manera inminente, se guarda la expresión proteica a -20°C.

La comprobación de la expresión proteica y del estado de las muestras se llevó a cabo mediante PAGE-SDS al 10% para su posterior tinción con azul de Coomassie e inmunodetección (*apartados 11 y 12*). Para la inmunodetección, se cargaron 2 μ l de las muestras y se transfirieron a

membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra) para su posterior incubación con los anticuerpos frente a p53, p73, HaloTag y GST (Tabla 9). La señal luminiscente se obtuvo con el *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) y la señal se detectó en los equipos *Fujifilm LAS-3000 Imager* (Fujifilm) o *Amersham Imager 680* (GE Healthcare) para los estudios del desarrollo del sensor (ver Artículo 4) y ELISA luminiscente frente a las isoformas de p73 (ver Artículo 3), respectivamente. Como control de la expresión, se incluyó a la proteína GST-HaloTag (control positivo) y el reticulocito conteniendo el vector pANT7_cHalo (control negativo).

22. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIA USANDO LA CEPA BL21 (DE3) de *E. coli*

Para la expresión de las proteínas p73, $\Delta Np73\alpha$ y $\Delta Np73\beta$, se empleó la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3). Para ello, primero se transformaron las bacterias con los plásmidos de interés siguiendo el protocolo descrito en el apartado 20 para las bacterias TOP10. Una vez se obtienen las bacterias con los plásmidos de expresión, se realizaron pruebas de expresión para valorar las condiciones ideales de expresión de las proteínas en cuanto a concentración de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), tiempo y temperatura de expresión. En el caso de las proteínas de la familia p73, se vio que las condiciones óptimas se alcanzaban con 0.4 mM de IPTG durante 48 h y 16°C. Por ello, para su expresión a gran escala, se crecieron en 250 ml de LB hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Al alcanzarla, se induce la expresión con 0.4 mM de IPTG durante 48 h a 16°C y 220 rpm. Pasado este tiempo, se centrifuga el cultivo durante 10 min a 6000 g y el pellet se resuspende en 5 ml de 50 mM fosfato y 300 mM NaCl con 1%-lauril-sarcosinato pH 8.0 y se deja en hielo durante 30 min. Posteriormente, se añade 1% de Triton-X100 a la mezcla y se incuba en hielo otros 20 min mientras se agita con vórtex cada 10 min. Finalmente, se realizan 3 ciclos de sonicación de 30 s. El lisado se clarifica mediante centrifugación y las proteínas se purifican empleando la resina Ni-NTA (CliniSciences).

23. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRODUCIDAS EN BACTERIA

Las proteínas obtenidas mediante expresión en bacteria se purificaron mediante cromatografía de afinidad empleando agarosa Ni-NTA (CliniSciences) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La purificación de proteínas mediante esta técnica se basa en la unión del Ni^{+2} con la cola de histidinas de las proteínas, de forma que quedan retenidas en la columna. Brevemente, las proteínas solubilizadas se incuban durante 16 h a 4°C en tubos de 15 ml con 500 μ l de la agarosa Ni-NTA previamente preincubada y lavada 3 veces con 5 ml de 50 mM fosfato y 300 mM NaCl pH 8.0. Tras la incubación, se lava la agarosa 5 veces durante 10 min a 4°C con 5 ml de tampón de lavado (20 mM fosfato, 300 mM NaCl, 2.5 mM imidazol, pH 8.0). Los lavados se llevaron a cabo mediante centrifugación de los tubos a 4000 g durante 10 min y 4°C y sustitución del sobrenadante por 5 ml de tampón de lavado nuevos. Tras estos lavados, se eluyen las proteínas con 5 ml de 20 mM fosfato sódico, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8.0. De esta forma, el imidazol que se encuentra a una elevada concentración desplaza a las histidinas para unirse al Ni^{+2} , eluyéndose así las proteínas. La elución se llevó a cabo dos veces. La pureza de las proteínas se verificó mediante PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie.

24. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR

En todos los casos, el análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante PCR semicuantitativa. Además, para los estudios centrados en p73, se llevó a cabo también un análisis mediante qPCR.

24.1. PCR semi-cuantitativa

Para el análisis mediante PCR semi-cuantitativa, se emplearon los oligos de la Tabla 12. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 20 μ l, añadiéndose 1.6 μ l de dNTPs, 2 μ l de tampón 10x, 4 μ l de 5 M betaína, 2 μ l de oligonucleótido *forward* 10 μ M, 2 μ l de oligonucleótido *reverse*, 0.4 μ l de DNA polimerasa, 0.8 μ l de cDNA y 7.2 μ l de H₂O para PCR. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo (3 min a 94°C), 25-35 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C) y un ciclo final de 10 min a 72°C.

Tabla 12. Secuencias de los oligos empleadas para la evaluación de la presencia del gen diana en las muestras biológicas analizadas.

Gen diana	Secuencia del oligo <i>forward</i>	Secuencia del oligo <i>reverse</i>
EMAP-II	GCAGGCAACTTTGAGGGAAGAG	TTAGCGTGCAGTGGAGTACCAG
APEX1	CTGCTCTTGGAATGTGGATGGG	TCCAGGCAGCTCCTGAAGTTCA
BDNF	CATCCGAGGACAAGGTGGCTTG	GCCGAACCTTCTGGTCCTCATC
CHCHD3	CGAAGTCTCAGCGGTATTCTGG	TCTCGGTCCAGCTCTTTGGCTT
COTL1	AAATATGACGGCTCCACCATCGT	TGGACCTCTTGCTCATGGCATC
CRABP2	TTGAGGAGCAGACTGTGGATGG	GTTCTCTGGTCCACGAGGTCTT
CTTNBP2NL	GCAAGAACATGCAGGAGCGCAT	TCTCCTTCAGCCGTATCCTGTG
CXCR4	CTCCTCTTTGTCATCACGCTTCC	GGATGAGGACACTGCTGTAGAG
DDB1	CATTCTCGCTCCATCCTGATG	CCTTCTTACGGTCGCTCAACAG
DSC3	CACTTACTCGGAGTGGCACAGT	AGCTGGAGATCCTCTTCCCTCA
DSG2	AGGGAAGCACAGCATGACTCCT	CCTTCCGCAATGGCACATCAG
ERP44	AGTAGTGTTTGCCAGAGTTGATTG	CTGCCAATGCTTTCACTGATCGC
FKBP4	TGACTCCAGTCTGGATCGCAAG	CTGGTTTGACAGGTGATGTGGCA
GAPDH	GTCTCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
KAT6A	CTTCAGTGAGAGCAGCGAGGAG	GTGGTGTTGCGCTTTCGGACT
MARCKSL1	CAGGCTACAGAGCCATCCACTC	GCAGCTTAGAGATCACCCACCT
MGST3	GCCTGGATTGTTGGACGAGTTC	AGCACACAGTTGTGCCACCAA
MYO10	CACTCTGCCGTATTTCCACAGC	TTTGTGGAGCCAGCCTTGCTTG
PTPRN	TGGAGATCCTGGCTGAGCATGT	GGTCACATCAGCCAAAGACAGG
QSOX1	ACATGGCTGACCTGGAATCTGC	GCAGGAAGTTCTGGACTAAGGG
S1PR1	CGACTCGAGCTGCGGTTTC	GCTACTCCAGACGAACGCTA
SCGB1D2	GGAGTGAAGAGATGCACGGATC	GAAAGACAGTGGAACACAGGATG
SPCS2	ATTTGGCAGCTGTCCTCCAGTC	GGACTTTGTGAACCTCGGCTTCC
TALDO1	TGCCTGTGCTCTCAGCCAAGG	TTCTCCACAGCCATCTGGTCCT
TAp73	GCACCACGTTTGAGCACCTCT	GCAGATTGAACTGGGCCATGA
THSD7A	GTGCCAAAGCTACAGGTGGAAG	AGTAATGGCTCTTGCTGTCGC
TRIM29	GAGGATGAAGCTGAGAAGTGGC	CCTCCTTTTGCTTCTCCAGGTC
WDR1	AGAAGGACCACCTGCTCAGTGT	ATGCACCGTCAGACACTGGATC
Δ Np73	CAAACGGCCCCGATGTTCCC	TTGAACTGGGCCGTGGCGAG

24.2. qPCR

La qPCR de los genes de estudio (Tabla 12, EMAP-II, BDNF, DNp73 y TAp73) se llevó a cabo en un *Light Cycler* (Roche Diagnostics) empleando el *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit* (Roche Diagnostics). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l,

compuesto por 2 μ l de cDNA, 0.5 μ M de cada oligo y mezcla de reacción 1x (*FastStar DNA polymerase*, tampón de reacción, dNTPs y SYBR *green*). El programa de reacción empleado fue el siguiente: un paso de desnaturalización del DNA a 95°C, 40 ciclos de PCR (desnaturalización a 94°C durante 10 s, hibridación a la temperatura específica de cada oligo durante 5 s y elongación a 72°C durante 10 s). El gen de la subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa (SDHA) se empleó para normalizar la expresión génica de los resultados de la qPCR frente a Δ Np73 y TAp73 en tejido.

Para evaluar si existía una expresión diferencial de TAp73 y Δ Np73 entre tejido sano y tejido patológico, se llevó a cabo un análisis estadístico empleando Microsoft Office Excel y el programa R (versión 3.2.3). Se evaluó la distribución de los datos empleando la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Bartlett. Al descartarse la normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas, la evaluación estadística de las diferencias de niveles entre grupos se hizo mediante la prueba no paramétrica de U-Mann Whitney asumiendo varianzas desiguales. Los valores se representaron como los valores de la media sin los *outliers* (*trimmed mean*) $\pm$ error estándar de la media (SEM). Los *p*-valores < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. La capacidad diagnóstica de TAp73 y Δ Np73 se realizó mediante curvas ROC, obteniéndose los valores maximizados de sensibilidad y especificidad, mediante el paquete Epi para el programa R (versión 3.2.3) [187].

25. ENSAYOS CELULARES

En esta Tesis Doctoral, se han realizado ensayos con cultivos celulares para el estudio de cambios en el secretoma por la sobreexpresión de Δ Np73 y para el estudio del efecto del silenciamiento de PTPRN en las propiedades tumorigénicas de células de CCR. Para el primer caso, se hizo uso del medio condicionado de las células HCT116- Δ Np73 y HCT116-control en colaboración con el grupo de la Dra. Gemma Domínguez (UAM-IIB). Por ello, el protocolo detallado de esos ensayos se encuentra en la parte correspondiente a dicho trabajo en el apartado de resultados. Para los estudios de PTPRN, se detallan a continuación los ensayos realizados mediante su silenciamiento transitorio.

25.1. Ensayos en células con silenciamiento transitorio de PTPRN

El efecto del silenciamiento transitorio de PTPRN sobre las propiedades tumorigénicas de las células se evaluó empleando las líneas celulares de cáncer de colon KM12C y KM12SM.

Para el silenciamiento, se obtuvieron los siRNAs frente a PTPRN (EHU029231; Sigma Aldrich) y el siRNA control (SIC001; Sigma Aldrich) y el reactivo de transfección *jetPrime* (PolyPlus Transfection). Brevemente, se sembraron 2.5×10^5 células en placas P6 con 2 ml de su medio de crecimiento correspondiente, de forma que al día siguiente se encuentren al 50% de confluencia. Al día siguiente, se aspiró el medio y se le añadió 1 ml del medio correspondiente fresco por pocillo. A cada pocillo, se le añadieron 55 pmol del siRNA en 50 μ l finales del tampón de transfección. Se agitó fuertemente y se le dio un pulso de centrifuga. Para el caso del silenciamiento de PTPRN, se empleó una mezcla equimolar del conjunto de 3 siRNA (EHU029231). Tras el pulso de centrifuga, se añadieron 2 μ l del *jetPrime* y se volvió a agitar durante 10 s antes de darle otro breve pulso de centrifuga. Finalmente, a cada pocillo, se le añaden 52 μ l de la mezcla de transfección. A las 48 h, se verifica el silenciamiento mediante PCR semi-cuantitativa empleando oligos específicos frente a PTPRN, de forma que se pudiese comparar la expresión génica de las células transfectadas con siRNA frente a PTPRN y células transfectadas con siRNA control.

Una vez verificado el silenciamiento, se pasó a realizar los diferentes ensayos funcionales.

25.1.1. Ensayos de proliferación

Para los ensayos de proliferación, se sembraron 5×10^3 células de las líneas celulares KM12C y KM12SM en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer en 100 μ l de medio de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. A las 72 h, se les añadió 50 μ l de una mezcla de 3 mg/ml de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT; M5655; Sigma Aldrich) disuelto en medio de crecimiento para que, al añadirlo en los pocillos, quedase a una concentración final de MTT de 1 mg/ml. Las placas se incubaron 1 h a 37°C y, tras este tiempo, se retiró el medio cuidadosamente y se añadieron 100 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO; VWR chemicals) a cada pocillo para lisar las células y liberar el colorante. Tras dejar la placa agitando en oscuridad 30 min, se midió la absorbancia a 570 nm utilizando *The Spark multimode microplate reader* (Tecan Trading AG). La intensidad de señal obtenida era directamente proporcional a la proliferación de las células.

25.1.2. Ensayos de invasión

Los ensayos de invasión se llevaron a cabo tapizando los *Transwell* (3413; Corning) con 50 μ l de una dilución 1:3 de 10 mg/ml de Matrigel (Sigma Aldrich) en DMEM. Posteriormente, se añadió el medio de crecimiento de las células con 10% de FBS en el compartimento inferior de las placas y se añadieron 8×10^4 células en medio de adhesión (0.5% de BSA (p/v) en medio de crecimiento sin suero) a la parte superior de los *Transwell* y se dejaron 22 h a 37°C. Pasado este tiempo, se eliminaron las células no adheridas con bastoncillos. Las células que quedaron en los *Transwell* se fijaron con 2 ml de 4% de paraformaldehído y se tiñeron con cristal violeta (Sigma Aldrich) durante 45 min o toda la noche según las necesidades del estudio. Para poder contar las células, se hicieron sucesivos lavados con H₂O_{mq} para eliminar el exceso de tinción. El conteo de las células se hizo empleando un microscopio Leica Dmi1 (Leica).

25.1.3. Ensayos de cierre de herida

Para los ensayos de cierre de herida, se sembraron en placas de 96 pocillos por triplicado las células de forma que sellasen por completo el pocillo al adherirse. Una vez adheridas, se realizó una herida empleando una punta de pipeta blanca y se reemplazó el medio. Se tomaron imágenes cada 12 h-24 h con el *software LAS Core V4.12* empleando el microscopio óptico Leica Dmi1 (Leica).

26. ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS EMPLEANDO MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Una de las estrategias seguidas para poder detectar la presencia de autoanticuerpos frente a determinados antígenos es mediante su determinación empleando membranas de nitrocelulosa como soporte y siguiendo el esquema de trabajo descrito en el *apartado 12*. Esta estrategia se usó para el estudio diferencial de la seroreactividad frente a las isoformas de p73, ya que permite el posible desenmascaramiento de epítomos que se pierden si se emplean otros métodos de inmovilización, como pueden ser los epítomos lineales. Para ello, se cargaron 500 ng de las proteínas p73, Δ Np73 α y Δ Np73 β en geles monopocillo de PAGE-SDS al 10% para su transferencia a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra). La presencia de un único pocillo, junto con el pocillo correspondiente a los marcadores de peso molecular, permite una distribución homogénea de la muestra en todo el gel y, posteriormente, la membrana. Así, la membrana se corta en trozos del mismo tamaño en función del número de plasmas o anticuerpos que se quieran estudiar. En el caso de este estudio, se incubaron los plasmas individuales a una dilución 1:1000, junto con los anticuerpos monoclonales frente a p73 a las diluciones indicadas y p53 como controles. De esta forma, si los plasmas tenían presentes autoanticuerpos frente a alguna de las isoformas, se unieron a ellas. La detección se obtuvo

empleando anticuerpos secundarios acoplados a HRP que reconocen IgGs humanas (en el caso de los plasmas) o IgGs de ratón en el caso de los anticuerpos monoclonales frente a p73 y p53 (Tabla 9). La señal quimioluminiscente se desarrolló empleando el *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) y se detectó con el equipo *Fujifilm LAS-3000 Imager* (Fujifilm).

27. ELISA

Para cuantificar y evaluar la presencia de los biomarcadores seleccionados para los diversos estudios, se emplearon distintos tipos de ELISA atendiendo a la naturaleza del ensayo y las muestras biológicas a estudiar.

27.1. ELISAs comerciales

27.1.1. ELISA frente a VEGF-C (RayBiotech), VEGFR-3 (RayBiotech), BDNF (RayBiotech) y EMAP-II (Elabscience)

Los ELISAs comerciales se emplearon para cuantificar la presencia de VEGF-C (RayBiotech), VEGFR-3 (RayBiotech), BDNF (RayBiotech) y EMAP-II (Elabscience) en los plasmas de pacientes seleccionados para el estudio y en el secretoma y extracto proteico de las células HCT116-ΔNp73 y HCT116-control.

El protocolo, incluida la concentración óptima de las muestras, se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La sensibilidad de detección de VEGF-C, VEGFR-3, BDNF y EMAP-II fue de 15 pg/ml, 15 pg/ml, 80 pg/ml, and 75 pg/ml, respectivamente. La evaluación de la presencia de una expresión diferencial de los marcadores en los plasmas de pacientes de CCR en comparación con los controles, se llevó a cabo mediante Microsoft Office Excel con la prueba T de *Student* empleando una sola cola y asumiendo varianzas desiguales. Los *p* valores < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Además, el potencial diagnóstico de cada biomarcador, su máxima sensibilidad y su máxima especificidad se evaluaron empleando curvas ROC usando el programa R (versión 3.2.3) y los paquetes ModelGood y Epi [257].

27.1.2. ELISA comercial de CEA

Para poder cuantificar (ng/ml) los niveles del CEA en las muestras de plasma indicadas, se empleó el kit de detección de Sigma Aldrich, siguiéndose el protocolo recomendado por la casa comercial.

27.1.3. ELISA para la detección de autoanticuerpos frente a p53

Para poder comparar el rendimiento del sensor electroquímico desarrollado en esta Tesis Doctoral (*ver Artículo 3*), se cuantificó la presencia de autoanticuerpos frente a p53 de las muestras empleadas para su desarrollo empleando el kit *p53-auto antibody ELISA-Kit (Human)* (Dianova GmbH) y siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Para ello, se incubaron los pocillos de la placa comercial con 100 µl de los sueros diluidos 1:100 durante 1 h a temperatura ambiente. La unión de IgGs a las muestras se detectó midiendo la absorbancia a 450 nm empleando el lector de placas *Biochrom EZ 249 Read 400 microplate reader* (Biochrom). Como controles, se utilizaron dos sueros incluidos en el kit que eran positivos y negativos a la presencia de autoanticuerpos frente a p53. La representación de los datos se hizo empleando los valores de la media ± SEM.

27.2. ELISA para EBNA1

Para determinar si la seroreactividad obtenida en los distintos ensayos era específica, se evaluó la seroreactividad de las muestras frente al antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr proteína

(EBNA1). EBNA1 es una proteína multifuncional y dimérica asociada a la cápside del virus Epstein-Barr, y sirve como control interno del ensayo ya que se estima que más del 96% de la población posee anticuerpos frente a ella [258]. De esta forma, se puede saber si los ensayos de seroreactividad se han llevado a cabo correctamente ya que debería haber señal en la mayoría de las muestras y, además, esta señal no debe ser diferencial entre grupos.

Para la medición de anticuerpos frente a EBNA1, se tapizaron placas Maxisorp de 96 pocillos transparentes (Nunc) durante toda la noche a 4°C con 0.05 µg de EBNA1 (Protein Alternatives S.L.) en 50 µl de PBS. Después, se lavaron los pocillos 4 veces con 200 µl de PBST 0.1% (v/v) y se dejaron bloqueando los pocillos 1 h a 37°C con 200 µl de 3% leche desnatada (p/v) en PBST 0.1% (v/v). Tras el bloqueo, se incubaron las muestras toda la noche a 4°C con los plasmas de estudio diluidos 1:300 en 3% leche-PBST 0.1%. Tras la incubación con los plasmas, se lavaron las placas y se dejaron 1 h a 37°C con 50 µl de un anticuerpo secundario acoplado a HRP que reconoce IgGs humanas (Jackson) diluido 1:10000. La señal colorimétrica se obtuvo añadiendo 50 µl de una mezcla de citrato con o-fenilendiamina (OPD) (en 10 ml de citrato se añaden 6.3 mg de OPD (Sigma Aldrich) y 16 µl de H₂O₂ (Sigma Aldrich)) y parando la reacción con 50 µl de 3 N ácido sulfúrico. La señal colorimétrica se midió a 492 nm utilizando los lectores de placa *Biochrom EZ Read 400 microplate reader* (Biochrom) o *The Spark multimode microplate reader* (Tecan Trading AG).

27.3. ELISA luminiscente empleando esferas magnéticas y proteínas expresadas a partir de extractos celulares de HeLa

La evaluación del potencial diagnóstico de la presencia de autoanticuerpos frente a los antígenos identificados mediante IP acoplada a LC-MS/MS (Artículo 2) y de autoantígenos de CCR previamente descritos (Artículo 6) se llevó a cabo mediante inmunoensayos empleando esferas magnéticas (MBs) modificadas para su unión covalente a HaloTag.

27.3.1. Inmunoensayo para la evaluación del potencial diagnóstico de los autoanticuerpos identificados mediante IP acoplada a LC-MS/MS

Para evaluar la presencia de autoanticuerpos en plasma de pacientes y su potencial diagnóstico, se llevaron a cabo ensayos de luminiscencia. Para ello, se utilizaron 0.67 µl de cada reacción de expresión *in vitro* y se incubaron a 4°C y 1000 rpm durante toda la noche con 0.5 µl de MBs de 50–80 µm de diámetro *Magne® HaloTag® Beads* (Promega) que unen HaloTag covalentemente. Como control negativo, se utilizó la proteína HaloTag.

Estas esferas se equilibraron previamente con 4 lavados del tampón de equilibrio PBST 0.05% Triton X-100 (EB) haciendo uso de un imán que las separa de la disolución en la que se encuentran. Tras la incubación toda la noche con la expresión *in vitro*, se lavan las esferas 4 veces, antes de bloquearlas 1 h a temperatura ambiente y 1000 rpm con *SuperBlock* (Pierce), se eluyen las uniones no covalentes inespecíficas mediante un último lavado de 5 min a temperatura ambiente y agitación con 100 µL de 0.1 M glicina pH 2.7. Tras finalizar la hora de bloqueo, se dividen las esferas magnéticas y se añaden en placas de 96 pocillos opacas (*Bio-Plex 96-well plates*; BioRad) para incubarlas con las muestras a analizar (*pools* y plasmas individuales) empleando las diluciones indicadas en 3% (p/v) BSA y PBST 0.1% (v/v). Al día siguiente, se lavan los pocillos 4 veces y se incuban 1 h con una dilución 1:10000 en 3% (p/v) BSA y PBST 0.1% (v/v) de un anticuerpo conjugado a HRP que reconoce IgGs humanas (Jackson). Este anticuerpo reconoce la unión de autoanticuerpos de los plasmas analizados a las proteínas tapizadas en las esferas magnéticas. Alternativamente, para verificar la correcta inmovilización de las proteínas en las esferas magnéticas, éstas se incuban *overnight* con un anticuerpo

monoclonal anti-HaloTag (Promega) o anticuerpos específicos y, tras 4 lavados, se incuban 1 h a temperatura ambiente con su anticuerpo secundario correspondiente a su dilución específica (Tabla 9) y conjugado a HRP. En ambos casos, a la hora de desarrollar la señal luminiscente, se añaden 50 µl del *SuperSignal ELISA Pico Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce) durante 1 min. La señal se recoge empleando el lector de placas *The Spark multimode microplate reader* (Tecan Trading AG).

El análisis estadístico de los resultados (recogidos en unidades relativas de luminiscencia -RLU-) se llevó a cabo empleando Microsoft Office Excel y el programa R (versión 3.2.3). Se evaluó la distribución de los datos empleando la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Bartlett. Al descartarse la normalidad de los datos, la evaluación estadística de las diferencias de niveles entre grupos se hizo mediante la prueba no paramétrica de U-Mann Whitney asumiendo varianzas desiguales. Los *p*-valores < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. La capacidad diagnóstica de las proteínas de forma individual y en conjunto se realizó mediante curvas ROC, obteniéndose los valores maximizados de sensibilidad y especificidad, mediante el programa R (versión 3.2.3) el paquete Epi [257].

27.3.2. Inmunoensayo para la evaluación del potencial diagnóstico de autoanticuerpos previamente identificados mediante estudios proteómicos

Para evaluar si la expresión *in vitro* de proteínas basado en extractos celulares de HeLa era adecuada para la obtención de antígenos de CCR previamente descritos, pero con dificultades a la hora de su uso en ensayos diagnósticos por su dificultad de expresión o por su fácil degradación se evaluó su potencial diagnóstico acoplando este sistema de expresión a las esferas magnéticas para la obtención de una señal luminiscente. Para ello, se siguió el mismo esquema de trabajo que el descrito en el apartado anterior, pero con algunas modificaciones. Dado que los resultados que se obtuviesen se iban a comparar con los obtenidos con un sensor electroquímico (ver Artículos 5 y 6), se modificó levemente el protocolo descrito para asemejarse lo máximo posible al del sensor (apartado 30). Para ello, en vez de colocar las esferas magnéticas en placas opacas después del bloqueo, se esperó hasta el último paso para su trasvase a las placas, ya que el ensayo del sensor ocurre en tubos hasta su medición. Además, como anticuerpo secundario marcado a HRP que reconoce IgGs humanas se utilizó el de la casa comercial de Dako diluido 1:3000 en 3% BSA (p/v) y PBST 0.1% (v/v). El reactivo de luminiscencia empleado fue el *SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce).

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando Microsoft Office Excel y el programa R (versión 3.2.3). La estadística se llevó a cabo con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, considerándose significativos los *p*-valores < 0.05. La capacidad diagnóstica de las proteínas de manera individual y combinada se evaluó mediante curvas ROC, calculándose su área debajo de la curva (AUC) y sensibilidad y especificidad máxima a través del paquete Epi del Programa R (versión 3.2.3) [257].

27.3.3. Inmunoensayo para la evaluación de la seroreactividad diferencial de PTPRN y sus dominios

Para evaluar si PTPRN poseía expresión diferencial entre pacientes sanos, pacientes de CCR, pacientes diabéticos o pacientes diabéticos con CCR, se llevó a cabo el mismo inmunoensayo descrito en el apartado 27.3.1. Además, se evaluó la seroreactividad de los dominios ICD y ECD para identificar el que aportaba la mayor diferencia de seroreactividad. Los niveles de reconocimiento se compararon con los de p53.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando Microsoft Office Excel y el programa R (versión 3.2.3). La estadística se llevó a cabo con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, considerándose significativos los p -valores < 0.05 . La capacidad diagnóstica de las proteínas de manera individual y combinada se evaluó mediante curvas ROC, calculándose su área debajo de la curva (AUC) y sensibilidad y especificidad máxima a través del paquete Epi del Programa R (versión 3.2.3) [257].

27.4. ELISA luminiscente empleando proteínas expresadas a partir de extractos de eritrocitos de conejo

Para detectar la presencia de autoanticuerpos frente a p73 y sus isoformas, se diluyó 1:10 el producto de la expresión *in vitro* con PBS. Se transfirieron 50 μ l de la dilución a placas Maxisorp (Nunc) previamente tapizadas toda la noche a 4°C con 50 μ l de un anticuerpo policlonal anti-GST (GE Healthcare) (Tabla 9) diluido 1:100 en PBS. Se lavaron las placas 5 veces con PBST 0.1% y se bloquearon los pocillos durante 2 h con solución de bloqueo Superblock (Pierce) diluido 1:1 en PBS. Tras el bloqueo, se incubaron los pocillos durante 1 h a temperatura ambiente con los plasmas diluidos 1:300 en 3% de leche-PBST 0.1%. Tras tres lavados, se incubaron los pocillos con 50 μ l de un anticuerpo acoplado a HRP que reconoce IgGs humanas (Jackson) diluido 1:10000 en 3% de leche-PBST 0.1%. Alternativamente, para detectar la presencia de las proteínas, los pocillos se incubaron con anticuerpos monoclonales frente a GST (Cell Signaling) o p73 (Pierce) a las diluciones indicadas (Tabla 9) seguido de una incubación con un anticuerpo secundario acoplado a HRP que reconoce las IgGs de ratones (Sigma Aldrich) diluido 1:3000 en 3% de leche-PBST 0.1%. La señal se desarrolló empleando 50 μ l de *SuperSignal ELISA Femto Max Sensitivity* (Pierce, Rockford, IL) por pocillo y se recogió con el *FLUOstar Optima* (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany).

El análisis estadístico de los resultados (recogidos en RLU) se llevó a cabo empleando Microsoft Office Excel y el programa R (versión 3.2.3). Se evaluó la distribución de los datos empleando la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Bartlett. Al descartarse la normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas, la evaluación estadística de las diferencias de niveles entre grupos se hizo mediante la prueba no paramétrica de U-Mann Whitney asumiendo varianzas desiguales. Los valores se representaron como los valores de la media sin los *outliers* (*trimmed mean*) $\pm$ error estándar de la media (SEM). Los p -valores < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. La capacidad diagnóstica de las proteínas de forma individual y en conjunto se realizó mediante curvas ROC, obteniéndose los valores maximizados de sensibilidad y especificidad, mediante el programa R (versión 3.2.3) y el paquete Epi [187].

27.5. ELISA de inhibición

Para confirmar la seroreactividad selectiva y específica de los individuos frente a alguna de las isoformas de p73, se llevaron a cabo ensayos de ELISA luminiscente de inhibición. Para ello, se incubaron a 4°C y durante toda la noche en agitación 0.5 μ l de las esferas magnéticas previamente equilibradas (*ver apartado 27.3*) con 0.1 μ g de las proteínas p73, Δ Np73 α y Δ Np73 β fusionadas a HaloTag y 6xHis obtenidas a partir de su expresión en bacteria. De esta forma, las proteínas se anclan covalentemente a las esferas magnéticas funcionalizadas con cloroalcano. Tras la incubación, se lavaron las esferas siguiendo el protocolo descrito en el *apartado 27.3* y, tras la elución de proteínas unidas inespecíficamente con 0.1 M glicina pH 2.7, se bloquearon con 3% BSA-PBST 0.1%. Tras el bloqueo, se incubaron con *pools* de plasmas de pacientes seroreactivos a Δ Np73 α o Δ Np73 β diluidos 1:200 y previamente preincubados con 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g y 0.01 μ g de p73, Δ Np73 α o Δ Np73 β durante 2 h a temperatura ambiente. La

seroreactividad frente a p73 y EBNA1 (*ver apartado 27.2*) se emplearon como control del ensayo y de especificidad del estudio, respectivamente. Tras incubarse con los sueros, se obtuvo y cuantificó la señal luminiscente siguiendo los pasos descritos en el *apartado 27.3*.

28. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

El efecto de la sobreexpresión de Δ Np73 en la metástasis se evaluó *in vivo* empleando 10 ratones hembra *nude*^{-/-} inmunodeprimidas de 6 semanas de edad en colaboración con la Dra. Gemma Domínguez. A estos ratones, se les inocularon 10⁶ células HCT116-control o HCT116- Δ Np73 en la vena de la cola y, tras tres semanas, se sacrificaron para evaluar la presencia de metástasis en pulmón, riñón e hígado.

Estos procedimientos se llevaron a cabo siguiendo la legislación vigente y fueron aprobados por el *Institutional Organism for Animal Welfare* (OEBA).

29. MICROARRAYS DE TEJIDO E INMUNOHISTOQUÍMICA

Para evaluar la desregulación proteica de las proteínas identificadas en los ensayos de inmunoprecipitación acoplada a MS, se empleó un microarray de tejido que contenía 50 muestras de pacientes de CCR metastásicos y no metastásicos. Además, también se hizo uso de un microarray de tejido con 94 muestras de pacientes con CCR en estadio II divididos en pacientes recurrentes y no recurrentes de CCR. Se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica empleando diluciones óptimas de los anticuerpos indicados (Tabla 9). La visualización e inmunoreactividad se llevó a cabo siguiendo protocolos establecidos [153, 154, 218, 259], en colaboración con la Dra. María Jesús Fernández Aceñero.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando Microsoft Office Excel y el programa R (versión 3.2.3). Se evaluó la distribución de los datos empleando la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Bartlett. Al descartarse la normalidad de los datos, la evaluación estadística de las diferencias de niveles entre grupos se hizo mediante la prueba no paramétrico de U-Mann Whitney asumiendo varianzas desiguales. Los *p*-valores < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. La capacidad diagnóstica de las proteínas de forma individual y en combinación se realizó mediante curvas ROC, obteniéndose los valores maximizados de sensibilidad y especificidad, mediante el programa R (versión 3.2.3) y el paquete Epi [187].

30. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

Como prueba de concepto del desarrollo de una plataforma de diagnóstico de uso en clínica para la evaluación de la presencia de autoanticuerpos específicos de CCR, se desarrolló un inmunosensor electroquímico basado en el uso de esferas magnéticas modificadas (MBs) para la unión covalente del HaloTag y un sistema de expresión *in vitro* que permite la expresión de autoantígenos en poco tiempo, funcionales y con *a priori* estructura 3D correctamente producida. Las MBs que se usaron fueron las mismas empleadas en el desarrollo del ELISA luminiscente (*apartado 27.3*). El sistema de expresión empleado es el descrito previamente en los *apartados 21.1 y 21.2*, basados en el uso de extractos de células HeLa y reticulocito de conejo, aportando los primeros un mejor rendimiento a la hora de la producción de los autoantígenos.

30.1. Aparatos y electrodos empleados para el desarrollo de inmunosensores electroquímicos

Las mediciones amperométricas se llevaron a cabo empleando un potencióstato CHI812B (CH Instruments) controlado por el software CHI812B, en colaboración con los Dres. José Manuel Pingarrón y Susana Campuzano. Como transductores de la señal, se emplearon electrodos

recubiertos de carbono (*Screen-printed carbon electrodes*; SPCEs) (DRP-110, DropSens) consistentes en un electrodo de 4mm de diámetro, un contra-electrodo y una pseudoreferencia de Ag. Como interfase entre los SPCEs y el potenciostato, se usó un cable conector específico (DRP-CAC, DropSens, S.L.). Para separar las MBs que contienen las proteínas de interés inmovilizadas y su incubación con las distintas disoluciones, se empleó un imán *DynaMag-2 Magnet* (Invitrogen) y un agitador de microtubos *MixMate microtube mixer* (Eppendorf), respectivamente. La captura de las MBs modificadas en la superficie del SPCE se controló con un imán *neodymium magnet* (AIMAN GZ) embebido en una carcasa de Teflón hecha en el laboratorio.

30.2. Puesta a punto del sensor electroquímico mediante la detección de autoanticuerpos frente a p53

Antes del desarrollo del sensor electroquímico como herramienta diagnóstica alternativa del CCR, se diseñó una prueba de concepto para la medición de autoanticuerpos frente a p53, por ser el autoantígeno por excelencia en cáncer.

Para la inmovilización de las proteínas en las MBs a través del HaloTag, se mezclaron 1.8 µl del producto de expresión *in vitro* del sistema de reticulocitos (para su puesta a punto con p53, p63 y p73) o 0.67 µl del producto de expresión *in vitro* empleando extractos de células HeLa (desarrollo final del sensor) con 1 µl de las MBs durante 2 h a temperatura ambiente y 800 rpm siguiendo las indicaciones del *apartado 27.3* para el equilibrado previo de las MBs. Se lavaron las esferas como se ha mencionado anteriormente y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo Superblock (Thermo Fisher Scientific) diluida 1:1 en PBS. Tras el bloqueo, se incubaron las esferas con 50 µl de los plasmas a las diluciones indicadas (*Artículo 5*) y 800 rpm de forma que, si hay autoanticuerpos presentes frente a las proteínas inmovilizadas, se quedan retenidos. Tras la incubación, se lavan las MBs y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente y 800 rpm con un anticuerpo secundario acoplado a HRP que reconoce a las IgGs de humanos (Dako) a una dilución 1:3000 en 3% leche (p/v) y PBST 0.1% (v/v). Como medida control, se incubaron las proteínas p53, p63 y p73 con el anticuerpo frente al HaloTag (Promega) y anticuerpos específicos frente a p53 (BD y SCBT) y p73 (R&D Systems). Posteriormente, se incubaron 30-60 min con anticuerpos secundarios conjugados a HRP diluidos 1:1000 (Tabla 9). Las medidas amperométricas se obtuvieron empleando SPCEs desechables mediante la captura de las MBs en el electrodo manteniendo los SPCEs de forma horizontal sobre el imán. El imán que contenía los SPCE con las MBs se sumergió en una célula electroquímica con 10 ml de 0.05 M de tampón fosfato (pH 6.0) y 1.0 mM de hidroquinona (HQ) (Sigma Aldrich) preparada en el momento de la medición. La medición de la señal amperométrica se consiguió agitando las disoluciones y aplicando un potencial de detección de -0,20V frente al electrodo de Ag de pseudoreferencia al añadir 50 µl de 0.1 M de H₂O₂ (Sigma Aldrich). Se recogió la señal durante 60 s (para establecer la línea base) y 120 s (para alcanzar una corriente estable) antes y después de añadir la solución de H₂O₂, respectivamente. Este proceso dio lugar a las reacciones electroquímicas y a una señal analítica directamente proporcional a la cantidad de autoanticuerpos en la muestra. Para cada muestra se hicieron dos réplicas como mínimo. Como control positivo y negativo, se empleó un *pool* de cuatro plasmas positivos a autoanticuerpos frente a p53 y un *pool* de cuatro plasmas negativos a autoanticuerpos frente a p53, respectivamente. Como medida comparativa, las MBs usadas para su medición mediante el sensor electroquímico, se situaron en placas opacas *Maxisorp 96-well plates* (Nunc) junto con 100 µl de *SuperSignal ELISA Fento Maximum Sensitivity Substrate*

(Pierce, 240 Rockford, IL) para desarrollar una señal luminiscente recogida y cuantificada por el *FLUOstar Optima* (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany).

Todas las muestras se midieron por duplicado. Los valores correspondientes a la señal amperométrica se corresponden a la diferencia entre las señales de los plasmas incubados con la proteína acoplada al HaloTag y la señal obtenida a partir de los plasmas incubados en ausencia de autoantígeno. La representación de los datos se hizo empleando los valores de la media $\pm$ SEM.

30.3. Desarrollo del sensor para la detección múltiple de autoanticuerpos específicos de CCR

El concepto del diseño del inmunosensor electroquímico para la detección de autoanticuerpos específicos de CCR (GTF2B, MAPKAPK3, PIM1, PKN1, SRC, STK4 y SULF1) fue el mismo que el descrito en el apartado anterior con algunas modificaciones. La expresión de las proteínas se llevó a cabo empleando el sistema de expresión *in vitro* basado en los extractos de células HeLa, ya que se observó un mejor rendimiento a la hora de producir las proteínas. Para verificar la correcta inmovilización de las proteínas, se emplearon anticuerpos específicos frente al HaloTag (Promega), y frente a MAPKAPK3, SRC y p53 (Tabla 9). Posteriormente, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con sus correspondientes anticuerpos secundarios diluidos 1:3000 o 1:1000. Las mediciones amperométricas de las muestras de plasmas y anticuerpos se realizaron con el sistema HQ/H₂O₂ en los SPCEs. Como controles se usaron los vectores de expresión modificados pJFT7_nHalo y pANT7_cHalo que permitían expresar HaloTag.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando Microsoft Office Excel y el programa R (versión 3.2.3). La estadística se llevó a cabo con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, considerándose significativos los *p*-valores < 0.05. La capacidad diagnóstica de las proteínas de manera individual y combinada se evaluó mediante curvas ROC, calculándose su área debajo de la curva (AUC) y sensibilidad y especificidad máxima a través del paquete Epi del Programa R (versión 3.2.3) [257].

RESULTADOS

BLOQUE 1

Identificación y validación funcional de biomarcadores de cáncer colorrectal mediante técnicas proteómicas.

En este primer bloque de la Tesis Doctoral, el trabajo se centró en la búsqueda de proteínas desreguladas en CCR mediante técnicas proteómicas. Por un lado, se buscaron proteínas desreguladas como consecuencia de la sobreexpresión de Δ Np73 combinando la espectrometría de masas y los microarrays de anticuerpos (**Artículo 1**). Por otro lado, se buscaron nuevos autoantígenos de CCR mediante inmunoprecipitación acoplada a LC-MS/MS (**Artículo 2**). El fin último de esta parte de la Tesis Doctoral fue ampliar el catálogo de proteínas desreguladas asociadas a CCR que puedan considerarse biomarcadores de la patología para ayudar a su diagnóstico temprano e identificar posibles dianas terapéuticas.

El **Artículo 1**, titulado *In-depth Proteomics Characterization of Δ Np73 Effectors Identifies Key Proteins with Diagnostic Potential Implicated in Lymphangiogenesis, Vasculogenesis and Metastasis in Colorectal Cancer* se encuentra actualmente enviado a publicar.

Por otra parte, el **Artículo 2**, titulado *Identification of tumor-associated antigens with diagnostic ability of colorectal cancer by in-depth immunomic and seroproteomic analysis*, se encuentra publicado en la revista *Journal of Proteomics*.

Artículo 1

In-depth Proteomics Characterization of Δ Np73 Effectors Identifies Key Proteins with Diagnostic Potential Implicated in Lymphangiogenesis, Vasculogenesis and Metastasis in Colorectal Cancer.

El CCR es el tercer tipo de cáncer más frecuente y el segundo más letal en los países desarrollados. Entre las alteraciones descritas que conducen a su formación, se encuentra la desregulación en la familia de proteínas p53. Entre ellas, Δ Np73 (isoforma de p73) posee propiedades oncogénicas contrapuestas a las funciones de TAp73 y p53. Sin embargo, se tiene poca información sobre los efectores o moléculas implicadas en sus vías de señalización. En este trabajo, se ha caracterizado mediante proteómica el control transcripcional regulado por Δ Np73 del secretoma de las células HCT116 de cáncer de colon humanas. Para ello, se analizó el secretoma de células transfectadas con Δ Np73 y control mediante microarrays de anticuerpos de alta densidad y proteómica cuantitativa (SILAC) para la identificación de efectores de Δ Np73. En total, se identificaron 51 proteínas desreguladas, observándose una importante asociación entre la sobreexpresión de Δ Np73 y los procesos de linfangiogénesis, vasculogénesis y metástasis. Los resultados se validaron mediante PCR semicuantitativa, ELISA, dot-blot y WB. Además, se seleccionaron proteínas para su evaluación como posibles biomarcadores en plasma empleando 60 muestras de pacientes con cáncer de colon, individuos premalignos e individuos control con colonoscopia negativa. Entre dichas proteínas, destacó la capacidad de BDNF de discriminar con elevada sensibilidad y especificidad entre pacientes con cáncer colorrectal e individuos con lesiones colorrectales premalignas de los individuos control.

Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con Javier Rodríguez Cobos y la Dra. Gemma Domínguez (IIB-UAM). En este trabajo, he participado en el análisis proteómico, en el análisis bioinformático de los datos proteómicos y la validación de las muestras mediante WB, dot-blot y PCR semicuantitativa. Además, evalué el potencial diagnóstico de los efectores identificados mediante ELISA y llevé a cabo el análisis estadístico de los datos. Participé en la escritura y revisión del manuscrito.

Este trabajo se encuentra actualmente enviado a publicar.

Artículo 2

Identification of tumor-associated antigens with diagnostic ability of colorectal cancer by in-depth immunomic and seroproteomic analysis.

El diagnóstico del CCR en etapas tempranas mejoraría considerablemente la supervivencia de los pacientes. En este sentido, se ha demostrado que la respuesta inmune humoral permite el diagnóstico temprano de los pacientes con cáncer, ya que su aparición se adelanta hasta 3 años a los síntomas clínicos. En este trabajo, empleamos técnicas seroproteómicas para identificar proteínas capaces de producir una respuesta inmune humoral en pacientes con CCR. Para ello, se emplearon autoanticuerpos de pacientes de CCR para inmunoprecipitar proteínas de líneas celulares de CCR para su posterior identificación mediante LC-MS/MS. Tras el análisis de los datos obtenidos por proteómica mediante herramientas bioinformáticas, nos centramos en 31 posibles dianas de autoanticuerpos para su posterior estudio. El análisis mediante WB e IHC de ERP44 y TALDO1 permitió demostrar su potencial discriminatorio estadísticamente significativo entre pacientes libres de enfermedad y pacientes con metástasis, y de acuerdo con el tiempo hasta la recurrencia de pacientes con CCR en estadio II. Mediante el análisis de la seroreactividad empleando muestras de 30 individuos sanos, 28 individuos premalignos y 32 pacientes con CCR, se vio que 9 de las 13 proteínas seleccionadas para su validación podían discriminar entre pacientes con CCR o premalignos e individuos control con significancia estadística. Por tanto, estos resultados sugieren que los autoanticuerpos descritos en este trabajo deberían incluirse en paneles para la detección de CCR utilizando muestras de sangre.

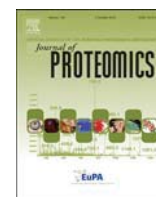
Este trabajo se presenta como parte de la Tesis Doctoral con el consentimiento del resto de coautores. Durante el estudio, llevé a cabo la inmunoprecipitación de las proteínas, el análisis bioinformático de los datos proteómicos, la validación de las muestras mediante WB y PCR semicuantitativa, el análisis de los resultados de IHQ y los estudios de seroreactividad para evaluar el potencial diagnóstico de las muestras mediante pruebas estadísticas. Además, participé en la escritura y revisión del manuscrito.

Este estudio se publicó en el Journal of Proteomics. 2020;214:103635. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103635. Epub 2020 Jan 7.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Identification of tumor-associated antigens with diagnostic ability of colorectal cancer by in-depth immunomic and seroproteomic analysis

María Garranzo-Asensio^a, Pablo San Segundo-Acosta^{a,b}, Carmen Povés^c,
 María Jesús Fernández-Aceñero^d, Javier Martínez-Useros^e, Ana Montero-Calle^a,
 Guillermo Solís-Fernández^a, Maricruz Sanchez-Martinez^a, Nuria Rodríguez^f,
 María Ángeles Cerón^d, Servando Fernandez-Diez^c, Gemma Domínguez^g, Vivian de los Ríos^h,
 Alberto Peláez-Garcíaⁱ, Ana Guzmán-Aránguez^b, Rodrigo Barderas^{a,*}

^a Chronic Disease Programme, UFIEC, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda E-28220, Madrid, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

^c Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040 Madrid, Spain

^d Surgical Pathology Department, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040 Madrid, Spain

^e Translational Oncology Division, OncoHealth Institute, Fundación Jiménez Díaz University Hospital, E-28040 Madrid, Spain

^f Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, E-28046 Madrid, Spain

^g Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, E-28029 Madrid, Spain

^h Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, E-28040 Madrid, Spain

ⁱ Surgical Pathology Department, Hospital Universitario La Paz, E-28046 Madrid, Spain

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the second leading cause of cancer related death worldwide. Its diagnosis at early stages would significantly improve the survival of CRC patients. The humoral immune response has been demonstrated useful for cancer diagnosis, predating clinical symptoms up to 3 years. Here, we employed an in-depth seroproteomic approach to identify proteins that elicit a humoral immune response in CRC patients. The seroproteomic approach relied on the immunoprecipitation with patient-derived autoantibodies of proteins from CRC cell lines with different metastatic properties followed by LC-MS/MS. After bioinformatics, we focused on 31 targets of CRC autoantibodies. After WB and IHC validation, ERP44 and TALDO1 showed potential to discriminate disease-free and metastatic CRC patients, and time to recurrence of CRC patients in stage II. Using plasma samples of 30 healthy individuals, 28 premalignant individuals, and 32 CRC patients, nine out of 13 selected targets for seroreactive analysis showed significant diagnostic ability to discriminate either CRC patients or premalignant subjects from controls. Our results suggest that the here defined panel of CRC autoantibodies and their target proteins should be included in CRC blood-based biomarker panels to get a clinically useful blood-based diagnostic signature for CRC detection.

Significance: Colorectal cancer is one of the deadliest cancer types mainly due to its late diagnosis. Its early diagnosis, therefore, is of great importance since it would significantly improve the survival of CRC patients. In our work, the in-depth seroproteomic analysis of colorectal cancer using isolated IgGs from colorectal cancer patients and controls and protein extract of colorectal cancer cells provide the identification of valuable biomarkers with diagnostic and prognostic ability of the disease.

1. Introduction

Colorectal cancer is the second cause of cancer death in Europe, mainly due to its late diagnosis. If CRC patients were early diagnosed, the percentage of treatable cured patients would greatly increase to 80–95% of patients. However, only around 37% of CRC patients are diagnosed at an early stage, leading to a drop in patient survival from 80 to 95% to 50 or even 6–10% for CRC diagnosis at stage III and IV respectively [1]. It is vital thus to improve the current scenario for early CRC detection consequently increasing patient survival. In this sense,

evidence from several studies has shown that CRC screening is effective and economical in average-risk population [2]. Therefore, the development of accurate blood-based biomarker panels is mandatory for the early diagnosis of the disease.

The humoral immune response has been proven to play an important role in CRC. Indeed, numerous tumor-associated antigens (TAAs) target of autoantibodies produced by the immune system of CRC patients have been identified by protein microarrays-based proteomic techniques [3]. Since autoantibodies can be detected at early cancer stages, they can be exploited to increase the percentage of CRC patients

* Corresponding author.

E-mail address: r.barderasm@isciii.es (R. Barderas).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103635>

Received 19 September 2019; Received in revised form 2 January 2020; Accepted 5 January 2020

Available online 07 January 2020

1874-3919/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

early diagnosed [4]. However, new biomarkers and diagnostic platforms are needed to reach enough sensitivity and specificity to get a clinically useful blood-based diagnostic signature of CRC based on autoantibodies.

Up to date, CRC TAAs have been mainly identified through protein microarrays-based proteomic techniques such as natural and recombinant protein microarrays and phage microarrays [5,6]. Such techniques are mainly hindered by the limited identification of dysregulated proteins to those printed onto the array. Unfortunately, the set of proteins that can be found in commercial microarrays encompasses only between 50% to 66% of all human proteins without their PTMs and proteoforms. Then, whether the missing proteins are potential CRC biomarkers cannot be evaluated.

In our aim to extend the number of identified CRC TAAs, we set up an immunomic and seroproteomic approach to find protein targets of CRC patients' autoantibodies (IgGs) using CRC cell lines protein extracts. Immunoprecipitated proteins bound to CRC IgGs were identified by LC-MS/MS using a Q-exactive and screened by bioinformatics to find actual targets of CRC autoantibodies. A total of 13 out of 79 proteins identified as potential targets of CRC IgGs were selected for validation by: i) extensive meta-analysis to determine their potential dysregulation in CRC, ii) WB and IHC to determine if their potential dysregulation could be associated to prognosis of CRC patients, and iii) seroreactive analysis to determine their diagnostic effectiveness using a collection of 80 individual plasma samples of healthy individuals, premalignant subjects with low- and high-grade colorectal adenomas, and CRC patients. In this sense, it was demonstrated that 9 out of the 13 selected proteins for validation were actual targets of CRC IgGs, with significant diagnostic ability to discriminate either CRC patients at late stages or premalignant subjects from control individuals.

2. Material and methods

2.1. Colorectal cancer cell culture and lysate production

SW480 and SW620 cell lines from the American Type Culture Collection cell repository, and KM12C and KM12SM cell lines from I. Fidler's laboratory (MD Anderson Cancer Center), were grown according to established protocols. For protein extract preparation, cells were lysed with RIPA buffer (Sigma) containing protease inhibitors.

2.2. Immunoprecipitation of protein targets of IgGs from CRC patients

Plasma pools (100 µl) containing three and five plasma samples from CRC patients at stages III and IV, respectively (CRC pool), or eight plasma from healthy individuals with negative colonoscopy (healthy pool) were used (Table 1; Supplementary Table S1). For IgG isolation, plasma pools were separately incubated in 600 µl 20 mM sodium phosphate pH 7 with 200 µl of protein G agarose beads for 90 min at room temperature and gentle rotation. After incubation, protein G agarose beads were washed six times with 600 µl 20 mM sodium phosphate pH 7. Bound IgGs were then eluted with 300 µl 0.1 M glycine pH 2.7, and neutralized with 1 M Tris pH 8.8. Isolated IgGs were visualized by Coomassie Blue staining after SDS-PAGE, and its concentration measured.

Next, 200 µg of purified IgGs from healthy and CRC pools were separately incubated during 2 h with 100 µl of protein G agarose beads in 600 µl of TBS buffer pH 7.4. Then, beads were washed with 200 mM triethanolamine pH 8.9 prior to the covalent binding of the IgGs to the agarose beads with 50 mM DMP for 1 h at room temperature at 25 rpm. Then, beads were washed with 600 µl of triethanolamine and blocked with 600 µl of ethanolamine, and non-covalently bound IgGs eluted with 400 µl of 0.1 M glycine in 2 M urea pH 2.7, and equilibrated afterwards with 100 µl of TBS buffer pH 7.4. Then, for immunoprecipitation of seroreactive proteins, 5 mg of CRC cells protein extracts were pre-cleaned using 20 µl of Protein G agarose beads

Table 1

Summary of the plasma samples used in the study.

Autoantigen Discovery			
	Sample number	Age (Median $\pm$ SD in years)	Male / Female
CRC (Stage III)	3	79 $\pm$ 5	3/0
CRC (Stage IV)	5	68 $\pm$ 5	1/4
Control	8	41 $\pm$ 4	3/5

Autoantigen Validation ^a			
	Sample number	Age (Median $\pm$ SD in years)	Male / Female
CRC	32	66 $\pm$ 12	15/17
Premalignant	18	59 $\pm$ 7	12/6
Control	30	51 $\pm$ 10	12/18

^a For a full description of these samples see [Supplementary Table S1](#).

previously equilibrated in RIPA buffer, and then incubated overnight with the healthy IgGs covalently bound to beads. Next, the pre-cleaned protein extract was collected and the beads with IgGs from healthy individuals were washed ten times with 600 µl of washing buffer (TBS-0.2% triton). Beads were then centrifuged, and bound proteins eluted with 100 µl 0.1 M glycine pH 2.7 and subsequently neutralized with 20 µl of 2 M ammonium bicarbonate pH 8.8.

Finally, for the identification of proteins seroreactive to CRC patients IgGs, the pre-cleaned extract was incubated with the agarose beads covalently bound with the CRC patients IgGs, and proteins were eluted as above described. For protein identification by LC-MS/MS, 50% of the eluted content was concentrated onto a SDS-PAGE and in-gel digested with trypsin according to established protocols [7–11].

2.3. LC-MS/MS analysis

All peptide separations were carried out on an Easy-nLC 1000 nano system (Thermo Scientific). For each analysis, samples were loaded into a precolumn Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific) and eluted in a RSLC PepMap C18, 15 cm long, 50 µm inner diameter and 2 µm particle size (Thermo Scientific). The mobile phase flow rate was 300 nl/min using 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). The gradient profile was set as follows: 0%–35% solvent B for 90 min, 35%–100% solvent B for 4 min, 100% solvent B for 8 min. Four microliters of each sample were injected.

MS analysis was performed using a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific). For ionization, 2000 V of liquid junction voltage and 270 °C capillary temperature were used. The full scan method employed a m/z 400–1500 mass selection, an Orbitrap resolution of 70,000 (at m/z 200), a target automatic gain control (AGC) value of 3e6, and maximum injection times of 100 ms. After the survey scan, the 15 most intense precursor ions were selected for MS/MS fragmentation. Fragmentation was performed with a normalized collision energy of 27 and MS/MS scans were acquired with a starting mass of m/z 100, AGC target was 2e5, resolution of 17,500 (at m/z 200), intensity threshold of 8e3, isolation window of 2 m/z units and maximum IT was 100 ms. Charge state screening was enabled to reject unassigned, singly charged, and greater than or equal to seven protonated ions. A dynamic exclusion time of 20s was used to discriminate against previously selected ions.

2.4. MS data analysis

MS data were analyzed with Proteome Discoverer (version 1.4.1.14) (Thermo Scientific) using standardized workflows. Mass spectra *.raw files were searched against SwissProt_2016_10.fasta, *Homo sapiens* (human) database (20,121 sequences protein entries) using Mascot

(version 2.6.0, Matrix Science) search engine. Precursor and fragment mass tolerance were set to 10 ppm and 0.02 Da, respectively, allowing 2 missed cleavages, carbamidomethylation of cysteines as fixed modification, and methionine oxidation, Acetyl (N-term) and Phosphorylation (S, T, Y) as variable modifications. Identified peptides were filtered using Percolator algorithm with a q-value threshold of 0.01 [12].

2.5. Bioinformatics analysis

Identified proteins appearing in > 10% of agarose-based immunoprecipitation experiments reported in CRAPome (Contaminant Repository for Affinity Purification Mass Spectrometry Data) data base were considered false positives [13]. Bioinformatics analysis of proteins passing this criterion was performed using STRING and IPA Analysis (Ingenuity Systems) to identify altered networks and pathways [14]. STRING Version 9.1 and MCL clustering enrichment 2 with the default 0.4 confidence score were used to identify the interacting partners in the dataset.

To examine whether protein or genetic alterations associated to CRC had been previously associated with identified proteins out of CRAPome, we performed extensive meta-analysis using the Oncomine [15], UALCAN [16], and cBioPortal [17] databases, which give information on differential protein expression, heatmaps of selected dysregulated genes, and identified genetic alterations in tumor tissue samples, respectively. To evaluate whether the identified proteins had been previously associated with disease prognosis, information was retrieved from the Human Protein Atlas [18,19].

2.6. Gateway plasmid construction, gene cloning, DNA preparation and protein expression

Sequence-verified, full-length cDNA plasmid containing selected targets for validation (Supplementary Table S2) in flexible pDONR221 or pENTR223 vectors was obtained from the publicly available DNASU Plasmid Repository [20]. The ORFs were transferred by LR clonase reactions (Invitrogen, Carlsbad, CA) to the pANT7_cHalo expression vector for *in vitro* protein expression to get the autoantigens expressed as fusion proteins to HaloTag in the C-terminal [21–23]. As controls, we also obtained the expression vectors for producing HaloTag protein. All donor and expression plasmids were sequence verified prior to a subsequent use.

Proteins were expressed using the 1-Step Human Coupled IVT Kit HeLa cell lysate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) as per manufacturer's recommendations.

2.7. RNA Extraction and semi-quantitative PCR

RNA was extracted from 5×10^7 cells with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized using the NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit, separate oligos (NZYTech). For semi-quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR), reactions were performed using specific primers (Supplementary Table S3) and the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer recommendations. PCR products were separated on 1.5% agarose gel containing GelRed (Biotium). GAPDH was used as internal control.

2.8. SDS-PAGE and WB analysis

SDS-PAGE and WB analyses were performed as previously reported [24]. Alternatively, 0.67 μ L of the *in vitro* protein extracts or 10 μ g of protein extracts were run in 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra). After blocking, membranes were incubated with optimized dilutions of indicated specific

monoclonal or polyclonal antibodies (Supplementary Table S4). Immunodetection on membranes was achieved by using HRP-conjugated secondary antibodies (Supplementary Table S4). Chemiluminescence signal was developed with ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) and detected on an Amersham Imager 680 (GE Healthcare).

2.9. Patient plasma

The Institutional Ethical Review Boards of the Instituto de Salud Carlos III, Hospital Clínico San Carlos (Madrid), and La Paz Hospital (Madrid) approved this study on biomarker discovery and validation (CEI PI 45). Plasma samples were obtained from the biobanks of the Hospital Clínico San Carlos (IdISSC) and La Paz Hospital (IdIPAZ), which belongs to the National Biobank Net (ISCIII) cofounded with FEDER funds, after approval of the Ethical Review Boards of these institutions. Written informed consent was obtained from all patients. Plasma samples were collected using a standardized sample collection protocol and stored at -80°C until use [4,25–27].

For seroreactive analysis, 32 plasma samples from CRC patients, 18 from premalignant subjects (low- or high-grade adenomas in the colon), and 30 from control individuals (asymptomatic individuals and negative colonoscopy individuals, or individuals with fecal occult blood test -FOBT- positive and negative colonoscopy) were used (Table 1; Supplementary Table S1).

2.10. Seroreactive analysis

HaloTag fusion proteins coupled to Magne HaloTag beads (MBs, Promega) and ELISA-like immunoassay was previously optimized to measure autoantibodies [11,22]. Briefly, for each reaction, a relation of 0.67 μ L of the *in vitro* protein expression was incubated with 0.5 μ L of MBs suspension overnight at 4°C for protein capture to MBs according to manufacturer instructions. For covalent binding, a mixture of the required amount of protein and MBs was made taking into account the number of replicates and measurements to be performed. After three washing steps with PBS, Triton X-100 0.05%, Tween 20 0.1% rocking for 5 min at 250 rpm, unbound proteins were removed adding 100 μ L of glycine 0.1 M pH 2.7 for 5 min at RT and 250 rpm shaking. Then, HaloTag fusion proteins immobilized in MBs were blocked with SuperBlock for 1 h and then transferred onto separate wells of Bio-Plex 96-well plates to perform subsequent incubations overnight with pooled or individual plasma samples at indicated dilutions in PBS supplemented with Tween 20 0.1% (v/v) and BSA 3% (w/v). After extensive washing as above, HRP-conjugated anti-human IgG antibody (Jackson) diluted 1:10000 in PBS supplemented with Tween 20 0.1% (v/v) and BSA 3% (w/v) was incubated to detect the presence of autoantibodies. Alternatively, to verify the TAA-HaloTag immobilization, HaloTag was detected with the monoclonal anti-HaloTag antibody (Promega) diluted 1:1000, followed by 1 h of incubation with HRP-conjugated anti-mouse IgG diluted 1:2500. To develop the chemiluminescence signal, MBs were incubated on black Maxisorp 96-well plates (Nunc) with 50 μ L of SuperSignal ELISA Pico Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) for 1 min. Then, signal was recorded on The Spark multimode microplate reader (Tecan Trading AG).

2.11. Tissue Microarrays and immunohistochemistry

Core tumor tissue samples from 50 metastatic and non-metastatic CRC patients and core tumor tissue samples from 94 recurrent or non-recurrent CRC stage II patients composed the two TMAs used in the study. Immunohistochemical staining using optimized antibody dilutions (Supplementary Table S4), visualization and immunoreactivity was conducted according to established protocols [4,14,25,27].

2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Microsoft Office Excel. For the seroreactive and immunohistochemistry analysis, data distribution using the Shapiro-Wilk test and variance homogeneity using the Bartlett test was first evaluated. Since data normality was discarded in all cases, we then assessed whether the means of control individuals, and pre-malignant individuals and/or CRC patients were statistically different from each other using the non-parametric U-Mann Whitney test assuming unequal variances. p -values $< .05$ were considered statistically significant. The diagnostic capacity of each individual protein as well as their combination was evaluated by a receiver operating characteristic (ROC) curve. ROC curves and the corresponding area under the curve (AUC) and the maximized sensitivity and specificity values were obtained with the R program (version 3.2.3) using the R package Epi [28].

3. Results

In the present study, we aimed at developing a methodological approach to identify tumor-associated antigens through immunoprecipitation of potential autoantibody targets using IgGs from CRC patients at stages III and IV and healthy individuals. The isolated IgGs were separately incubated with protein extracts from CRC isogenic cell lines with different metastatic properties and, then, immunoprecipitated and subsequently identified by mass spectrometry. SW480 and KM12C CRC cells were used as model of primary tumor and SW620 and KM12SM cells as model of metastatic CRC to lymph nodes and liver, respectively. A schematic representation of the workflow of the study is depicted (Fig. 1).

3.1. Identification of seroreactive proteins to IgGs from CRC patients by immunoprecipitation followed by LC-MS/MS

For IgG isolation, plasma samples from healthy individuals with negative colonoscopy and unknown pathology (control group), and plasma samples from CRC patients at stages III and IV obtained before surgery (CRC group) were separately pooled (Table 1).

The analyzed protein extract (10 mg) was obtained by mixing equal amounts of cell lysates from KM12C, KM12SM, SW480, and SW620 cells. The IgGs obtained from healthy individuals were used to pre-clean the protein extract, which was then incubated with IgGs from CRC patients to identify specific CRC seroreactive proteins.

Both protein fractions seroreactive to IgGs from healthy and/or CRC patients were firstly analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining, and then, by mass spectrometry for the identification of CRC TAAs.

First, by SDS-PAGE and silver-staining, a differential staining at high- and low-molecular weight was observed when comparing protein bands from the eluted seroreactive proteins to IgGs from healthy and CRC patients (Fig. 1). Then, the eluted proteins from both IgGs were concentrated in parallel by SDS-PAGE and in-gel digested with trypsin for subsequent mass spectrometry analysis (Fig. 1). In total, 442 proteins were identified in both experiments. From the set of identified proteins, 203 were found to be common to both control and CRC conditions, while 160 and 79 were identified only in the control or in the CRC immunoprecipitation, respectively (Supplementary Table S5).

3.2. Bioinformatics of the seroreactive proteins to CRC IgGs

Next, the set of CRC specific proteins was subjected to an extensive meta-analysis with different bioinformatic tools to identify those that were more likely to be actual CRC autoantibody targets, and thus potential disease biomarkers.

First, CRAPome was used to remove false positive seroreactive proteins target of autoantibodies. Using a cut-off of $< 10\%$ of appearance in recorded mass spectrometry analysis of immunoprecipitation experiments using agarose beads, 31 proteins were found more prone to

be actual CRC autoantibody targets (Table 2). Remarkably, the well-documented cancer autoantibody p53 appeared among the 31 proteins [29], suggesting that our approach would be useful for the identification of CRC-specific TAAs.

It has been reported that proteins target of autoantibodies are usually overexpressed and/or mutated. Therefore, we used the cBioPortal, Oncomine and UALCAN databases to investigate whether alterations related to these proteins at a genetic and/or protein level had been previously associated to CRC. We searched for recorded genetic alterations in the TCGA CRC database in cBioPortal. Interestingly, 69% and 80% of the identified targets had genetic alterations (mutation, amplification, deep deletion, and other alteration) in colon and rectal adenocarcinomas, respectively (Fig. 2A). We then used the Oncomine and UALCAN databases to find any dysregulation in the expression of the proteins at tissue level in CRC. We found that 22 out of the 31 identified proteins showed a statistically significant altered expression ($p < .05$) in CRC in comparison to adjacent paired healthy tissue (Fig. 2B), with 17 of them showing upregulation in colorectal tumoral tissue (Fig. 2B). Moreover, one of the identified proteins, CTTNBP2NL, was found to be a CRC prognosis marker in the Pathology Atlas from the Human Protein Atlas (Fig. 2C).

Finally, String database and IPA were used to identify possible altered cell functions and molecular pathways. With String, proteins were clustered by direct and indirect interactions, obtaining 5 interacting groups composed of proteins related to i) GTPases and actin-interacting proteins; ii) transcription, immunity and cell cycle functions; iii) pentose pathway and endoplasmic reticulum; iv) respiratory chain and caspase activity; and v) respiratory chain and cell messengers (Supplementary Fig. 1A). These functions, related to immune response, actin interaction and cell death, have been closely associated to cancer. Among the networks found to be altered with IPA, some were related to highly altered processes in cancer such as cell cycle, DNA replication, recombination, protein synthesis and carbohydrate metabolism (Supplementary Fig. 1B).

Collectively, these data show that the identified proteins that are potential targets of CRC autoantibodies are dysregulated at a genetic and/or protein level in CRC. Furthermore, their dysregulation plays an important role in the alteration of molecular pathways and cellular functions related to the pathology.

3.3. Genetic and protein expression verification in CRC cell lines

From the 31 remaining proteins after CRAPome screening, 13 were selected for validation at mRNA and protein level (Table 2). The criteria for this selection were antibody and cDNA availability together with existing information (i.e. whether they had already been described as TAAs in other cancer types). Plasma or secreted proteins were discarded for further validation.

We verified the presence of the targets either at mRNA or protein level in the cell lines used in the study. The presence of all 13 selected targets for validation was confirmed at mRNA level (Supplementary Fig. 2A). ERP44, SCGD1B2, TALDO1, and TRIM29 were also found at the protein level (Supplementary Fig. 2B).

3.4. Evaluation of protein expression dysregulation in CRC tissue samples as biomarker prognostic assessment

Next, since TAAs are usually highly dysregulated at protein level in CRC tissue, we evaluated if those proteins validated at protein level in CRC cells might show any dysregulation in tissue and whether they show any diagnostic or prognostic ability. To this end, ERP44, SCGD1B2, TALDO1, and TRIM29 protein abundance was evaluated by IHC using two different TMAs related to metastasis or recurrence of CRC. All proteins showed staining in CRC tissue in both TMAs, indicating a clear presence of the proteins in the pathological tissue samples. TALDO1 showed nuclear staining, while ERP44, SCGD1B2 and

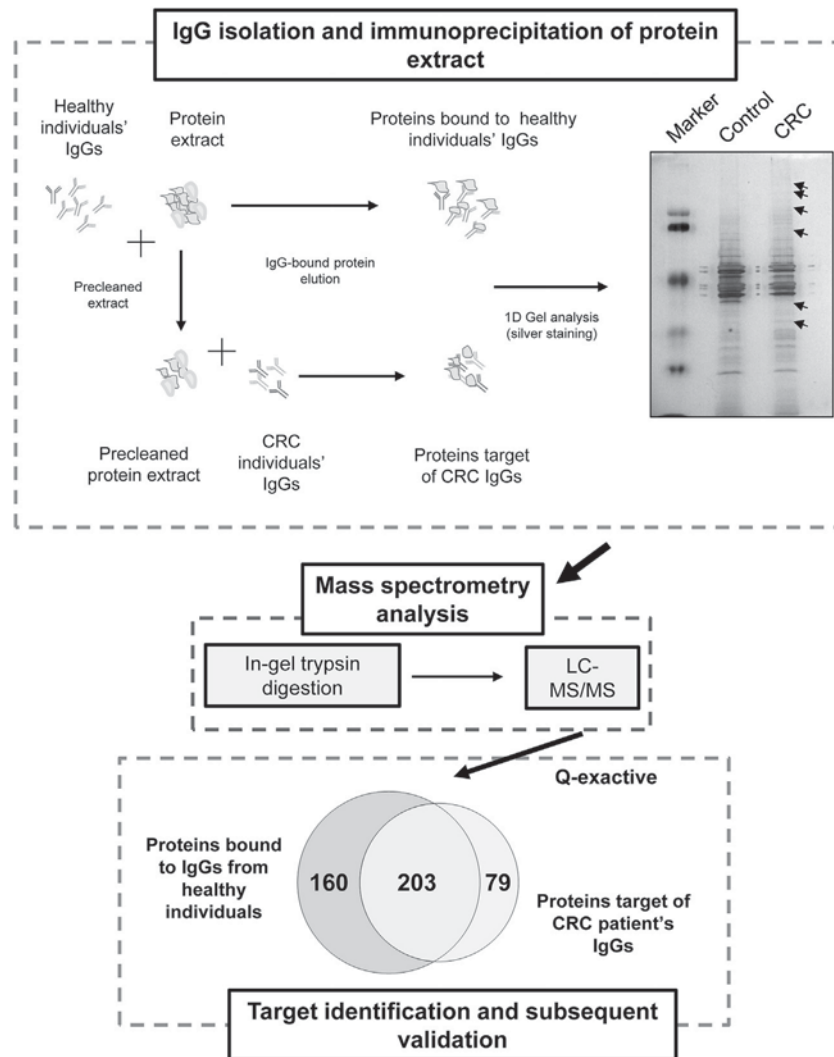


Fig. 1. Schematic work-flow of the modified SASI approach used for the identification and validation of CRC autoantigens. Immunoprecipitation coupled to mass spectrometry of a CRC cell protein extract using isolated IgGs from plasma samples was used to identify tumor-associated antigens target of CRC autoantibodies. The identified potential targets were analyzed using bioinformatics tools and validated through different techniques. Arrows depicted in the SDS-PAGE highlight those protein bands that seem to differ between the immunoprecipitation using control IgGs and CRC IgGs.

TRIM29 showed cytoplasmic staining (Fig. 3A). Moreover, both epithelial and stromal staining was observed for TALDO1, ERP44, and SCGDIB2, while TRIM29 showed only epithelial staining.

Interestingly, ERP44 could statistically discriminate between CRC liver metastatic patients according to their survival status ($p = .049$) (Fig. 3B). In addition, both TALDO1 and ERP44 could significantly discriminate between stage II CRC patients according to their recurrence status ($p = .024$) or according to the time to recurrence ($p = .039$), respectively (Fig. 3B). Next, to evaluate whether these targets could be useful markers of the disease at protein level, ROC curves were calculated. For the metastatic TMA, when grouping patients according to survival status ERP44 showed an AUC of 70% (40% sensitivity, 100% specificity). For the stage II CRC TMA, when grouping patients according to recurrence status TALDO1 showed an AUC of 63.4% (56.9% sensitivity, 66.7% specificity). Finally, when grouping patients according to time to recurrence, the AUC of ERP44 was 61.4% (59.1% sensitivity, and 65.9% specificity) (Fig. 3C).

Collectively, these results highlight that the dysregulation of proteins seroreactive to IgGs from CRC patients show potential to discriminate metastatic CRC patients, recurrence and time to recurrence of CRC patients in stage II.

3.5. Cloning, *in vitro* protein expression and seroreactive analysis of the potential CRC TAA

Our research hypothesis relied on the identification of proteins target of autoantibodies in CRC with diagnostic ability. To address this question, we evaluated the presence of cancer autoantibodies in plasma samples from CRC patients, premalignant subjects, and control individuals, and determine their diagnostic ability.

To this end, the 13 selected targets were cloned in the pANT7_cHalo expression vector for their *in vitro* expression as HaloTag fusion proteins [22]. Then, we confirmed the *in vitro* expression of the TAAs as fusion proteins to HaloTag, and the correct covalent immobilization of the fusion proteins in MBs (Fig. 4A). All proteins were visualized by immunostaining after SDS-PAGE at the theoretical molecular mass of the fusion protein. In addition, all of them were able to covalently bind to chloroalkane functionalized MBs (data not shown), and thus, they should be able to be recognized by CRC autoantibodies in an ELISA-like test [11,22,30].

Next, we analyzed the seroreactivity to these 13 potential TAAs using 80 individual plasma samples (30 from control individuals, 28 from premalignant subjects, and 32 from stage III and IV CRC patients). We found that CRC patients possess significantly higher levels of

Table 2

Identified proteins as potential autoantibody targets in CRC that appear in < 10% of agarose-based immunoprecipitation registered experiments in CRAPome.

Accession	Protein Name	Number of experiments ^a (found/total)	Ave SC	Max SC	Ratio
P07305	H1FO	23/281	5.1	71	0.08
P52434	POLR2H	20/281	2.3	11	0.07
O95969	SCGB1D2 ^b	1/281	1	1	0.00
Q15005	SPCS2	0	1.1	2	0.00
O14880	MGST3 ^b	0	1.7	4	0.00
Q16718	NDUFA5	4/281	1.2	2	0.01
P14174	MIF	25/281	3.9	59	0.09
P49720	PSMB3	13/281	3.1	16	0.05
P61019	RAB2A	15/281	1.9	5	0.05
P52565	ARHGDIA	17/281	2.2	10	0.06
Q14019	COTL1	0	1	1	0.00
P61224	RAP1B	17/281	2.7	11	0.06
P37837	TALDO1 ^b	10/281	2.7	13	0.04
O75489	NDUFS3	1/281	2.3	9	0.00
P00403	MT-CO2	2/281	2.7	14	0.01
P30740	SERPINB1	0/281	1	1	0.00
P04637	TP53	25/281	5.4	31	0.09
Q9NX63	CHCHD3 ^b	3/281	4.6	31	0.01
Q9BS26	ERP44 ^b	0/281	1.3	2	0.00
P61158	ACTR3	10/281	3.1	17	0.04
O43464	HTRA2	1/281	1.5	2	0.00
Q9UBU8	MORF4L1	1/281	1.5	2	0.00
Q02790	FKBP4 ^b	28/281	6.7	52	0.10
Q9UPZ6	THSD7A ^b	0	1	1	0.00
P35228	NOS2	1/281	1	1	0.00
Q8N3J5	PPM1K	4/281	2	2	0.01
Q14134	TRIM29 ^b	1/281	1.2	2	0.00
Q9P2B4	CTTNBP2NL ^b	1/281	1	1	0.00
P33992	MCM5	22/281	5	34	0.08
Q92794	KAT6A ^b	0	2	2	0.00
Q9HD67	MYO10 ^b	0	1	1	0.00

^a Agarose beads immunoprecipitations.

^b Proteins used for validation.

autoantibodies than control individuals, whose levels were always lower or undetectable (Fig. 4B). However, only autoantibodies against CHCHD3, CTTNBP2NL, FKBP4, MGST3, THSD7A, TRIM29 -as well as

p53- showed a statistically significant difference (p -values < .01) comparing the asymptomatic healthy control group and the CRC group (Fig. 4C). In addition CTTNBP2NL, FKBP4, and TALDO1 autoantibody levels were able to significantly discriminate between asymptomatic healthy controls and premalignant subjects (p -value < .01) (Fig. 4D). Finally, ERP44, TALDO1, CHCHD3, CTTNBP2NL, FKBP4, MGST3, THSD7A, and TRIM29 -as well as p53- were able to discriminate between the asymptomatic healthy individuals and the colorectal pathological group (p -value < .04 (Fig. 4E).

3.6. Evaluation of the diagnostic value of CRC autoantibodies

Finally, the diagnostic value of the CRC TAAs was evaluated by means of ROC curves. AUC, sensitivity and specificity values were calculated individually or in combination using those autoantibodies showing significant levels in above comparisons.

CHCHD3, CTTNBP2NL, FKBP4, MGST3, THSD7A, and TRIM29 showed an individual AUC higher than 70% to discriminate between CRC patients and control individuals (Supplementary Table S6). In combination, the AUC increased to 99.7%, with a sensitivity of 96.9% and specificity of 100% (Fig. 5A). In addition, autoantibodies against CTTNBP2NL, FKBP4, and TALDO1 could discriminate between control individuals and premalignant subjects with an individual AUC higher than 71.9% (Supplementary Table S6), and in combination the AUC increased to 88.9% with a sensitivity of 83.3% and specificity of 86.7% (Fig. 5B). Finally, CHCHD3, CTTNBP2NL, ERP44, FKBP4, MGST3, TALDO1, THSD7A, and TRIM29 showed an individual AUC higher than 59.2% to discriminate between control individuals and the pathological group, and their combination with p53 led to a combined AUC of 95.3%, with a sensitivity of 92.0% and a specificity of 90.0% (Fig. 5C).

Collectively, these results highlight the usefulness of the followed approach to identify TAAs with significant diagnostic ability. In addition, our results suggest that the here defined CRC TAAs should be included in a CRC blood-based biomarker panel to get a clinically useful blood-based diagnostic signature for CRC detection.

4. Discussion

Protein microarrays are a highly renowned used technique for

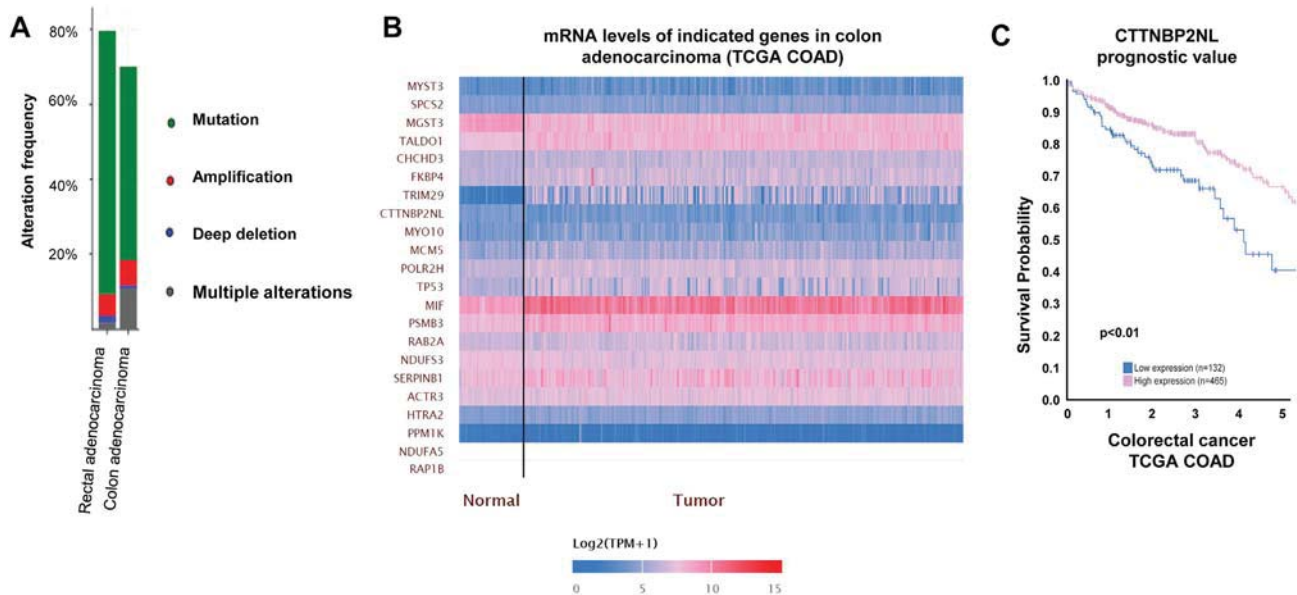


Fig. 2. Bioinformatics analysis of the autoantibody targets. (A) cBioPortal data on CRC showed that 69% and 80% of the identified targets had genetic alterations in tissue samples from colon and rectal adenocarcinomas, respectively. (B) The Oncomine and UALCAN databases showed that 22 out of the 31 identified proteins had a statistically significant altered expression ($p < .05$) in CRC in comparison to adjacent paired healthy tissue. (C) The Human Protein Atlas [18,19] showed that CTTNBP2NL has been described as a CRC prognosis marker.

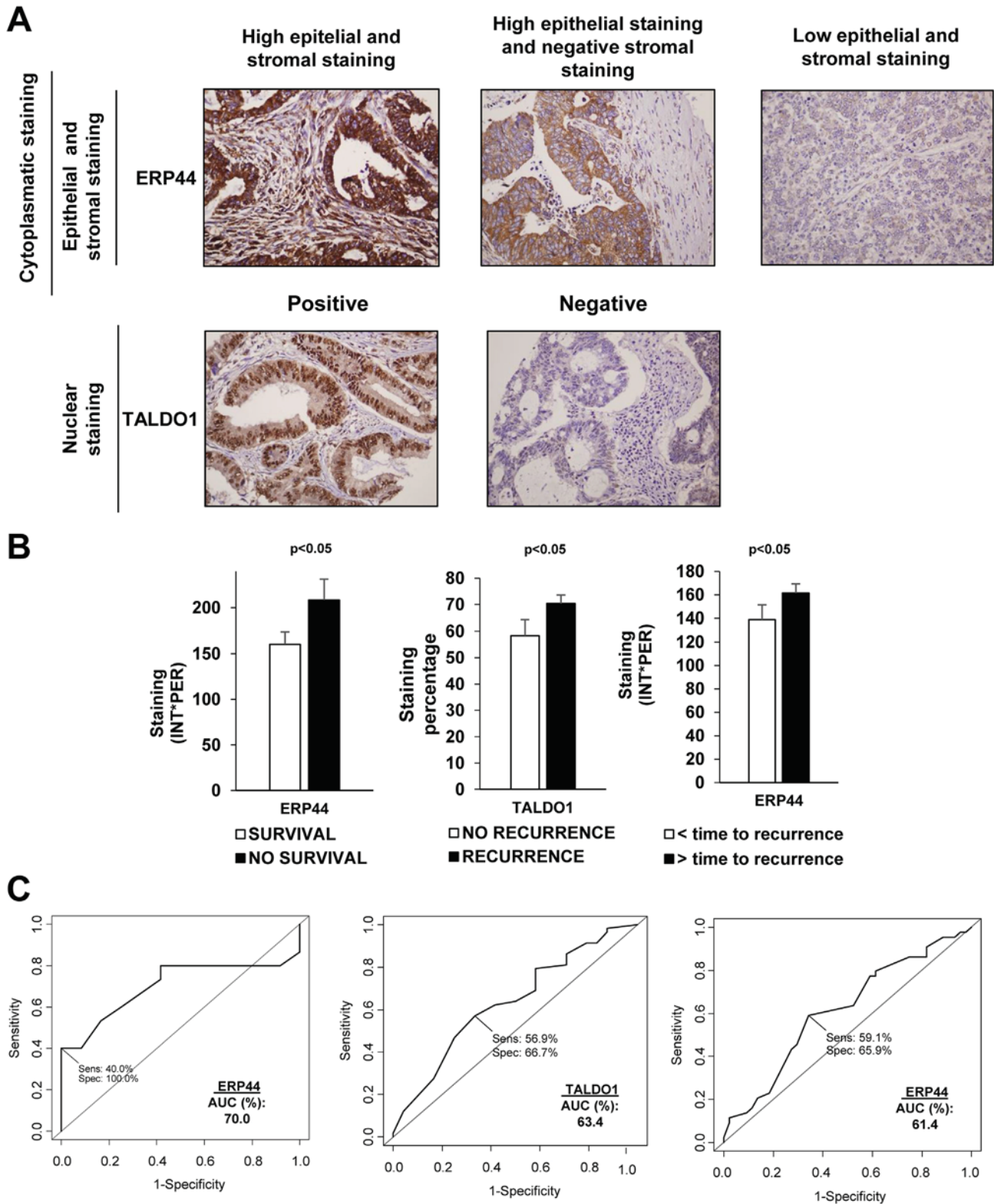


Fig. 3. The identified targets of CRC autoantibodies are dysregulated at protein level in tissue samples. (A) IHC analysis showed that indicated proteins were present in colorectal pathological tissue. (B) TALDO1 and ERP44 could significantly discriminate between stage II CRC patients (p -value $< .05$). (C) ROC curves analysis of the IHC data showed that ERP44 had an AUC of 70% (40% sensitivity, 100% specificity) to discriminate CRC patients according to survival status. TALDO1 showed an AUC of 63.4% (56.9% sensitivity, 66.7% specificity) when grouping patients according to recurrence status. When grouping patients according to disease free survival, the AUC of ERP44 was 61.4% (59.1% sensitivity, and 65.9% specificity).

identifying protein-protein interactions, drug and small-molecule screening, epitope mapping, host-pathogen interactions ... [31–34]. However, protein microarrays have been mainly used for the

identification of tumor-associated antigens in cancer malignancies [31–35]. Although theoretically the whole proteome might be printed in protein microarrays, the highest density achieved so far is about 75%

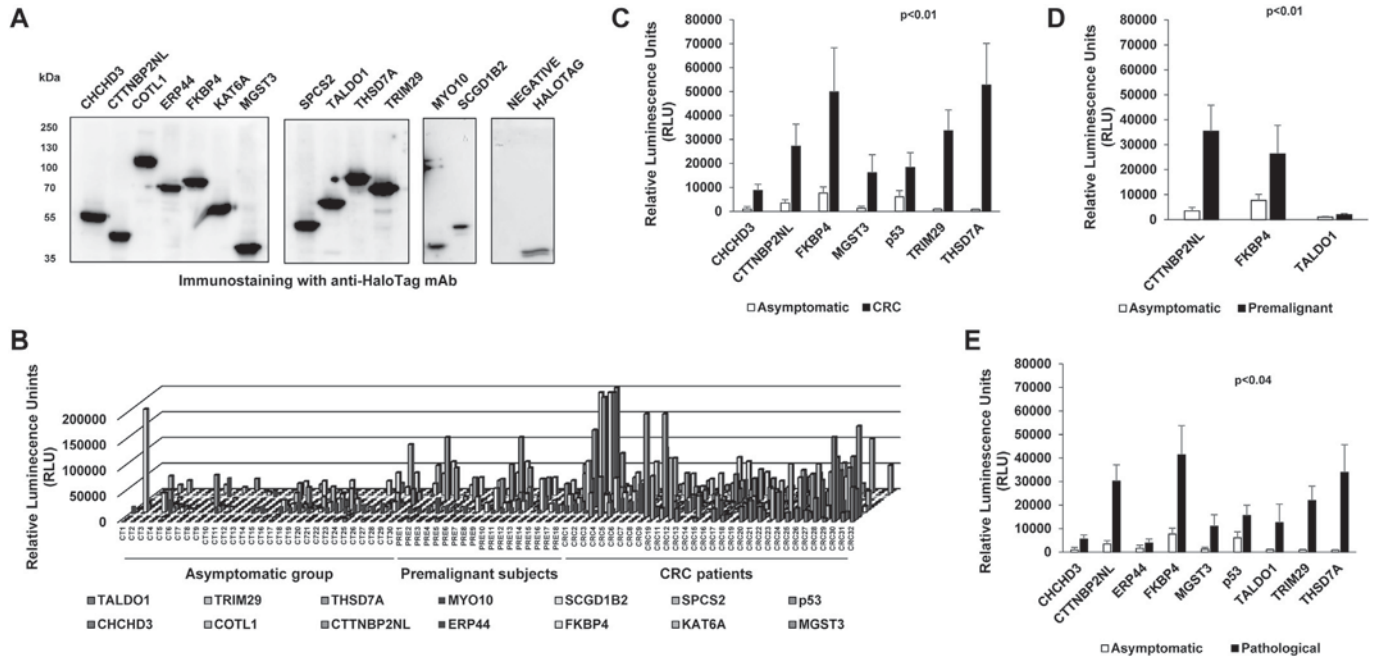


Fig. 4. Cloning, *in vitro* protein expression and evaluation of seroreactivity levels of 13 potential autoantibody targets of CRC autoantibodies. (A) Confirmation of the *in vitro* protein expression of the 13 selected targets as HaloTag fusion proteins. (B) Seroreactivity levels of the 13 proteins using the indicated 80 individual plasma samples (Table 1; Supplementary Table S1). (C) Autoantibody levels against CHCHD3 (p -value = 4.57×10^{-5}), CTTNBP2NL (p -value = $.00074$), FKBP4 (p -value = $.00079$), MGST3 (p -value = 4.36×10^{-5}), THSD7A (p -value = 9.23×10^{-5}), and TRIM29 (p -value = $.0027$) as well as p53 (p -value = $.011$) could discriminate with statistical significance between the asymptomatic healthy control group and the CRC group. (D) Autoantibody levels of CTTNBP2NL (p -value = $.00028$), FKBP4 (p -value = $.0014$), and TALDO1 (p -value = $.010$) were able to significantly discriminate between asymptomatic healthy control individuals and premalignant subjects. (E) Autoantibody levels against ERP44 (p -value = $.045$), TALDO1 (p -value = $.018$), CHCHD3 (p -value = $.0024$), CTTNBP2NL (p -value = 6.68×10^{-5}), FKBP4 (p -value = $.00015$), MGST3 (p -value = $.002$), THSD7A (p -value = $.014$), and TRIM29 (p -value = $.0045$) as well as p53 (p -value = $.041$) were able to discriminate between the asymptomatic healthy control individuals and the colorectal pathological group.

of the human proteome -considering one ORF per protein but without multiple proteoforms of the same protein- [36–38]. Alternatively, high-density PrESTs arrays covering approximately the whole proteome has been produced [38]. However, in this case medium to large peptides of about 90% of all human ORF proteins are printed in the arrays, with the limitation that in these arrays 3D non-linear relevant epitopes, and thus relevant TAAs, might be lost during the screening.

Therefore, although protein microarrays have been demonstrated highly useful in identifying CRC autoantibodies and their target proteins, new methodologies need to be applied to achieve the completion

in the identification of TAAs. Here, we investigated whether a modified SASI methodology without SILAC labeling of cells based on mass spectrometry [39], which have been useful for identifying targets of IgGs in vaccinated pancreatic cancer patients with a granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) secreting pancreatic cancer vaccine (GVAX) in phase II clinical trials [39], might help in elucidating new CRC TAAs using IgGs isolated from the plasma of CRC patients and protein extracts from CRC cell lines.

Previous studies applying mass spectrometry approaches have permitted the identification of autoantibodies against TAAs in different

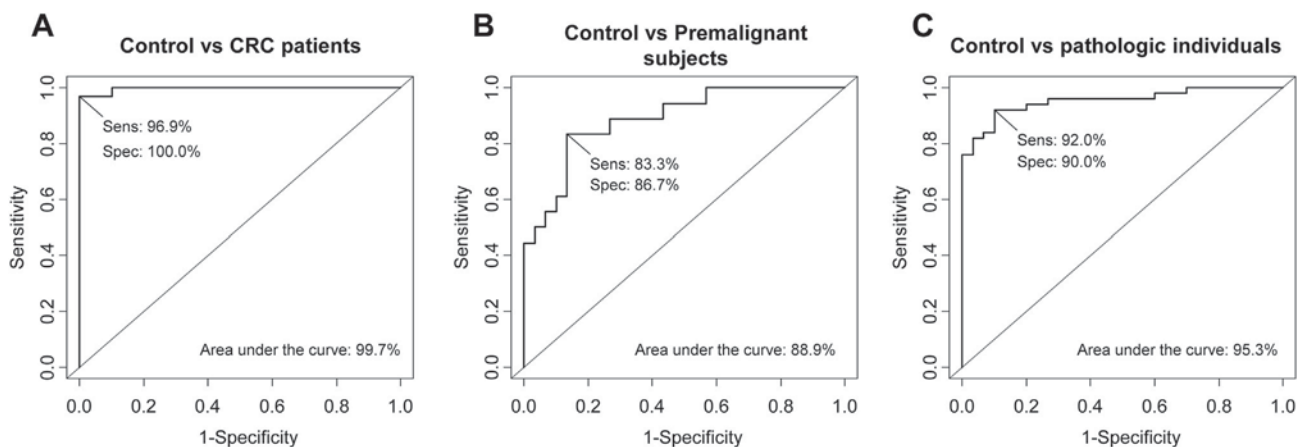


Fig. 5. Evaluation of the diagnostic value of CRC autoantibodies. (A) The combination of CHCHD3, CTTNBP2NL, FKBP4, MGST3, THSD7A, and TRIM29 showed an AUC of 99.7%, with a sensitivity of 96.9% and specificity of 100%. (B) Autoantibodies against CTTNBP2NL, FKBP4, and TALDO1 showed an AUC of 88.9% with a sensitivity of 83.3% and specificity of 86.7% when discriminating asymptomatic healthy control individuals and premalignant subjects. (C) Combined detection of autoantibodies against CHCHD3, CTTNBP2NL, ERP44, FKBP4, MGST3, TALDO1, THSD7A, TRIM29, and p53 showed an AUC of 95.3%, with a sensitivity of 92.0% and a specificity of 90.0% when discriminating the asymptomatic healthy control individuals and the pathological group.

types of cancer, including CRC [40–42]. However, these studies have been mainly focused on combining immunoblotting of protein extracts separated by 2DE-gels using patients' sera for identification of reactive spots and their subsequent protein identification by mass spectrometry, limiting the identification to medium or highly abundant TAAs. Here, the SASI modified approach combining immunoprecipitation directly coupled to LC-MS/MS allowed for the identification of autoantibodies and their target proteins in colorectal cancer. The use of immunoprecipitation to capture the reactive TAAs in solution having the proteins their *a priori* 3D conformation instead of blotting them after their separation by 2DE-gel confers some advantages. Mainly, there is no limitation on protein isolation by immunoprecipitation for further identification via LC-MS/MS. All reactive proteins to the immobilized antibodies are bound independently on their concentration, while 2DE-MS is not useful to identify low abundant proteins. Moreover, reactive spots proceeding from 2DE have conformational limitations since they are bound onto membranes and discontinuous reactive epitopes are lost. Previous studies have revealed that the immune response against proteins, apart from being patient specific, is highly polyclonal and mainly produced against 3D discontinuous epitopes [23,35]. This last limitation could produce the misidentification of relevant TAAs, which could be overcome by immunoprecipitation. Here, among the identified proteins as potential autoantibody targets in CRC (Table 2), we observed the presence of at least one protein containing continuous and discontinuous epitopes -p53-, as it has been previously demonstrated by ELISA, WB and protein microarrays [23,29,43], and thus supporting our approach to identify TAAs avoiding conformational limitations.

Here, we have validated our protein dataset by meta-analysis of databases related to CRC. Twenty-two out of 31 identified proteins were observed to present a genetic alteration or altered expression at mRNA or protein level in the disease. In addition, by IHC, TALDO1 and ERP44 protein abundance in CRC tissue could discriminate between metastatic and non-metastatic patients and between recurrent and non-recurrent patients, or according to the time to recurrence. These alterations have been defined as the ones producing a humoral immune response in cancer patients to overproduce autoantibodies against them [35].

Of our identified validated dataset, several markers have been found to play a potential role in cancer. CHCHD3, a component of the mitochondrial inner membrane complex MICOS, plays an important role in the maintenance of its stability and in mitochondrial morphological stability [44]. To our knowledge, there is only one study that has linked its dysregulation with early cancer diagnosis [45], but in pancreatic cancer. Regarding CTTNBP2NL, it has been shown dysregulated in a genetic study of oral squamous cell carcinoma [46]. ERP44, a protein that reportedly regulates calcium release into the endoplasmic reticulum, has shown that it modulates lung cancer cell migration [47], and that its knock-down inhibited mammosphere growth of breast cancer cells [48]. On the other hand, MGST3, TALDO1, TRIM29, and THSD7A had been previously reported as potential cancer markers in different studies by the evaluation of their expression levels. However, no studies focusing on them as target of autoantibodies and/or their potential use as blood-based biomarkers for cancer diagnosis have been described. Only autoantibodies against THSD7A have been previously described to classify membranous nephropathy and to be associated to outcome and treatment response [49]. MGST3, a protein with antioxidant functions by reducing GSH, has been reported as biomarker for oral squamous cancer [50]. It is highly up-regulated in basal-like breast cancer cell lines, and thus, makes it a possible triple-negative breast cancer biomarker [51]. TALDO1, an important protein for the balance of metabolites in the pentose pathway, has been previously identified by proteomic techniques to be a potential biomarker in non-small cell lung cancer [52]. In addition, it has also been identified to be up-regulated in pancreatic cancer [53]. However, there is no information on its possible role in CRC. On the other hand, TRIM29, which plays an important role on the regulation of macrophage activation against bacterial and viral infections within the respiratory tract, has been

associated to multiple cancer types [54,55]. Its upregulation has been described to promote cell proliferation, poor prognosis, and aggressiveness in CRC [56]. THSD7A is involved in vascular invasion, metastasis and angiogenesis and plays a role in actin cytoskeleton rearrangement [57]. Lastly, the immunophilin protein FKBP4 has been the only protein identified in this study previously reported in other studies as CRC serum antigen [58,59].

One of the goals of the study consisted of the discovery of TAAs useful for CRC detection, which might be used as an effective and efficient strategy for the blood-based CRC screening for population at risk (> 50 years old). We used pooled samples from CRC patients to avoid potential aberrations and biological variations in the humoral immune response of CRC patients appearing in individual samples, which might increase the capacity to identify the most significant and consistent proteins target of autoantibodies between pooled samples from well-characterized CRC patients in comparison to control individuals. Interestingly, although most of the identified CRC TAAs have been described as dysregulated in other cancers, there are no studies focusing on them as target of autoantibodies (except for FKBP4) and/or their potential as blood-based biomarkers for cancer diagnosis, including colorectal cancer. Therefore, we could achieve the specific CRC detection at early cancer stages by a simple blood test, avoiding at the same time the detection of other cancer malignancies by integrating them in a multiplexed panel including (if needed) other CRC-specific TAAs targets of autoantibodies to increase as much as possible the specificity and sensitivity of the test, especially for the detection of premalignant individuals.

Regarding the comparison of the here described panel for CRC detection with that used in clinics, it is worth to remark that there is no useful blood-based colorectal cancer marker for diagnosis and that the actual clinical marker is only recommended for recurrence (CEA). Moreover, the recommended population screening strategies for CRC are based on stool test (FOBT) followed, if positive, by structural examination by colonoscopy. While structural exams detect both cancer and premalignant lesions, stool tests mainly identify cancer because of their limited sensitivity to detect low- or high-grade adenomas. Moreover, the relatively low specificity of the initial examination results by means of FOBT produces a high false-positive rate and leads to a significant number of unnecessary colonoscopies. Here, with the identified TAA panel for CRC detection, AUC values of 99.7% and 88.9% were achieved for the detection of CRC patients and premalignant subjects in comparison to healthy control individuals, respectively. Regarding the clinical detection by FOBT followed by colonoscopy, usual clinical AUC values are about 70% for CRC detection and 60% for premalignant subjects. In addition, in a recent report performing FOBT and measuring at the same time two miRNAs -not yet clinically established-, AUC values for detecting CRC and premalignant subjects increase to 93% and 64% [60], respectively. Remarkably, in both cases, our approach was able to improve these results. Therefore, the here described approach might serve for a more accurate detection of those patients that should undergo colonoscopy or surgery for the resection of colorectal cancer or premalignant lesions.

On the other hand, although it has been provided the unbiased discovery of autoantibody biomarkers validated using individual plasma samples from CRC patients and colorectal premalignant subject in comparison to control individuals, their diagnostic ability should be further validated using large number of samples and independent patient cohorts, including blinded samples and samples from other cancer types to assure their CRC specificity and establish their utility for the diagnosis of the disease. In this sense, further research is guaranteed to try to improve the results for the early diagnosis of the disease by multiplexing the here described TAAs and by implementing these biomarkers into a panel containing other previously validated CRC autoantigens in multiplexed bio(sensing) platforms (*i.e.*, biosensors [22], Luminex or protein microarrays) to reach enough sensitivity, specificity, and AUC for the blood-based clinical diagnosis of the disease.

5. Conclusions

In summary, in this work we propose a CRC blood-based diagnostic signature based on the identification of non-previously defined CRC TAAs by immunoprecipitation of proteins from CRC cell lines and IgGs isolated from plasma of CRC patients followed by LC-MS/MS analysis. These candidate TAAs should be part of a multiplex biomarker panel for the blood-based diagnosis of the disease to be further analyzed with samples obtained from longitudinal studies in subjects at the preclinical or early clinical stages of the disease to assure its usefulness for early CRC detection.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103635>.

Authors' contributions

Conception and design: R.B. Development of methodology: M.G-A., P. SS-A., A.G-A., G.S-F., R.B. Perform Research: C.P., M.J.F-A., J. M-U., A. M-C., G. S-F., N.R., MA.C., G. S-F., V.R., A.P-G. Analysis and interpretation of data: M.G-A., A.G-A., C.P., M.J.F-A., J. M-U., V.R., A.P-G., R.B. Writing, review, and/or revision of the manuscript: M.G-A., A.G-A., R.B. Technical, obtaining and processing of samples, or material support: C.P., M.J.F-A., A. M-C., MA.C., N.R., A.M-C., A.G-A., R.B.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

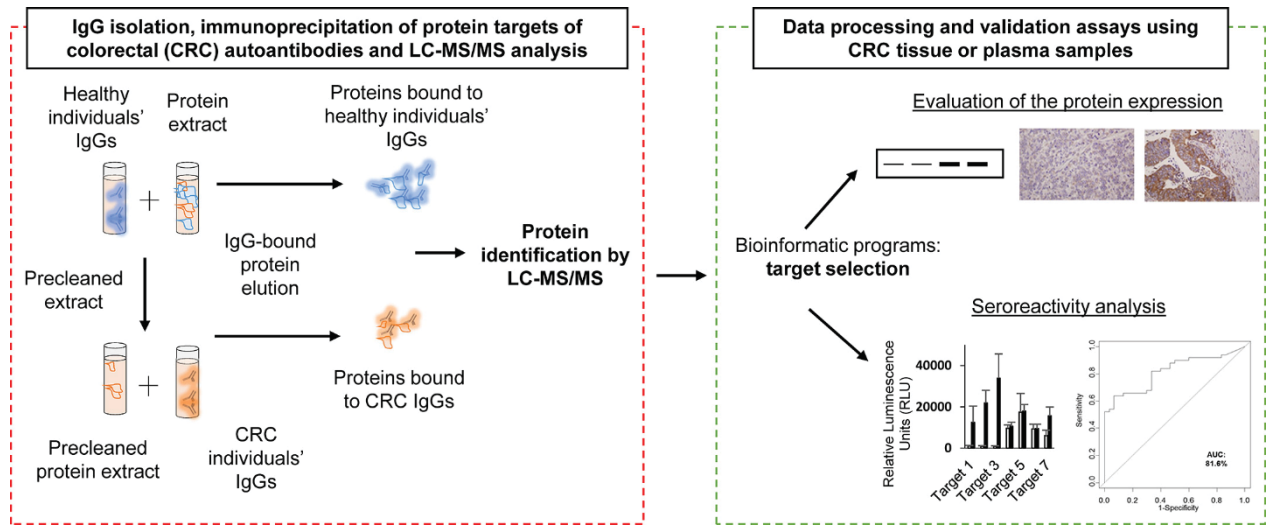
This work was supported by the Ramon y Cajal programme of the MINECO and the financial support of the PI17CIII/00045 grant from the AES-ISCIII program to R.B. M.G-A. was supported by a contract of the Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI) with the participation of the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y del Fondo Social Europeo. The FPU predoctoral contracts to P.S.S.-A. and A.M-C. are supported by the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. G.S-F. is recipient of a predoctoral contract (grant number 1193818N) supported by The Flanders Research Foundation (FWO).

References

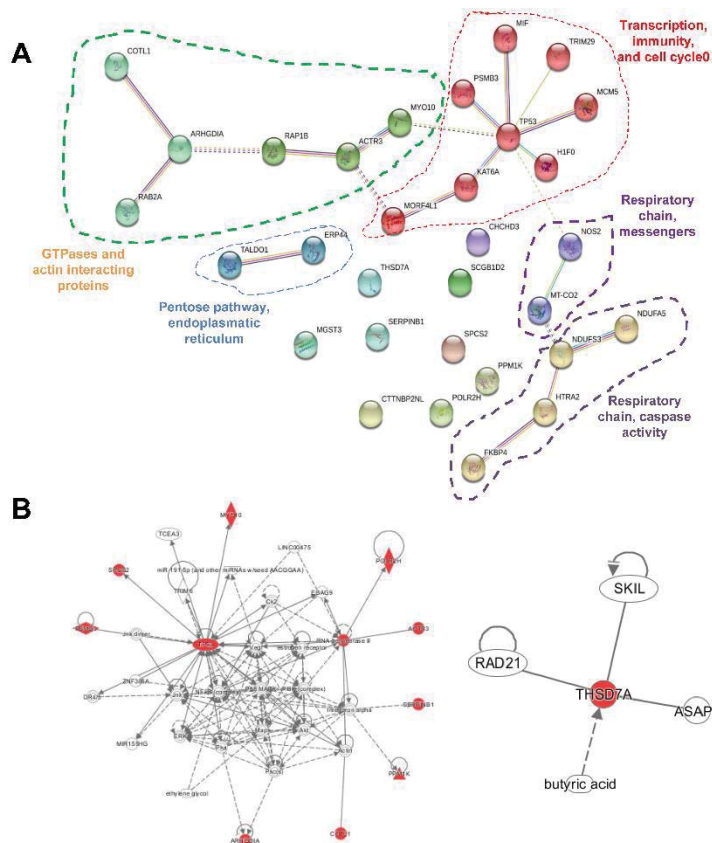
- [1] B. Holleczer, S. Rossi, A. Domenic, K. Innos, P. Minicozzi, S. Francisci, et al., On-going improvement and persistent differences in the survival for patients with colon and rectum cancer across Europe 1999-2007 - results from the EUROCARE-5 study, *Eur. J. Cancer* 51 (2015) 2158–2168.
- [2] R.J. Steele, J.F. Rey, R. Lambert, International Agency for Research on C, European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition—Professional requirements and training, *Endoscopy* 44 (Suppl. 3) (2012) SE106-15.
- [3] J.I. Casal, R. Barderas, Identification of cancer autoantigens in serum: toward diagnostic/prognostic testing? *Mol. Diagn. Ther.* 14 (2010) 149–154.
- [4] R. Barderas, R. Villar-Vazquez, M.J. Fernandez-Acenero, I. Babel, A. Pelaez-Garcia, S. Torres, et al., Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis, *Sci. Rep.* 3 (2013) 2938.
- [5] R. Barderas, I. Babel, J.I. Casal, Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery, *Proteomics Clin. Appl.* 4 (2010) 159–178.
- [6] R. Barderas, R. Villar-Vazquez, J.I. Casal, Colorectal cancer circulating biomarkers, *Biomark. Cancer Springer Series*. 1 (2014) 1–21.
- [7] R. Barderas, M. Mendes, S. Torres, R.A. Bartolome, M. Lopez-Lucendo, R. Villar-Vazquez, et al., In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion, *Mol. Cell. Proteomics* 12 (2013) 1602–1620.
- [8] M. Mendes, A. Pelaez-Garcia, M. Lopez-Lucendo, R.A. Bartolome, E. Calvino, R. Barderas, et al., Mapping the spatial proteome of metastatic cells in colorectal cancer, *Proteomics* 17 (2017).
- [9] A. Pelaez-Garcia, R. Barderas, R. Batlle, R. Vinas-Castells, R.A. Bartolome, S. Torres, et al., A proteomic analysis reveals that Snail regulates the expression of the nuclear orphan receptor Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) and interleukin 17 (IL-17) to inhibit adipocyte differentiation, *Mol. Cell. Proteomics* 14 (2015) 303–315.
- [10] A. Pelaez-Garcia, R. Barderas, M. Mendes, M. Lopez-Lucendo, J.C. Sanchez, A. Garcia de Herreros, et al., Data from proteomic characterization of the role of Snail1 in murine mesenchymal stem cells and 3T3-L1 fibroblasts differentiation, *Data Brief*. 4 (2015) 606–613.
- [11] P. San Segundo-Acosta, A. Montero-Calle, M. Fuentes, A. Rabano, M. Villalba, R. Barderas, Identification of Alzheimer's disease autoantibodies and their target biomarkers by phage microarrays, *J. Proteome Res.* 18 (2019) 2940–2953.
- [12] L. Kall, J.D. Canterbury, J. Weston, W.S. Noble, M.J. MacCoss, Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets, *Nat. Methods* 4 (2007) 923–925.
- [13] D. Mellacheruvu, Z. Wright, A.L. Couzens, J.P. Lambert, N.A. St-Denis, T. Li, et al., The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data, *Nat. Methods* 10 (2013) 730–736.
- [14] M. Garranzo-Asensio, P. San Segundo-Acosta, J. Martinez-Useros, A. Montero-Calle, M.J. Fernandez-Acenero, A. Haggmark-Manberg, et al., Identification of prefrontal cortex protein alterations in Alzheimer's disease, *Oncotarget*. 9 (2018) 10847–10867.
- [15] D.R. Rhodes, J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, et al., ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform, *Neoplasia*. 6 (2004) 1–6.
- [16] D.S. Chandrashekar, B. Bashel, S.A.H. Balasubramanya, C.J. Creighton, I. Ponce-Rodriguez, B. Chakravarthi, et al., UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses, *Neoplasia*. 19 (2017) 649–658.
- [17] E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B.E. Gross, S.O. Sumer, B.A. Aksoy, et al., The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data, *Cancer Discov.* 2 (2012) 401–404.
- [18] M. Uhlen, P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, et al., Towards a knowledge-based human protein atlas, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 1248–1250.
- [19] M. Uhlen, L. Fagerberg, B.M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, et al., Proteomics. Tissue-based map of the human proteome, *Science*. 347 (2015) 1260419.
- [20] C.Y. Seiler, J.G. Park, A. Sharma, P. Hunter, P. Surapaneni, C. Sedillo, et al., DNASU plasmid and PSI:biology-materials repositories: resources to accelerate biological research, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) D1253–D1260.
- [21] N. Ramachandran, J.V. Raphael, E. Hainsworth, G. Demirkan, M.G. Fuentes, A. Rolfs, et al., Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays, *Nat. Methods* 5 (2008) 535–538.
- [22] M. Garranzo-Asensio, A. Guzman-Aranguel, C. Poves, M.J. Fernandez-Acenero, R.M. Torrente-Rodriguez, V. Ruiz-Valdepenas Montiel, et al., Toward liquid biopsy: determination of the humoral immune response in cancer patients using HaloTag fusion protein-modified electrochemical bioplayers, *Anal. Chem.* 88 (2016) 12339–12345.
- [23] B.A. Katchman, R. Barderas, R. Alam, D. Chowell, M.S. Field, L.J. Esserman, et al., Proteomic mapping of p53 immunogenicity in pancreatic, ovarian, and breast cancers, *Proteomics Clin. Appl.* 10 (2016) 720–731.
- [24] R. Barderas, S. Shochat, P. Timmerman, M.J. Hollestelle, J.L. Martinez-Torrecuadrada, J.W. Hoppener, et al., Designing antibodies for the inhibition of gastrin activity in tumoral cell lines, *Int. J. Cancer* 122 (2008) 2351–2359.
- [25] I. Babel, R. Barderas, R. Diaz-Urriarte, J.L. Martinez-Torrecuadrada, M. Sanchez-Carbayo, J.I. Casal, Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays, *Mol. Cell. Proteomics* 8 (2009) 2382–2395.
- [26] I. Babel, R. Barderas, R. Diaz-Urriarte, V. Moreno, A. Suarez, M.J. Fernandez-Acenero, et al., Identification of MST1/STK4 and SULF1 proteins as autoantibody targets for the diagnosis of colorectal cancer by using phage microarrays, *Mol. Cell. Proteomics* 10 (2011) M110 001784.
- [27] R. Barderas, I. Babel, R. Diaz-Urriarte, V. Moreno, A. Suarez, F. Bonilla, et al., An optimized predictor panel for colorectal cancer diagnosis based on the combination of tumor-associated antigens obtained from protein and phage microarrays, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 4647–4655.
- [28] Team RC, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015.
- [29] R. Lubin, B. Schlichtholz, D. Bengoufa, G. Zalcman, J. Tredaniel, A. Hirsch, et al., Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on primary structure and exposure on protein surface, *Cancer Res.* 53 (1993) 5872–5876.
- [30] A. Montero-Calle, P. San Segundo-Acosta, M. Garranzo-Asensio, A. Rabano, R. Barderas, The molecular misreading of APP and UBB induces a humoral immune response in Alzheimer's disease patients with diagnostic ability, *Mol. Neurobiol.* (2019), <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01809-0> [Epub ahead of print].
- [31] X. Yu, B. Petritis, H. Duan, D. Xu, J. LaBaer, Advances in cell-free protein array methods, *Expert Rev. Proteomics*. 15 (2018) 1–11.
- [32] M. Cretech, F. Damin, M. Chiari, Protein microarray technology: how far off is routine diagnostics? *Analyst*. 139 (2014) 528–542.
- [33] A. Atak, S. Mukherjee, R. Jain, S. Gupta, V.A. Singh, N. Gahoi, et al., Protein microarray applications: autoantibody detection and posttranslational modification, *Proteomics*. 16 (2016) 2557–2569.
- [34] J.G. Duarte, J.M. Blackburn, Advances in the development of human protein microarrays, *Expert Rev. Proteomics*. 14 (2017) 627–641.
- [35] K.S. Anderson, J. LaBaer, The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1123–1133.
- [36] S. Gupta, S. Mukherjee, P. Syed, N.G. Pandala, S. Choudhary, V.A. Singh, et al., Evaluation of autoantibody signatures in meningioma patients using human proteome arrays, *Oncotarget*. 8 (2017) 58443–58456.
- [37] P. Syed, S. Gupta, S. Choudhary, N.G. Pandala, A. Atak, A. Richharia, et al.,

- Autoantibody profiling of glioma serum samples to identify biomarkers using human proteome arrays, *Sci. Rep.* 5 (2015) 13895.
- [38] R. Sjöberg, C. Mattsson, E. Andersson, C. Hellström, M. Uhlen, J.M. Schwenk, et al., Exploration of high-density protein microarrays for antibody validation and autoimmunity profiling, *New Biotechnol.* 33 (2016) 582–592.
- [39] D.T. Jhaveri, M.S. Kim, E.D. Thompson, L. Huang, R. Sharma, A.P. Klein, et al., Using quantitative seroproteomics to identify antibody biomarkers in pancreatic cancer, *Cancer Immunol. Res.* 4 (2016) 225–233.
- [40] L. Lin, J. Zheng, Q. Yu, W. Chen, J. Xing, C. Chen, et al., High throughput and accurate serum proteome profiling by integrated sample preparation technology and single-run data independent mass spectrometry analysis, *J. Proteome Res.* 17 (2018) 9–16.
- [41] X.X. Liu, H. Ye, P. Wang, Y. Zhang, J.Y. Zhang, Identification of 1433zeta as a potential biomarker in gastric cancer by proteomics-based analysis, *Mol. Med. Rep.* 16 (2017) 7759–7765.
- [42] M. Rezaei, S. Nikeghbalian, Z. Mojtahedi, A. Ghaderi, Identification of antibody reactive proteins in pancreatic cancer using 2D immunoblotting and mass spectrometry, *Oncol. Rep.* 39 (2018) 2413–2421.
- [43] M. Garranzo-Asensio, A. Guzmán-Arangué, C. Poves, M.J. Fernández-Acenero, A. Montero-Calle, M.A. Ceron, et al., The specific seroreactivity to ΔNp73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein, *Sci. Rep.* 9 (2019) 13547.
- [44] C. Ott, E. Dorsch, M. Fraunholz, S. Straub, V. Kozjak-Pavlovic, Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits, *PLoS One* 10 (2015) e0120213.
- [45] L. Ning, B. Pan, Y.P. Zhao, Q. Liao, T.P. Zhang, G. Chen, et al., Immuno-proteomic screening of human pancreatic cancer associated membrane antigens for early diagnosis, *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 45 (2007) 34–38.
- [46] J.D. Cha, H.J. Kim, I.H. Cha, Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma progression detected by combining array-based comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 111 (2011) 594–607.
- [47] X. Huang, M. Jin, Y.X. Chen, J. Wang, K. Zhai, Y. Chang, et al., ERP44 inhibits human lung cancer cell migration mainly via IP3R2, *Aging (Albany NY)* 8 (2016) 1276–1286.
- [48] R. Wise, S. Duhachek-Muggy, Y. Qi, M. Zolkiewski, A. Zolkiewska, Protein disulfide isomerases in the endoplasmic reticulum promote anchorage-independent growth of breast cancer cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 157 (2016) 241–252.
- [49] C. Zaghrini, B. Seitz-Polski, J. Justino, G. Dolla, C. Payre, N. Jourde-Chiche, et al., Novel ELISA for thrombospondin type 1 domain-containing 7A autoantibodies in membranous nephropathy, *Kidney Int.* 95 (2019) 666–679.
- [50] N.F. Pedro, J.M. Biselli, J.V. Maniglia, D. Santi-Neto, E.C. Pavarino, E.M. Goloni-Bertollo, et al., Candidate biomarkers for oral squamous cell carcinoma: differential expression of oxidative stress-related genes, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 19 (2018) 1343–1349.
- [51] M. Privat, J. Rudewicz, N. Sonnier, C. Tamisier, F. Ponelle-Chachuat, Y.J. Bignon, Antioxidation and cell migration genes are identified as potential therapeutic targets in basal-like and BRCA1 mutated breast cancer cell lines, *Int. J. Med. Sci.* 15 (2018) 46–58.
- [52] Y.J. Kim, K. Sertamo, M.A. Pierrard, C. Mesmin, S.Y. Kim, M. Schlessner, et al., Verification of the biomarker candidates for non-small-cell lung cancer using a targeted proteomics approach, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 1412–1419.
- [53] K. Davalieva, I.M. Kostovska, S. Kiprijanovska, K. Markoska, K. Kubelka-Sabit, V. Filipovski, et al., Proteomics analysis of malignant and benign prostate tissue by 2D DIGE/MS reveals new insights into proteins involved in prostate cancer, *Prostate.* 75 (2015) 1586–1600.
- [54] M. Dukel, W.S. Streitfeld, T.C. Tang, L.R. Backman, L. Ai, W.S. May, et al., The breast cancer tumor suppressor TRIM29 is expressed via ATM-dependent signaling in response to hypoxia, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 21541–21552.
- [55] Z. Yuan, A. Villagra, L. Peng, D. Coppola, M. Glozak, E.M. Sotomayor, et al., The ATDC (TRIM29) protein binds p53 and antagonizes p53-mediated functions, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 3004–3015.
- [56] O.K. Glebov, L.M. Rodriguez, P. Soballe, J. DeNobile, J. Cliatt, K. Nakahara, et al., Gene expression patterns distinguish colonoscopically isolated human aberrant crypt foci from normal colonic mucosa, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 15 (2006) 2253–2262.
- [57] P.R. Stahl, E. Hoxha, T. Wiech, C. Schroder, R. Simon, R.A. Stahl, THSD7A expression in human cancer, *Genes Chromosom. Cancer* 56 (2017) 314–327.
- [58] R. Kiyamova, O. Garifulin, V. Gryshkova, O. Kostianets, M. Shyian, I. Gout, et al., Preliminary study of thyroid and colon cancers-associated antigens and their cognate autoantibodies as potential cancer biomarkers, *Biomarkers.* 17 (2012) 362–371.
- [59] O.M. Garifulin, V.O. Kykot, N.Y. Gridina, R.G. Kiyamova, I.T. Gout, V.V. Filonenko, Application of serex-analysis for identification of human colon cancer antigens, *Exp. Oncol.* 37 (2015) 173–180.
- [60] S. Duran-Sancho, L. Moreno, J.M. Auge, M. Serra-Burriel, M. Cuatrecasas, L. Moreira, et al., Identification and validation of microRNA profiles in fecal samples for detection of colorectal cancer, *Gastroenterology.* (2019), <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.10.005> [Epub ahead of print], pii: S0016-5085(19)41439-X.

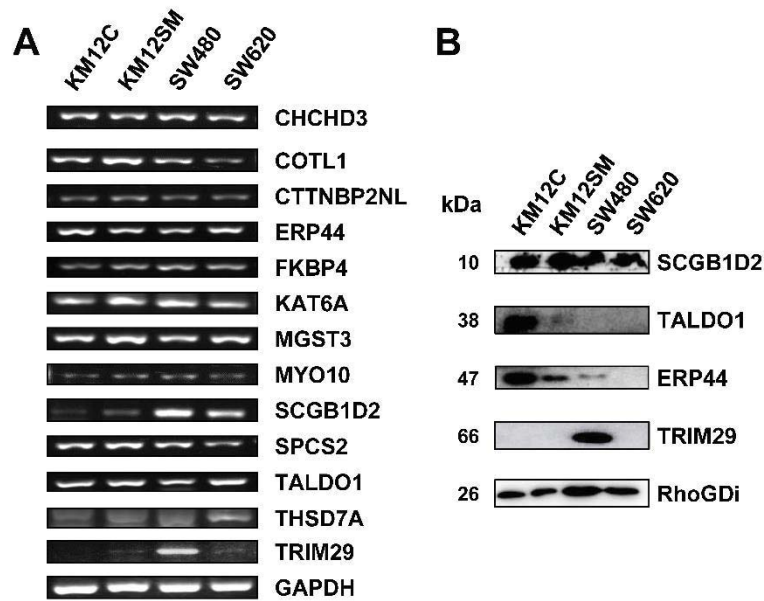
Graphical Abstract



SUPPLEMENTARY INFORMATION



Supplementary Fig. S1. Bioinformatic analysis of the identified targets by String and IPA. (A) Clustering of the direct and indirect interactions of the identified autoantibody targets performed with STRING db. Direct and indirect clustering of proteins showed five interacting groups formed by proteins related to GTPases and actin-interacting proteins, transcription, immunity, and cell cycle functions; pentose pathways and endoplasmic reticulum, respiratory chain and caspase activity, and respiratory chain and cell messengers. (B) IPA analysis of the identified targets. Among the identified altered networks appeared the cell cycle, DNA replication, recombination, protein synthesis; and cancer, carbohydrate metabolism, and cell cycle networks.



Supplementary Fig. S2. Verification of the presence of the autoantibody targets at mRNA and protein level in the CRC cells used in the study. (A) mRNA level. (B) Protein level. GAPDH and tubulin were used as loading controls at mRNA and protein level, respectively.

Supplementary Table S1. Classification of the plasma samples used in the study.

Plasma code	Classification I	Classification II	Group	Gender	Age	CRC stage (TNM)
CRC1	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	62	III
CRC2	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	78	IIIA
CRC3	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	82	IV
CRC4	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	60	IIIA
CRC5	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	74	IV
CRC6	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	85	III
CRC7	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	54	IV
CRC8	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	51	IV
CRC9	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	74	IV
CRC10	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	66	IIIA
CRC11	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	49	IIIB
CRC12	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	52	IIIC
CRC13	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	66	IV
CRC14	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	51	IV
CRC15	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	66	IV
CRC16	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	54	IV
CRC17	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	77	IIIB
CRC18	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	77	IV
CRC19	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	65	III
CRC20	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	56	III
CRC21	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	85	III
CRC22	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	69	IIIB
CRC23	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	83	IIIB
CRC24	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	70	III
CRC25	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	56	III
CRC26	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	84	IV
CRC27	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	58	IV
CRC28	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	84	IV

CRC29	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	63	IIIA
CRC30	Pathological	CRC	CRC group/pathological	M	75	IIIC
CRC31	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	58	IV
CRC32	Pathological	CRC	CRC group/pathological	F	85	IIIC
PRE1	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	65	Not applicable
PRE2	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59	Not applicable
PRE3	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	57	Not applicable
PRE4	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	70	Not applicable
PRE5	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59	Not applicable
PRE6	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	61	Not applicable
PRE7	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	50	Not applicable
PRE8	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	54	Not applicable
PRE9	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	40	Not applicable
PRE10	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	62	Not applicable
PRE11	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60	Not applicable
PRE12	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	67	Not applicable
PRE13	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60	Not applicable
PRE14	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	57	Not applicable
PRE15	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	64	Not applicable
PRE16	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60	Not applicable
PRE17	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59	Not applicable
PRE18	Pathological	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	57	Not applicable
CT1	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	M	35	Not applicable
CT2	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	M	41	Not applicable
CT3	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	M	57	Not applicable
CT4	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	41	Not applicable
CT5	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	M	67	Not applicable
CT6	Asymptomatic	Not done	Control	M	51	Not applicable
CT7	Asymptomatic	Not done	Control	M	41	Not applicable
CT8	Asymptomatic	Not done	Control	F	51	Not applicable
CT9	Asymptomatic	Not done	Control	F	38	Not applicable
CT10	Asymptomatic	Not done	Control	M	42	Not applicable
CT11	Asymptomatic	Not done	Control	F	46	Not applicable
CT12	Asymptomatic	Not done	Control	M	41	Not applicable
CT13	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	64	Not applicable
CT14	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	59	Not applicable
CT15	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	61	Not applicable
CT16	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	53	Not applicable
CT17	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	57	Not applicable
CT18	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	56	Not applicable
CT19	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	M	58	Not applicable
CT20	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	43	Not applicable
CT21	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	46	Not applicable
CT22	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	48	Not applicable
CT23	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	40	Not applicable
CT24	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	M	36	Not applicable
CT25	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	42	Not applicable
CT26	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	61	Not applicable
CT27	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	52	Not applicable
CT28	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	M	64	Not applicable
CT29	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	M	70	Not applicable
CT30	Asymptomatic	Negative colonoscopy	Control	F	55	Not applicable

Supplementary Table S2. List of selected genes including TP53 selected for validation.

Accession number	DNA _{su} CloneID	Gene Name
O95969	HsCD00516064	SCGB1D2
Q15005	HsCD00352343	SPCS2
O14880	HsCD00353113	MGST3
Q14019	HsCD00399694	COTL1
P37837	HsCD00510011	TALDO1
P04637	HsCD00001270	TP53
Q9NX63	HsCD00353217	CHCHD3
Q9BS26	HsCD00511305	ERP44
Q02790	HsCD00512122	FKBP4
Q9UPZ6	MmCD00336622	THSD7A*
Q14134	HsCD00399582	TRIM29
Q9P2B4	HsCD00081874	CTTNBP2NL
Q92794	25181 ID	KAT6A**
Q9HD67	HsCD00746161	MYO10

*Due to the high sequence identity the available *Mus musculus* gene was used.

** Obtained from Addgene.

Supplementary Table S3. Oligonucleotides used for validation of selected targets.

Target name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
SCGB1D2	GGAGTGAAGAGATGCACGGATC	GAAAGACAGTGGAAACCAGGATG
SPCS2	ATTTGGCAGCTGTCCTCCAGTC	GGACTTTGTGAACTCGGCTTCC
MGST3	GCCTGGATTGTTGGACGAGTTC	AGCACACAGTTGTGCCACCAA
COTL1	AAATATGACGGCTCCACCATCGT	TGGACCTCTTGCTCATGGCATC
TALDO1	TGCCTGTGCTCTCAGCCAAGG	TTCTCCACAGCCATCTGGTCCT
CHCHD3	CGAAGTCTCAGCGGTATTCTGG	TCTCGGTCCAGCTCTTTGGCTT
ERP44	AGTAGTGTGTTGCCAGAGTTGATTG	CTGCCAATGCTTTCACATGATCGC
FKBP4	TGACTCCAGTCTGGATCGCAAG	CTGGTTTGCAGGTGATGTGGCA
THSD7A	GTGCCAAAGCTACAGGTGGAAG	AGTAATGGCTCTTGCTGTGCGC
TRIM29	GAGGATGAAGCTGAGAAGTGGC	CCTCCTTTTGCTTCTCCAGGTC
CTTNBP2NL	GCAAGAACATGCAGGAGCGCAT	TCTCCTTCAGCCGTATCCTGTG
KAT6A	CTTCAGTGAGAGCAGCGAGGAG	GTGGTGTGTTGCGCTTTCGGACT
MYO10	CACTCTGCCGTATTTCCACAGC	TTTGTGGAGCCAGCCTTGCTTG

Supplementary Table S4. List of primary and secondary antibodies.

Primary Antibodies						
Antibody target	Clonality	Source	Application	Dilution	Provider	Reference
ERP44	Polyclonal	Rabbit	WB/IHC	1:1000/ 1:100	Elabscience	E-AB-17493
SCGD1B2	Polyclonal	Rabbit	WB/IHC	1:1000/ 1:100	Elabscience	E-AB-16568
TALDO1	Polyclonal	Rabbit	WB/IHC	1:1000/ 1:100	Elabscience	E-AB-17133
TRIM29	Polyclonal	Rabbit	WB/IHC	1:1000/ 1:100	Elabscience	E-AB-13932
HaloTag	Monoclonal	Mouse	WB/ELISA	1:1000	Promega	G921A
HRP-labeled secondary antibodies or HRP-labeled reagents						
Name	Clonality	Source	Application	Dilution	Provider	
HRP anti-mouse	Polyclonal	Goat	WB/ELISA	1:2500	Dako	
HRP anti-rabbit	Polyclonal	Goat	WB	1:3000	BioRad	
HRP Human-IgG	Polyclonal	Goat	ELISA	1:10000	Jackson	

******Dado el gran tamaño y cantidad de datos presentes en la **Supplementary Table S5**, ésta se encuentra en el CD entregado con la Tesis Doctoral y en la página web de la editorial (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391920300038?via%3Dihub>)

Supplementary Table S6. AUC, sensitivity and specificity (%) obtained for the discrimination of indicated groups according to individual seroreactive levels.

Autoantibody target	Group comparison	AUC (%)	Sensitivity/Specificity (%/%)
CHCHD3	CRC vs asymptomatic individuals	74.2	53.1/96.7
CTTNBP2NL		73.5	62.5/83.3
FKBP4		73.7	68.8/76.7
MGST3		76.9	62.5/90.0
THSD7A		77.6	65.6/96.7
TRIM29		70.9	59.4/100
CTTNBP2NL	Premalignant vs asymptomatic individuals	79.6	77.8/76.7
FKBP4		76.3	77.8/76.7
TALDO1		71.9	83.3/63.3
CHCHD3	Pathological vs asymptomatic individuals	64.9	34.0/96.7
CTTNBP2NL		75.7	72.0/76.7
ERP44		59.2	26.0/93.3
FKBP4		74.6	72.0/76.7
MGST3		67.5	44.0/90.0
TALDO1		65.4	48.4/90.0
THSD7A		65.5	42.0/96.7
TRIM29		68.3	38.0/100

BLOQUE 2

Estudio de la respuesta inmune humoral en cáncer colorrectal como elemento diagnóstico y validación de plataformas diagnósticas de CCR.

En este segundo bloque de la Tesis Doctoral, el trabajo se centró en tratar de utilizar la respuesta inmune humoral en cáncer colorrectal como elemento diagnóstico y en el desarrollo de plataformas diagnósticas que hiciesen uso de ella. Para ello, y dado que en el **Bloque 1** se vio una clara relación entre $\Delta Np73$ y el cáncer colorrectal, se evaluó si existía una seroreactividad diferencial frente a las isoformas $\Delta Np73\alpha$ y $\Delta Np73\beta$ en comparación con la forma canónica de p73. Además, se evaluó si la sensibilidad y eficacia diagnóstica de la detección de autoanticuerpos mejoraba o se mantenía estable si se detectaban varios de ellos de manera simultánea (**Artículo 3**). Para continuar con el estudio de la posible relación entre la disregulación de proteínas capaces de inducir una respuesta inmune humoral con las propiedades tumorigénicas de las células, se evaluó si la proteína PTPRN poseía seroreactividad diferencial en pacientes con cáncer de colon con comorbilidad de diabetes. Una vez determinada esta seroreactividad diferencial, se evaluó el efecto de su silenciamiento en líneas celulares de cáncer (**Artículo 4**). Por último, como prueba de concepto se desarrolló un sensor electroquímico para la detección de autoanticuerpos frente a p53 que sirviese como herramienta diagnóstica (**Artículo 5**). Al confirmarse su utilidad, y demostrándose en el Bloque 1 la gran capacidad discriminatoria que poseen los autoanticuerpos y la gran versatilidad de los sistemas de expresión *in vitro* se puso a punto un procedimiento experimental para la expresión e inmovilización de autoantígenos difíciles de expresar previamente identificados y descartados para la evaluación de su potencial diagnóstico mediante ELISA luminiscente y mediante el multiplexado del sensor electroquímico en combinación con autoantígenos fáciles de expresar (**Artículo 6**). El fin último de este bloque fue el estudio de la respuesta inmune humoral en cáncer colorrectal y su evaluación como elemento diagnóstico para el desarrollo de posibles plataformas diagnósticas útiles en rutina clínica hospitalaria.

El **Artículo 3**, titulado *The specific seroreactivity to $\Delta Np73$ isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein*, se ha publicado en la revista *Scientific Reports*.

El **Artículo 4**, titulado *The Humoral Immune Response to PTPRN links Type 2 Diabetes Patients with Colorectal Cancer and Identifies a Potential Therapeutic Target of Colorectal Cancer*, se encuentra redactado y pendiente de enviar a publicar.

Por otra parte, el **Artículo 5**, titulado *Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatforms*, se encuentra publicado en la revista *Analytical Chemistry*.

Finalmente, el **Artículo 6**, titulado *Multiplexed monitoring of a novel autoantibody diagnostic signature of colorectal cancer using HaloTag technology-based electrochemical immunosensing platform*, se ha publicado en la revista *Theranostics*.

Artículo 3

The specific seroreactivity to Δ Np73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein.

Las proteínas de la familia p53 se encuentran reguladas a nivel transcripcional. Debido a *splicing* alternativo, se han descrito hasta 40 isoformas para p73, y 20 y 10 para p53 y p63, respectivamente. Sin embargo, hasta la fecha los estudios se han centrado únicamente en la evaluación de las proteínas canónicas como dianas de autoanticuerpos para su uso diagnóstico. En este estudio, se clonaron y expresaron *in vitro* las proteoformas más desreguladas de p73 (Δ Np73 α y Δ Np73 β) para la evaluación de su seroreactividad mediante inmunoensayos tipo ELISA y 145 plasmas de pacientes de cáncer de colon, individuos premalignos e individuos control sanos. De entre ellas, Δ Np73 α mostró una mejor capacidad discriminatoria entre grupos. Además, la detección simultánea de las proteoformas Δ Np73 α , Δ Np73 β and p73 mejoró considerablemente la capacidad diagnóstica individual de las proteínas. Se llevaron a cabo experimentos de inhibición competitiva que demostraron la presencia de epítomos únicos en las proteoformas de Δ Np73 no presentes en p73. Además, se vio que existía un grupo de pacientes con cáncer colorrectal que presentaban seroreactividad específica frente a las proteoformas de Δ Np73. Con todos estos datos, se ha demostrado la complejidad de la respuesta inmune humoral hacia las proteínas de la familia p53 en pacientes con cáncer, observándose un mayor poder diagnóstico en las proteoformas derivadas del *splicing* alternativo de p73 frente a la proteína canónica, fenómeno que podría extenderse a p53 y p63.

Este trabajo se presenta como parte de la Tesis Doctoral con el consentimiento del resto de coautores. Durante el estudio, llevé a cabo la expresión de las proteínas in vitro y en bacteria, así como su purificación. Además, realicé el modelado in silico de las proteínas y llevé a cabo los ensayos de seroreactividad e inhibición, el ELISA colorimétrico de detección de CEA como medida comparativa y el análisis de los datos obtenidos. También, tuve una participación fundamental en la escritura y revisión del manuscrito.

Este trabajo se publicó en la revista Scientific Reports. 2019; 9: 13547. DOI: 10.1038/s41598-019-49960-x

OPEN

The specific seroreactivity to Δ Np73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein

María Garranzo-Asensio^{1,2}, Ana Guzmán-Aránguez¹, Carmen Povés³,
María Jesús Fernández-Aceñero⁴, Ana Montero-Calle², María Ángeles Ceron⁴,
Servando Fernandez-Diez³, Nuria Rodríguez⁵, Marta Gómez de Cedrón⁶,
Ana Ramírez de Molina⁶, Gemma Domínguez⁷ & Rodrigo Barderas^{1,2}

The p53-family is tightly regulated at transcriptional level. Due to alternative splicing, up to 40 different theoretical proteoforms have been described for p73 and at least 20 and 10 for p53 and p63, respectively. However, only the canonical proteins have been evaluated as autoantibody targets in cancer patients for diagnosis. In this study, we have cloned and expressed *in vitro* the most upregulated proteoforms of p73, Δ Np73 α and Δ Np73 β , for the analysis of their seroreactivity by a developed luminescence based immunoassay test using 145 individual plasma from colorectal cancer, premalignant individuals and healthy controls. Δ Np73 α seroreactivity showed the highest diagnostic ability to discriminate between groups. The combination of Δ Np73 α , Δ Np73 β and p73 proteoforms seroreactivity were able to improve their individual diagnostic ability. Competitive inhibition experiments further demonstrated the presence of unique specific epitopes in Δ Np73 isoforms not present in p73, with several colorectal patients showing unique and specific seroreactivity to the Δ Np73 proteoforms. Overall, we have increased the complexity of the humoral immune response to the p53-family in cancer patients, showing that the proteoforms derived from the alternative splicing of p73 possess a higher diagnostic ability than the canonical protein, which might be extensive for p53 and p63 proteins.

The p53 family of genes includes p53, p63 and p73. All three p53-family proteins have a very similar domain organization, are expressed in a similar set of alternative isoforms, and are subjected to similar post-translational modifications. However, important differences in their biological role have been revealed, showing that p53-family paralogs have acquired a high degree of functional specificity since their duplication and divergence during evolution^{1–3}.

p53 is a powerful tumor suppressor, as proven by a profusion of *in vivo* models, which is frequently mutated in human cancers^{1,4,5}. In addition, a wealth of data shows that p63 and p73 have a role in tumor suppression. Studies with p63^{+/-} and p73^{+/-} heterozygous mice revealed a consistent connection with cancer. p63^{+/-} and p73^{+/-} mice

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Optica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, E-28040, Madrid, Spain. ²UFIEC, Chronic Disease Programme, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, E-28220, Madrid, Spain. ³Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040, Madrid, Spain. ⁴Surgical Pathology Department, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040, Madrid, Spain. ⁵Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, E-28046, Madrid, Spain. ⁶Molecular Oncology and Nutritional Genomics of Cancer, IMDEA-FOOD, E-28049, Madrid, Spain. ⁷Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, E-28029, Madrid, Spain. Gemma Domínguez and Rodrigo Barderas jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.D. (email: gdominguez@iib.uam.es) or R.B. (email: r.barderasm@isciii.es)

develop spontaneous tumors and show a median survival time a few months longer than that of p53^{+/-} mice⁶. A number of studies have shown that TAp73 and TAp63 can induce cell-cycle arrest, senescence, DNA repair, and apoptosis in response to chemotherapeutic drugs, independently of p53⁷⁻⁹. In addition, despite p63 and p73 being barely mutated in cancer, they are aberrantly expressed in cancer. In particular, ΔN isoforms of p63 and p73 are frequently overexpressed in a wide range of tumors, where they are associated with poorer prognosis¹⁰. Moreover, forced expression of $\Delta Np73$ promotes transformation in experimental models^{11,12}. Thus, upregulation of $\Delta Np63$ or $\Delta Np73$ isoforms may be a common mechanism to inactivate the respective TA isoforms during tumorigenesis.

p53 autoantibodies are reported in many cancer patients^{13,14}. Indeed, p53 is considered as the main cancer autoantigen that should be included in any blood-based cancer diagnostic test because of its specificity for detecting cancer¹⁵⁻¹⁷. Moreover, p53 autoantibodies reevaluation in sera of cancer patients has shown a growing interest because of their role in early cancer detection¹⁷. Beyond the presence of autoantibodies to p53, and despite the presence of autoantibodies to p63 and p73 in the sera of cancer patients' non-seroreactive to p53, the study of the roles of p63 and p73 autoantibodies in cancer have been almost dismissed¹⁸⁻²². In addition, no report has been focused on the analysis of the seroreactivity of the different proteoforms of the p53-family in cancer patients. This is probably because of the numerous protein isoforms encoded by each of these genes.

The three proteins share a common structure consisting of an N-terminal transactivation domain, a central highly conserved DNA binding domain and a C-terminal oligomerization domain. However, the three members of the TP53-family encode for multiple isoforms containing different protein domains due to alternative splicing from P1 and P2 promoters (one intragenic) with one more -P3- detected *in silico*, and alternative initiation of translation^{23,24}. Despite its extensive regulation where different isoforms have a different N- or C-terminal, and different intraprotein amino acid sequences derived from the alternative spliced exons, only the canonical reference proteins p53, p63 and p73 -or point mutated p53- have been tested for autoantibody screening and cancer detection^{14,25}.

A major step for the development of immunoassays consists of the production of proteins with good yield, purity, stable and integral for functional protein studies. Here, we have just-in-time produced the canonical p73 protein and two aberrantly overexpressed $\Delta Np73$ isoforms, frequently upregulated in cancer, using a cell-free system for its direct use to determine the presence of specific autoantibodies against them (Fig. 1). This system is highly efficient, and has succeeded at producing thousands of different proteins for the identification of disease-specific antibodies and host-pathogen interaction profiling²⁶⁻²⁸. Our results, achieved using 145 plasma samples from colorectal cancer (CRC) patients, patients carrying premalignant colorectal lesions, and controls, demonstrated that $\Delta Np73$ showed a specific seroreactivity different from that of p73 with a higher diagnostic ability to discriminate between colorectal cancer patients, and controls, and especially premalignant individuals and controls which may have an important impact on cancer prevention to predict premalignant tumours.

Results

The p53-family of proteins has been analyzed as target of specific autoantibodies in cancer patients using the canonical proteins, except for p53, whose seroreactivity has been also evaluated using the most frequent p53 point mutants found in cancer and different N-terminal and C-terminal deletions of the protein to identify masked epitopes of the cancer autoantigen¹⁴. However, even though the p53-family is composed of multiple proteoforms derived from two different promoters leading to different N- and/or C-terminal primary amino acid sequences, none of these proteoforms have been evaluated as potential autoantigens target of autoantibodies in cancer patients.

Therefore, due to the fact that these isoforms are highly overexpressed in cancer, we hypothesized that a differential seroreactivity to these unique "masked" epitopes could exist in the different isoforms. In addition, the fact that the different isoforms carry differential epitopes compared to the canonical proteins could contribute to increase the diagnostic ability of the target proteins, or even identify cancer patients with specific autoantibodies to any of the isoforms.

To address this question, we have evaluated the seroreactivity to three proteins of the p53-family fused to GST by an ELISA-based test using as model the canonical p73 protein and its $\Delta Np73\alpha$, and $\Delta Np73\beta$ isoforms²⁹, which carry a different N-terminal and a different N- and C-terminal ends not present in the canonical p73 sequence, respectively (Fig. 1a,b). To further visualize the putative structural differences that would produce masked epitopes, 3D prediction models were obtained for the three proteins. 3D-models showed that the differences in the primary sequence produce important changes in the 3D-folding and in the electrostatic surface potential at both the N- and C-terminal end of the $\Delta Np73$ proteoforms in comparison to p73 (Fig. 1b).

In vitro protein expression of fusion proteins. For the development of our approach (Fig. 1c), we firstly transferred TP73, $\Delta Np73\alpha$, and $\Delta Np73\beta$ genes, and TP53 as control, from the donor vectors to a pANT7_cGST vector by means of LR clonase reactions and directly use the purified DNA for *in vitro* protein expression of the corresponding proteins fused to GST (Fig. 1d).

The success of protein expression was determined by probing the IVTT expression by WB and ELISA with an anti-GST monoclonal antibody that recognizes the GST tag in the C-terminal end of every fusion protein and an anti-p73 monoclonal antibody that specifically recognizes p73 and its ΔN proteoforms (Fig. 1d). 10 ng of GST fusion proteins were obtained per 1 μ l of IVTT reaction, according to the GST control protein included in the assay as control (data not shown).

ELISA-based test optimization for evaluation of the seroreactivity to p73 and its isoforms. We next used the fusion proteins to determine whether either $\Delta Np73\alpha$ or $\Delta Np73\beta$ isoforms of p73 were able to induce a specific humoral immune response in cancer patients different from that observed for the canonical p73

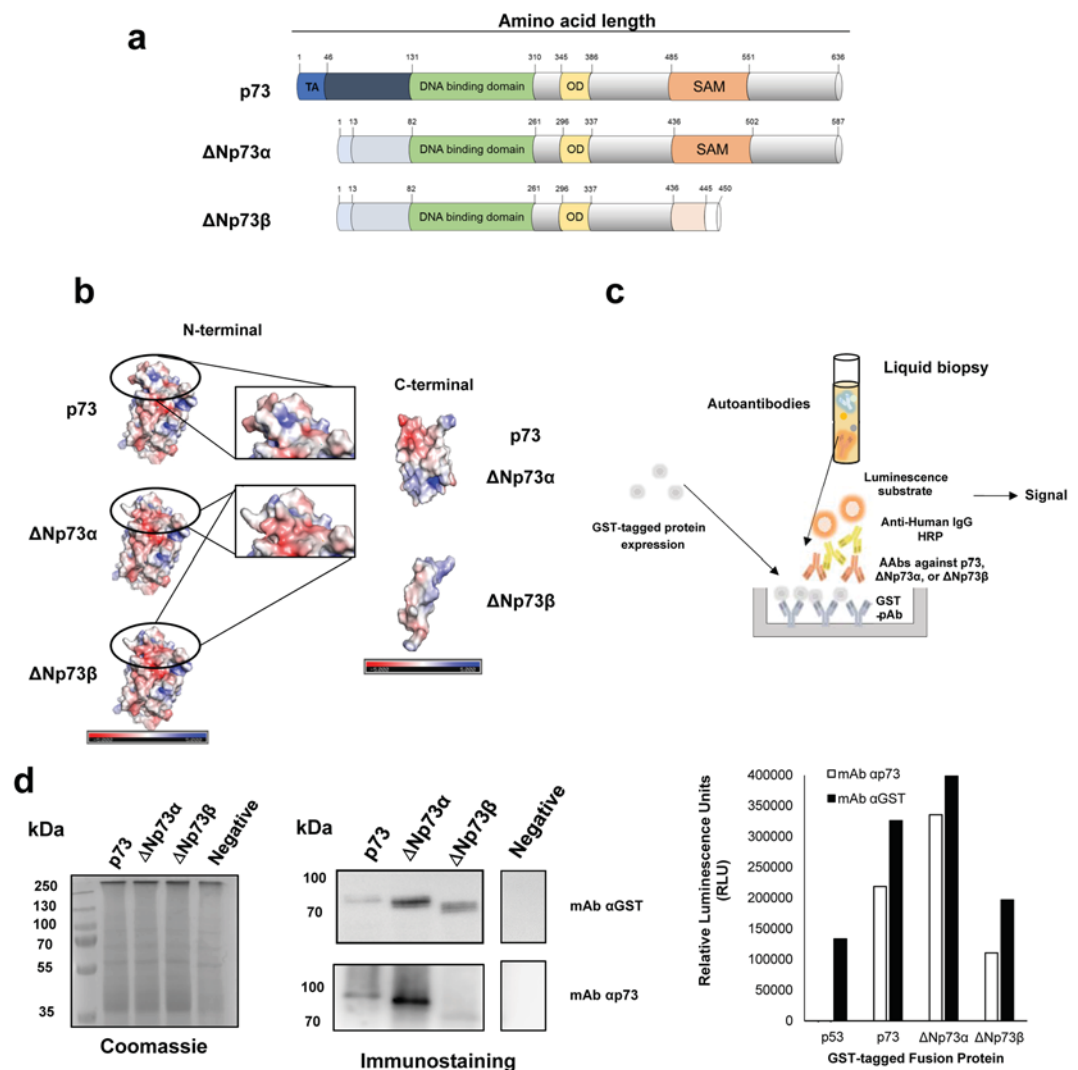


Figure 1. Scheme of the developed approach to evaluate the humoral immune response to p73 and ΔNp73 isoforms. (a) The selected p73 isoforms for the study differ from the canonical sequence on their N-terminal end (ΔNp73α), or in the N- and C-terminal ends (ΔNp73β). TA, transactivation domain; OD, oligomerization domain. (b) Prediction of the 3D structure of indicated p73 proteoforms and their predicted electrostatic potential. Electropositive and electronegative charged regions are colored in blue and red, respectively. Neutral regions are colored in white. (c) For the evaluation of autoantibody levels against them, ELISA plates were coated with GST pAb to capture GST-tagged p73-family proteins. After incubation with plasma samples containing the autoantibodies followed by an anti-Human IgG-HRP antibody, a luminescence substrate is added to obtain a quantifiable signal. (d) IVTT protein expression was verified by immunostaining, and ELISA using antibodies directed against p73 or the GST-tag. For cropped WB images, expressed proteins were run in the same gel under same experimental conditions as the negative controls and processed in parallel.

protein. To this end, we optimized and validated the feasibility of the ELISA approach to determine the specific seroreactivity against the fusion proteins using plasma from cancer patients and controls (Fig. 2).

We firstly optimized the protein immobilization to the ELISA plates coated with anti-GST polyclonal antibody. We found an optimal IVTT reaction volume of 2.5 μl per ELISA well (data not shown). In a second step, we determined the optimal plasma and secondary antibody dilution for the detection of autoantibodies to p73 and its ΔNp73 isoforms by chemiluminescence (Fig. 2). We tested serial dilutions of a pool of CRC and control plasma samples known to be reactive to p53¹⁵ from 1:300 to 1:1200 to avoid the “hook” effect due to interferences caused by higher plasma concentrations³⁰, and serial dilutions of secondary antibody from 1:2000 to 1:10000 (Fig. 2a). Better results were observed at a 1:300, and 1:600 dilutions of human plasma and 1:10000 dilution for the secondary antibody. Accordingly, we finally assessed with individual plasma which dilution would be optimal for further experiments (Fig. 2b), using EBNA1 as positive control of the seroreactivity for all individual plasma (Fig. 2c). In all cases, best results were obtained using a plasma dilution of 1:300. Interestingly, a significant specific differential seroreactivity to the ΔNp73 isoforms in comparison to the p73 canonical sequence, different from that observed for EBNA1, was observed (Fig. 2b,c).

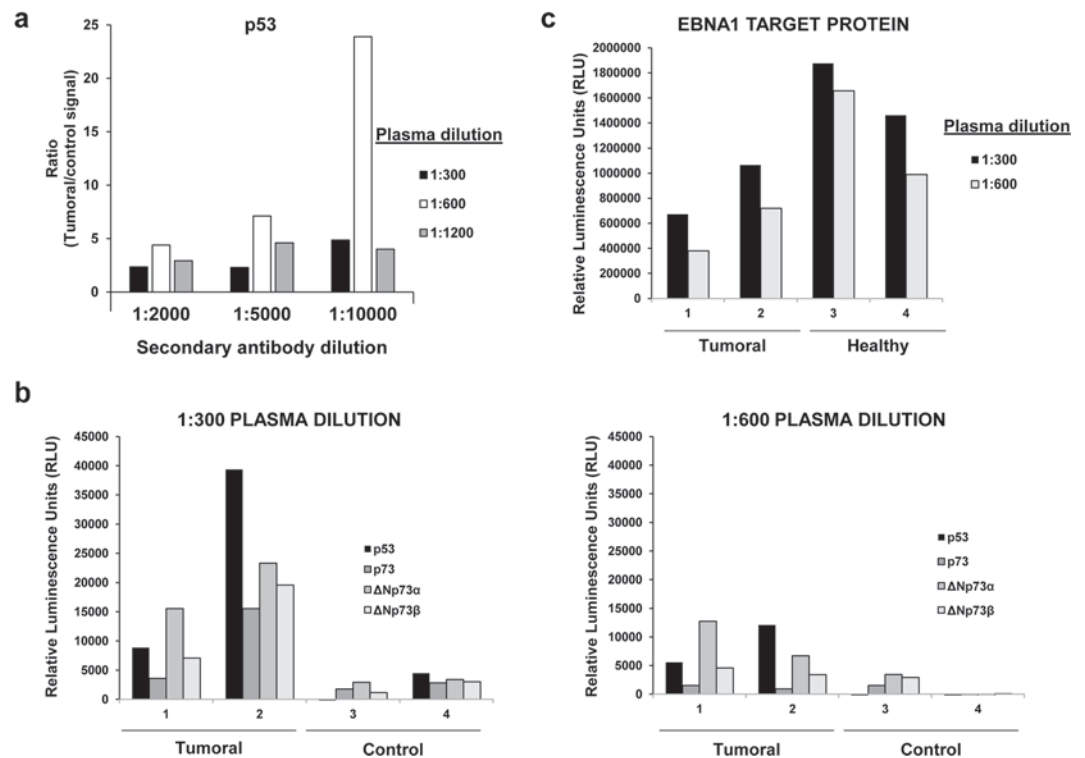


Figure 2. Optimization of the ELISA-based test for the evaluation of the seroreactivity to p73 and Δ Np73 isoforms. (a) Seroreactivity to p53, p73, Δ Np73 α , and Δ Np73 β of individual plasma samples either seroreactive or negative to p53 was assessed by ELISA at 1:300 and 1:600 dilutions with IVTT expressed proteins diluted with PBS and captured in 96-well ELISA plates. Signal ratios were calculated to determine the optimal conditions of the assay. (b) To assess the best dilution combination of plasma samples and secondary HRP-antibody, different secondary antibody dilutions were tested with p53 seroreactive (Tumoral plasma sample) and non-seroreactive (Non-tumoral plasma sample) samples diluted 1:300, or 1:600. (c) Seroreactivity to EBNA1 was measured as positive control of the assay.

Group		Sample size (N)	Overall age (mean $\pm$ SD)	Male (N)	Female (N)
Control	Asymptomatic	41	45 $\pm$ 7	12	29
	Negative colonoscopy	27	53 $\pm$ 10	10	17
Premalignant		34	59 $\pm$ 7	16	18
CRC	Stage I and II	14	76 $\pm$ 9	7	7
	Stage III	11	73 $\pm$ 10	8	3
	Stage IV	18	67 $\pm$ 12	6	12

Table 1. Clinical information of the colorectal cancer patients and controls used in the study.

Evaluation of the diagnostic potential of the specific seroreactivity to p73, Δ Np73 α and Δ Np73 β proteoforms in colorectal cancer patients. Next, we proceeded to investigate their diagnostic effectiveness by the ELISA-based test using a total of 145 individual human plasma from CRC and premalignant patients, and controls and to determine whether a specific differential seroreactivity among them could exist. We used a total of 43 CRC plasma samples from patients at stages I-IV, 34 premalignant samples (low-grade or high-grade adenoma), and 68 healthy control plasma samples (Table 1).

We firstly focused our analysis on the diagnostic effectiveness of the different constructs. A significant difference in the seroreactivity to all the p73-derived constructs was observed comparing the control plasmas, and the CRC and the premalignant individuals' plasmas (Figs 3, S1, S2).

For the plasma samples from non-pathological control individuals, a mean value of 22299 ± 8909 RLU, 14155 ± 6426 RLU, and 5889 ± 3264 RLU, was achieved for p73, Δ Np73 α , and Δ Np73 β , respectively; while the colorectal pathological group reached a mean value at least 5 times higher 124577 ± 11469 RLU, 98858 ± 9167 RLU, and 73951 ± 3264 RLU (Fig. 3a).

Then, the diagnostic value of the fusion proteins was individually and collectively assessed using receiver operating characteristic (ROC) curves. p73, Δ Np73 α , and Δ Np73 β showed individually areas under the curve

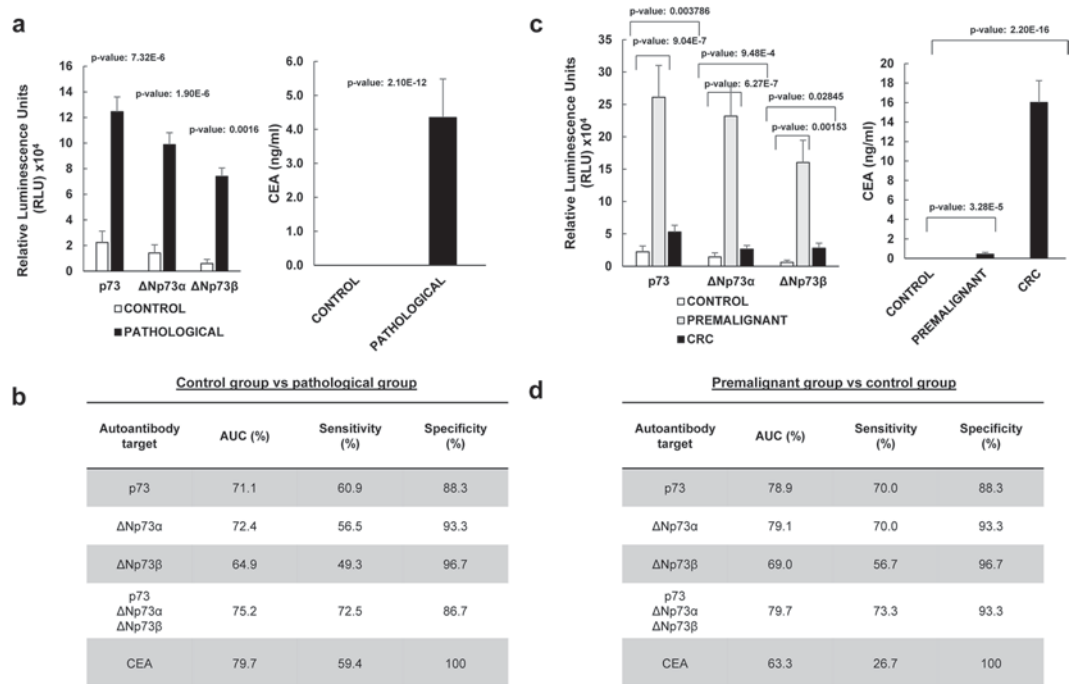


Figure 3. The analysis of the seroreactivity to p73, $\Delta Np73\alpha$, and $\Delta Np73\beta$ showed that $\Delta Np73\alpha$ possesses a significant higher diagnostic ability than the other proteoforms to discriminate colorectal cancer patients, or premalignant individuals from healthy controls. **(a,b)** Analysis of the seroreactivity in comparison to CEA concentration in the pathological group (CRC patients and premalignant individuals) vs the control group. **(c,d)** Analysis of the seroreactivity in comparison to CEA concentration for indicated groups. **(a)** Statistical differences (p -value = 7.32e-06) were found comparing the mean value of the luminescence signal obtained for p73 in the control group (22299 ± 8909 RLU) and the pathological group –pre-malignant individuals with positive colonoscopy and CRC patients- (124577 ± 11469 RLU). When comparing seroreactivity to $\Delta Np73\alpha$, statistical differences (p -value = 1.90e-06) were also found between the control group (14155 ± 6426 RLU) and the pathological group (98858 ± 9167 RLU), as well as when comparing seroreactivity to $\Delta Np73\beta$ (p -value = 0.0016) between the control group (5889 ± 3264 RLU) and pathological subjects (73951 ± 6508 RLU). On the other hand CEA mean values were 0 for the control group and 4.35 ± 1.13 ng/ml for the pathological group (p -value = 2.1e-12). **(b)** Individual and combined ROC curves values for the seroreactivity to p73, $\Delta Np73\alpha$, or $\Delta Np73\beta$ were calculated to assess their predictive value for the pathological colorectal group, comparing healthy subjects with premalignant and CRC patients. Similar results were observed for the combined ROC curves of the seroreactivity to p73, $\Delta Np73\alpha$, and $\Delta Np73\beta$ than that of CEA. **(c)** Statistically significant differences were found comparing the seroreactivity and CEA among the three groups, being the seroreactivity differences between the control and the premalignant groups the higher regarding their autoantibody levels and their significance. Seroreactive mean values for p73 were 22299 ± 8909 , 261054 ± 49056 , and 52851 ± 10524 ; for $\Delta Np73\alpha$ were 14155 ± 6426 , 231933 ± 45282 , and 26315 ± 5583 , and for $\Delta Np73\beta$ were 5889 ± 3264 , 160154 ± 34509 , and 27796 ± 7821 the control, premalignant individuals and CRC groups, respectively. On the other hand, CEA mean values were 0, 0.44 ± 0.19 , and 16.01 ± 2.23 ng/ml for the same groups. **(d)** Individual and combined ROC curves values for the seroreactivity to p73, $\Delta Np73\alpha$, or $\Delta Np73\beta$ were calculated to assess their predictive value for the detection of premalignant individuals from controls. Individual or combined seroreactive results to p73, $\Delta Np73\alpha$, and $\Delta Np73\beta$ to detect premalignant individuals were significantly higher than of CEA. All given values correspond to the trimmed mean $\pm$ SEM to compensate for extreme values. All measurements were taken in duplicate. See Supplementary Fig. S3 for all comparisons and data derived from ROC curves.

(AUCs) of 71.1%, 72.4%, and 64.9% respectively, with specificity and sensitivity up to 60.9% and 96.7% (Figs 3b, S3). In combination, they showed an AUC of 75.2% and a specificity and sensitivity of 86.7 and 72.5%, respectively, showing that the measurement of the ΔN proteoforms increases the diagnostic potential of the p73 canonical protein alone (Supplementary Fig. S3). More importantly, $\Delta Np73\alpha$ showed a higher diagnostic ability than either p73 or $\Delta Np73\beta$.

Interestingly, it was observed that the difference was mostly due to the autoantibody levels observed in the premalignant individuals (Supplementary Fig. S1). The premalignant individuals group reached a mean value at least 10 times higher than the control group, whereas CRC patients reached a value ranging between 2 and 5 times higher than the control group (Fig. 3c). Then, we proceed to determine whether the seroreactivity to p73, $\Delta Np73\alpha$, and $\Delta Np73\beta$ assessed by means of individual and combined ROC curves could predict the presence of premalignant colorectal lesions (Fig. 3d). p73, $\Delta Np73\alpha$, and $\Delta Np73\beta$ showed individually AUCs of 78.9%, 79.1%, and 69.0% respectively, with specificity and sensitivity up to 70% and 96.7% to discriminate premalignant

individuals from controls. These values were considerably higher than that observed for CRC (Supplementary Fig. S3), with AUC values up to 67.4%. In combination, they showed an AUC of 79.7% and a specificity and sensitivity of 73.3 and 93.3%, respectively, to detect premalignant individuals. In contrast, for CRC their combined AUC was 61.5%, with a specificity and sensitivity of 90.0 and 59% (Supplementary Fig. S3).

Finally, we proceed to compare the seroreactivity results with the measurement in the same samples of the carcinoembryonic antigen (CEA) tumor marker. Importantly, whereas CEA values were able to discriminate CRC samples better than the humoral response to p73, Δ Np73 α , and Δ Np73 β individually or combined, and at similar levels the pathological group from the control group, results were significantly better for the humoral response to detect premalignant individuals (Figs 3 and S3).

Collectively, these results showed that Δ Np73 α possess a higher diagnostic ability than either p73 or Δ Np73 β , and especially to discriminate premalignant individuals from controls. More importantly, these results suggest the great potential of the measurement of the autoantibody responses to Δ Np73 proteoforms for the detection of premalignant colorectal lesions, which may have an important impact in clinics for cancer prevention to detect those individuals carrying premalignant colorectal tumors.

Evaluation of Δ Np73 levels in tissue samples from CRC patients by qPCR. Next, since Δ Np73 overexpression is a common hallmark in pathological tissue of colorectal cancer patients, we aimed to evaluate whether the differences in the seroreactivity to Δ Np73 could be explained by the overexpression of Δ Np73 in tissue. To address this question, a qPCR analysis of Δ Np73 and TAp73 mRNA expression levels from paired pathological/normal samples from premalignant, and CRC patients, together with controls (Fig. 4a), whose plasma samples were previously analyzed by ELISA-based test, was done.

A mean value of 1.05 ± 0.13 relative mRNA expression levels for Δ Np73 was found in the normal tissue, whereas in the pathological group a mean value of 2.12 ± 0.35 was found. On the other hand, for TAp73, mean relative mRNA expression values of 0.017 ± 0.002 and 1.02 ± 0.27 were found for the normal and pathological tissue, respectively. In addition, relative mRNA expression levels were 0.03 ± 0.005 , and 4.86 ± 0.40 in the premalignant lesions and in the CRC tumor tissue, respectively. Moreover, although higher values were observed for Δ Np73 in the premalignant lesions comparing controls, results were only statistically significant either for Δ Np73 or TAp73 comparing CRC vs controls and the pathological group vs controls. In addition, no correlation was observed between the relative mRNA expression levels of Δ Np73 or TAp73 isoforms and the specific seroreactivity to either Δ Np73 or p73.

According to the significance of the group comparisons, we next evaluated the usefulness of the relative mRNA expression levels to discriminate between the pathological and the control group by ROC curves (Figs 4b and S4), to finally determine if the humoral immune response to p73 and its isoforms together with the relative mRNA expression levels of TAp73 and/or Δ Np73 would improve the diagnostic effectiveness observed for the seroreactivity to p73, and Δ Np73 α , and Δ Np73 β . In the cohort of colorectal cancer and colorectal cancer premalignant patients used in this study, only TAp73 showed individually a relevant AUC (66.2%). In combination, TAp73 mRNA expression levels and the seroreactivity to p73, and Δ Np73 α , and Δ Np73 β did not improve the performance of the seroreactivity to detect CRC and premalignant individuals, showing an AUC of 71.6% and a specificity and sensitivity of 81.0% and 59.4% (Fig. 4c).

Collectively, our data suggest that only the deregulation of Δ Np73 seems to be enough to produce a specific seroreactivity to Δ Np73 α , and Δ Np73 β either in premalignant individuals or CRC patients, which shows an important diagnostic effectiveness to discriminate between colorectal cancer patients, colorectal premalignant individuals and controls using plasma of patients.

Evaluation of the selective seroreactivity to the Δ Np73 α and Δ Np73 β isoforms. Since the autoantibody levels to Δ Np73 α showed a higher diagnostic ability than the reference canonical protein, and due to the differential seroreactivity observed among the isoforms, we further investigated whether the differential seroreactivity to the isoforms could be associated to the presence of unique epitopes present in the Δ Np73 isoforms (Fig. 5a). To this end, the proteins were also produced fused to HaloTag to analyze by WB the specific seroreactivity to the isoforms avoiding any tag-bias in the analysis, and to use the proteins in competitive inhibition assays that further assessed this specific seroreactivity.

First, protein purification through Ni-NTA columns was verified by Coomassie Blue staining and WB with an α -HaloTag pAb that recognizes the C-terminal tag on every antigen and a α -p73 monoclonal antibody that specifically recognizes the presence of p73 and its isoforms fused to HaloTag, respectively (Fig. 5b). The purified fusion proteins were transferred to nitrocellulose membranes to probe them with plasma samples selectively reactive to p73, Δ Np73 α , or Δ Np73 β by luminescence (Fig. 5c), using p53 as control. Interestingly, the differential seroreactivity was also detected by WB, where indicated premalignant individuals or colorectal cancer patients showed at similar extents the differential seroreactivity found by luminescence ELISA-based tests.

To finally confirm the specific seroreactivity to the Δ Np73 isoforms different from that of the canonical p73 protein, inhibition experiments were performed using the purified proteins, the IVTT expression of p73 and its isoforms fused to GST, and plasma from patients seroreactive in a specific manner to the different isoforms. We observed a dose-dependent inhibition of the autoantibody signal specific to Δ Np73 α , and Δ Np73 β , not able to be abrogated by the canonical p73 protein (Fig. 5d,e). On the other hand, the signal of the same plasma samples preincubated with the indicated purified proteins remained constant in their recognition to EBNA1. Finally, as control and to avoid any concern about the specificity of the assay, the autoantibody signal to p73 was found to be fully inhibited using the canonical p73 protein as inhibitor (Fig. 5f). Collectively, these data confirm the presence in Δ Np73 isoforms of unique specific epitopes not present in p73.

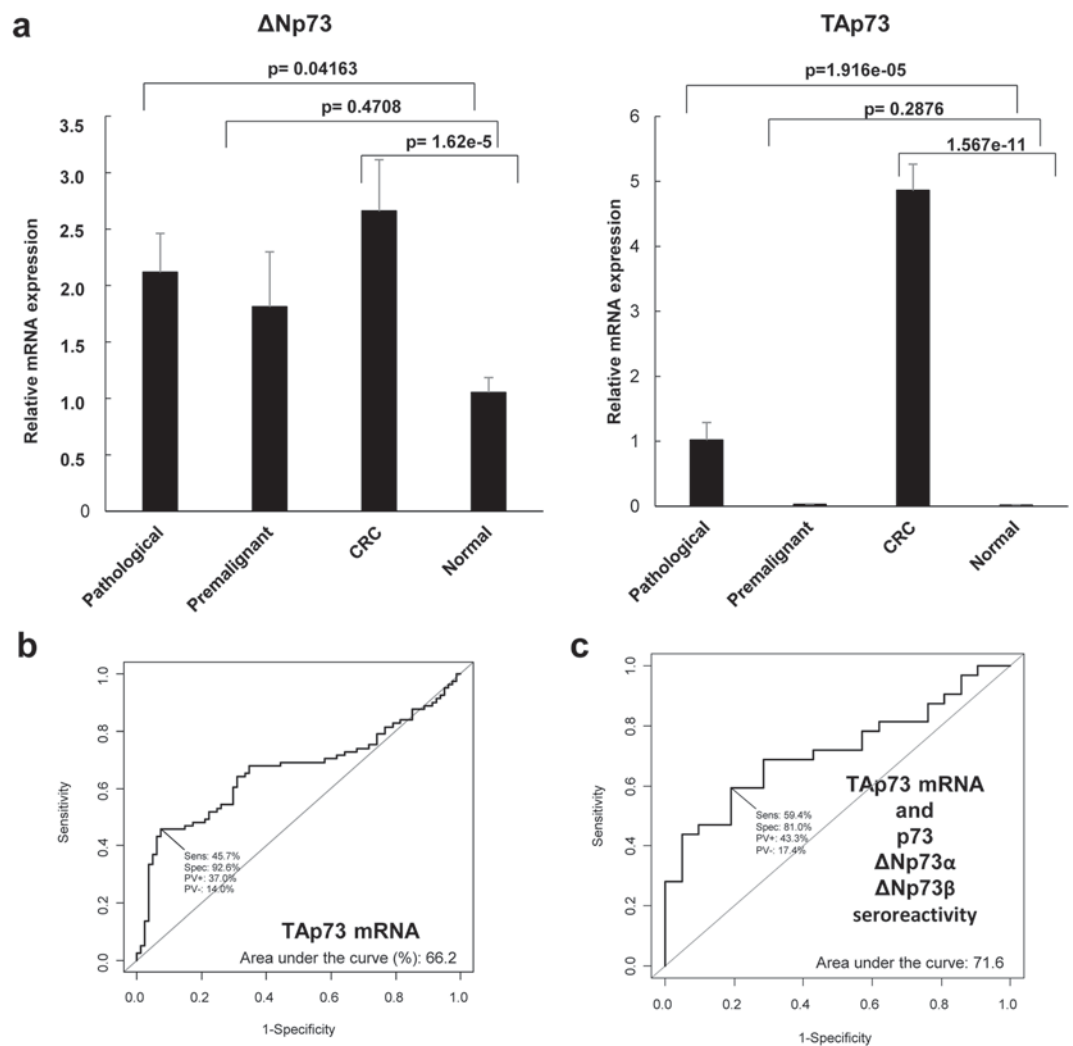


Figure 4. Evaluation of $\Delta Np73$ and TAp73 relative mRNA expression levels in paired normal and pathological tissue samples by qPCR. **(a)** For $\Delta Np73$, relative mRNA expression 2.12 ± 0.35 (mean $\pm$ SEM) was found in pathological tissue, while values of 1.05 ± 0.13 (mean $\pm$ SEM) were found in normal tissue (p -value = 0.04163). For TAp73, relative mRNA expression of 1.02 ± 0.27 (mean $\pm$ SEM) was found in pathological tissue, while values of 0.017 ± 0.002 (mean $\pm$ SEM) were found in normal tissue (p -value 1.916e-5). Trimmed mean was used in all cases to compensate for extreme values. All measurements were taken in duplicate. **(b)** Assessment of the predictive value of the relative mRNA expression levels for TAp73 and $\Delta Np73$ in tissue samples of healthy individuals vs premalignant and CRC subjects was performed through ROC curves, with only TAp73 showing significant predictive value. **(c)** Evaluation of the predictive value of the combination of the seroreactivity to p73, $\Delta Np73\alpha$, or $\Delta Np73\beta$, and the mRNA expression levels of TAp73 showed an overall AUC of 71.6%.

Discussion

Among the vast number of different cancer circulating biomarkers, altered proteins during tumor formation and progression that are able to induce a humoral response in cancer patients provide an effective, reliable, and noninvasive tool for cancer screening and preclinical diagnosis^{31–35}. Although the molecular mechanisms and the subsequent production of autoantibodies against self-proteins of the humoral response in cancer are far from being known, it is reported that proteins present alterations, including alternative splicings, punctual mutations, truncations, overactivation, aberrant glycosylations, overexpression, and/or aberrant degradation^{31,32}.

Novel high-throughput proteomic approaches have accelerated the identification of these circulating serum autoantibodies and their respective target proteins as potential cancer biomarkers. One of the main advantages of this approach for cancer diagnosis is that antibodies are highly stable molecules with a long tradition in immunoassays, facilitating their standardization in serological assays. In the last years, the development of serologic screening of natural and/or recombinant protein microarrays has led to the discovery of hundreds of novel proteins target of autoantibodies in cancer patients^{16,33–41}. As a discovery platform, these technologies hold the promise to complete the cancer autoantibody immunome once microarrays containing the total proteome become available (considering one canonical protein per gene)^{34,42,43}. However, proteins carrying important functions in the cells are usually tightly regulated and suffer from an extensive regulation at transcriptional level, and thus

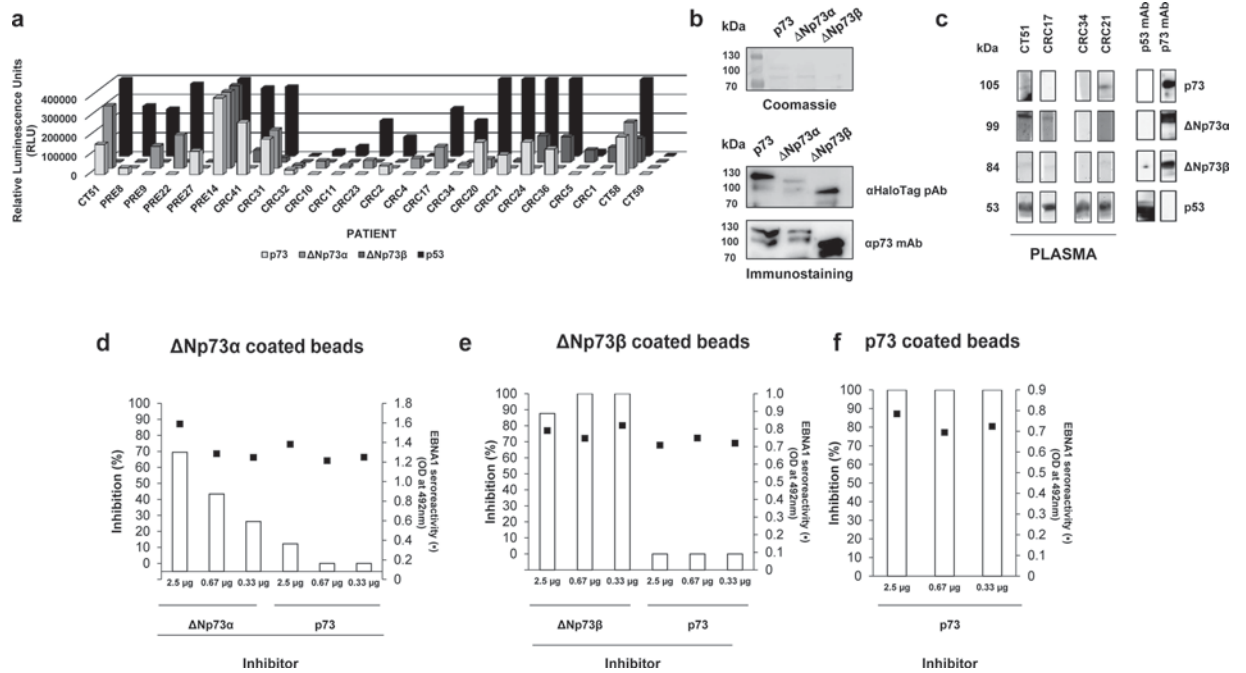


Figure 5. Verification of the selective seroreactivity to Δ Np73 isoforms. **(a)** The evaluation of the specific seroreactivity to the different proteoforms highlight that 22 individuals showed a specific seroreactivity to any of the proteoforms. CT58 as control of reactivity to all proteins and CT59 as control of no reactivity to any protein were also represented. **(b)** To verify this selective seroreactivity by WB, proteins were expressed fused to the HaloTag and 6xHis-tag at the C-terminal. Coomassie blue staining and immunostaining using antibodies directed to the expressed proteins or their Halo- and 6xHis-tags were used to verify protein expression. In cropped images, expressed proteins were run in the same gel under same experimental conditions and processed in parallel. **(c)** WB using indicated plasma samples was carried out to verify the differential seroreactivity observed by ELISA. Purified proteins were run on a single-well gel and transferred into a nitrocellulose membrane. Bands corresponding to integral proteins were cut in same-size bands and incubated with indicated individual plasma samples or primary antibodies. Inhibition assays **(d–f)** showed a specific seroreactivity to unique epitopes present in Δ N proteoforms. Pooled plasma samples seroreactive to **(d)** Δ Np73 α or **(e)** Δ Np73 β were preincubated with different amounts of indicated proteoforms as inhibitors prior to seroreactive analysis. **(f)** Seroreactivity of a pooled plasma sample seroreactive to p73 inhibited with increasing amounts of p73 was used as control of the assay. EBNA1 seroreactivity was determined as internal control of the experiment since more than 95% of human possessed antibodies against this protein of the capsid of the Epstein-Barr virus. All experiments were performed in duplicate.

they usually codify for multiple isoforms. Accordingly, by using the canonical sequences of proteins, autoantigens produced as a consequence of alternative splicings that could play a key role for cancer diagnosis might be lost as autoantibody targets.

Here, we have analyzed the potential different seroreactivity of proteoforms codified by alternative splicing of the p73 member of the p53-family. The p53-family composed of p53, p63 and p73, which regulates many vital biological processes, including cell differentiation, proliferation, and cell death/apoptosis, is well-known to be tightly controlled at transcriptional level^{44–47}. Indeed, about 40 different proteoforms have been theoretically described for p73 and at least 20 and 10 for p53 and p63, respectively, due to alternative splicing. Although not all of them have been experimentally confirmed, it is surprising that none of the proteoforms different from that of the canonical sequences have been tested as target of autoantibodies in cancer patients. To our knowledge, the only study where several isoforms of the p53-family have been analyzed was related to oral lichen planus, a chronic inflammatory disease of oral mucosa^{18,20}. In that study, the authors analyzed the contribution of the linear epitopes of several isoforms of p53, p63 and p73 by WB, and found that two patients reacted against the p63 isoforms tested, with p63 β showing the strongest reactivity, and one of these patients reacted also to p73; showing these patients the worst lesions.

Importantly, the cancer humoral immune response is a polyclonal response, which recognizes linear and/or conformational immunogenic epitopes within the same protein^{33–35,48,49}. In addition, recent advances in native protein display technologies suggest that conformational-dependent discontinuous epitopes may represent up to 90% of the total B-cell response and are often dependent on the secondary or tertiary structure of proteins⁵⁰. Accordingly, the best alternative to be used for the seroreactivity analysis of p53-family proteoforms should be those immunoassays where the proteins are correctly folded at secondary and tertiary level. Here, we have used a methodology well-known to be useful for the analysis of either conformational or linear immunogenic epitopes,

where the proteins are correctly oriented in the assay. More importantly, the proteins are expressed in a *mammalian milieu* and *in situ* during the assay, and their folding is equivalent to that observed in cancer cells, avoiding at the same time any degradation or precipitation issue during their purification or storage. This methodology derived from the NAPPA and RAPID NAPPA methodologies, with minor modifications, allowed to survey for the analysis of the seroreactivity with the integral and correctly folded proteins^{15,26,51}.

In this context, we hypothesized that the isoforms of the p53-family might produce a differential seroreactivity in cancer patients since they possess important differences in their primary sequences, affecting their 3D folding. Thus, these proteoforms should contain both unique linear and conformational epitopes in their structure, which might be target of autoantibodies in cancer patients being useful for cancer diagnosis and patient monitoring. As a proof of concept of our hypothesis, we focused on the member of the p53 family codifying theoretically for more potential isoforms: p73; and specifically in two cancer-associated proteoforms: $\Delta\text{Np73}\alpha$ and $\Delta\text{Np73}\beta$ that are specifically overexpressed in colorectal cancer^{47,52}, among other cancers. In addition, these isoforms differed in the primary sequence of the protein and consequently in their 3D folding and in the surface electrostatic potential compared to the canonical p73 protein as depicted in Fig. 1. In general, the N- and C-terminal ends are the most immunogenic regions. However, cancer patients do not elicit a humoral immune response to the N-terminal end of p73¹⁹, as evaluated by WB. Therefore, as observed by modeling the p73 proteoforms, both the N- and C-terminal ends of $\Delta\text{Np73}\alpha$ and $\Delta\text{Np73}\beta$ are located at the protein surface leading to important changes in the 3D folding and at electrostatic level, which at least for $\Delta\text{Np73}\alpha$ and $\Delta\text{Np73}\beta$ might produce an immunodominance not observed in p73.

As the most important goals of the study, we unequivocally demonstrated that ΔNp73 proteoforms produced a specific seroreactivity in colorectal cancer patients and premalignant individuals different from that observed for the p73 canonical protein. We also observed that the N-terminal end of ΔNp73 is an important target of autoantibodies in contrast to p73, since several patients showed a specific reactivity against $\Delta\text{Np73}\alpha$, which possesses a different N-terminal end than that of p73. In addition, we showed that the seroreactive diagnostic ability of $\Delta\text{Np73}\alpha$ is higher than that of either p73 or the $\Delta\text{Np73}\beta$ proteoform, and more importantly, this specific seroreactivity significantly improved the diagnostic effectiveness of p73 to discriminate colorectal cancer patients or premalignant individuals from controls. Furthermore, the autoantibody levels were higher in premalignant individuals than in colorectal cancer patients, suggesting that the diagnostic ability of the specific seroreactivity to the $\Delta\text{Np73}\alpha$ proteoform might be associated to early cancer detection. This was confirmed by ROC curve analyses, showing that $\Delta\text{Np73}\alpha$ possess a higher diagnostic ability than either p73 or $\Delta\text{Np73}\beta$ for discriminating premalignant individuals from controls. In addition, by measuring CEA in the same samples, we have found that ΔNp73 seroreactivity is more sensitive and more specific than CEA to predict premalignant lesions. Since the identification of ΔNp73 seroreactivity is cheap and easy to assess in clinics, this finding might have an important impact due to the fact that the seropositivity to $\Delta\text{Np73}\alpha$ proteoform would justify intervention to prevent development of CRC.

Collectively, we propose an evaluation of the different proteoforms of the p53-family to elucidate which proteoforms should be included in diagnostic panels for cancer beyond the canonical sequences of p53, p63 and p73. Moreover, in this study we have increased the complexity of the cancer humoral immune response to the p53-family in cancer patients, suggesting that the proteoforms derived from the alternative splicings of p53 and p63 might also possess a higher diagnostic ability than the canonical proteins, as occurs with $\Delta\text{Np73}\alpha$ in comparison to canonical p73. Therefore, an evaluation of the seroreactivity of the multiple proteoforms of the p53-family should be particularly valuable to determine whether the cancer diagnostic ability of the different proteoforms might be associated to specific cancers or might improve the diagnostic ability of the canonical proteins for cancer and early cancer diagnosis. On the other hand, the analysis of independent patient cohorts, larger number of samples and samples of different disease, including samples from irritable bowel syndrome and other cancers, would be of great interest to establish their actual clinical utility for the early diagnosis of colorectal cancer and the detection of individuals carrying premalignant lesions. In this sense, further research is guaranteed to try to determine whether ΔNp73 seroreactivity would reflect chronic inflammation (like CEA or CA19-9) or whether it is more specific of colorectal premalignant lesions than that of CRC as our results suggest, and more importantly to assess the actual clinical management utility of ΔNp73 seroreactivity by determining its association with clinic-pathological parameters, which might help identifying patients with higher risk of cancer progression and also assist in selecting the most efficient personalized treatments.

In summary, this is the first study to demonstrate the utility of the specific $\Delta\text{Np73}\alpha$ autoantibodies different from that of the canonical p73 to discriminate colorectal cancer patients and premalignant patients from healthy controls. Remarkably, $\Delta\text{Np73}\alpha$ seroreactivity showed a higher diagnostic ability than that of the canonical protein, and in combination both proteoforms were able to improve their diagnostic ability alone either for detection of CRC patients or premalignant individuals from controls. Further validation with a larger cohort of samples and comprehensive analysis of the multiple different proteoforms of the p53-family is warranted.

Methods

Patient plasma. The Institutional Ethical Review Boards of the Complutense University of Madrid (UCM), ISCIII, Hospital Clínico San Carlos (Madrid), and La Paz Hospital (Madrid) approved this study on biomarker discovery (CEI PI 45). Plasma samples were obtained from the Hospital Clínico San Carlos, Hospital La Paz and IMDEA-FOOD (Genyal platform) after approval of the Ethical Review Boards of these institutions. All subjects in the study gave their written informed consent to participate and all experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

For the analysis of the presence of specific autoantibodies to ΔNp73 isoforms different from that of p73 autoantibodies in plasma samples of cancer patients, a panel of 145 plasma samples from colorectal cancer patients and premalignant subjects (low- or high-grade adenomas in the colon), and healthy control individuals (healthy

individuals, and FOBT positive and colonoscopy negative individuals) were used (Table 1, and Supplementary Table S1). Plasma samples were collected using a standardized sample collection protocol and stored at -80°C until use^{35,37,38,53}.

Tissue samples from the same individuals were histopathologically confirmed and obtained from the Biobanks of the IDISSC and IdIPAZ, which belongs to the National Biobank Net (ISCIII) cofounded with FEDER funds, of the same Hospitals between June 2015 and March 2016 prior to initiating any treatment.

In silico modeling of the proteins. Structural models in PDB format were generated using the Phyre² program⁵⁴. Final 3D-structure models were obtained with PyMOL (Schrödinger, LCC, New York) and the electrostatic surface potential for the proteins was predicted by the Adaptive Poisson Boltzmann Solver (APBS) program⁵⁵.

Gateway plasmid construction, gene cloning, DNA preparation and protein expression. Sequence-verified full-length cDNA plasmid containing *TP53*, or *TP73* in flexible pDONR221 vector system was obtained from the publicly available DNASU Plasmid Repository (<https://dnasu.org/DNASU/>)⁵⁶. Alternatively, $\Delta\text{Np73}\alpha$ and $\Delta\text{Np73}\beta$ genes were PCR amplified with specific oligonucleotides and the pcDNA3.1 containing the full-length $\Delta\text{Np73}\alpha$ or $\Delta\text{Np73}\beta$ cDNAs. PCR products were directly cloned in pDONR221 by a BP clonase reaction (Invitrogen) according to manufacturer instructions^{14,51}. The ORFs were transferred by LR clonase reactions (Invitrogen, Carlsbad, CA), alternatively, to a pANT7_cGST vector for *in vitro* protein expression, or a pANT7-cHaloHis vector, developed in the laboratory, for bacterial protein expression¹⁵ to get p73 and ΔNp73 isoforms expressed as fusion proteins to GST or HaloTag in the C-terminal end, respectively⁵¹. All donor and expression plasmids were sequence verified prior to a subsequent use.

To obtain high-quality supercoiled DNA, plasmids were transformed into TOP10 *E. coli* cells and grown in 250 mL Luria Bertani (LB) supplemented with the adequate antibiotic (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for Ampicilin and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for kanamycin). Plasmid DNA was purified using the NucleoBond[®] Xtra Midi kit (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA). Proteins were expressed using T7 reticulocyte lysate (Promega Corporation, Madison, WI) per manufacturer's recommendations to carry out the ELISA studies. To validate the specific seroreactivity to ΔNp73 , proteins were also expressed in bacteria. Briefly, BL21 (DE3) *E. coli* cells were grown in 250 mL of LB until an OD of 0.6 was reached, and, then, expression was induced with 0.4 mM IPTG for 48 h at 16°C and 220 rpm. Then, the bacteria were centrifuged for 10 min at 4000 rpm and the pellet resuspended in 5 mL 50 mM phosphate and 300 mM NaCl containing 1% lauroyl-sarcosinate and maintained in ice for 30 min, and further lysed with 1% Triton-X100 in ice for 20 min before three subsequent cycles of sonication for 30 s. Then, the supernatant was clarified by centrifugation and proteins purified using Ni-NTA resin (CliniSciences) per manufacturer's instructions⁵⁷.

SDS-PAGE and western blot analysis. SDS-PAGE and western blot analysis to assess protein quality and specific protein seroreactivity in selected individuals' plasma were performed as previously reported⁵⁷. Briefly, 2 μL of the *in vitro* transcription/translation (IVTT) protein extracts or 500 ng of purified p73, $\Delta\text{Np73}\alpha$, and $\Delta\text{Np73}\beta$ proteins were run in 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra). After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with optimized dilutions of specific monoclonal antibodies against p73, GST tag, HaloTag, or indicated plasma samples. Immunodetection on the membranes was achieved by using HRP-conjugated secondary antibodies (Supplementary Table S2). The chemiluminescence signal was developed with ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) and detected on a Fujifilm LAS-3000 Imager (Fujifilm).

ELISA-based tests. The IVTT product was diluted 1:10 in PBS and transferred to overnight coated Maxisorp plates (Nunc) with 50 μL anti-GST pAb (GE Healthcare) diluted 1:100 in PBS. After washing, plates were blocked in blocker casein solution (Pierce) diluted 1:1 in PBS for 2 h, and then incubated for 1 h at room temperature with plasma samples at indicated dilutions. After washing, 50 μL of anti-human IgG antibody-HRP conjugated (Jackson) diluted at indicated dilutions in PBS, Tween 20 0.1% (PBST) and 3% skimmed milk was added per well. Alternatively, GST tagged-proteins were detected with anti-GST (Cell Signaling), or anti-p73 (Pierce) monoclonal antibodies followed by the incubation with the HRP conjugated-anti-mouse IgG (Sigma Aldrich, Missouri, MO) diluted 1:3000. The signal was finally developed with 50 μL per well of SuperSignal ELISA Femto Max Sensitivity (Pierce, Rockford, IL) and chemiluminescence recorded on a FLUOstar Optima (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). All seroreactive values against p73, $\Delta\text{Np73}\alpha$, and $\Delta\text{Np73}\beta$ of the samples tested in the study are shown in Supplementary Table S1.

CEA concentration (ng/mL) in plasma samples was determined using a specific immunoassay test kit (Sigma Aldrich), following the manufacturer's recommendations. All CEA values of the samples tested in the study are shown in Supplementary Table S1.

Inhibition assay of the specific autoantibody seroreactivity. To avoid any tag-bias concern and to verify the specific selective seroreactivity of some of the CRC patients to p73 and its isoforms, a competitive inhibition assay of the autoantibody binding was developed. Briefly, 0.5 μL of HaloTag magnetic beads were equilibrated following the manufacturer's instructions and incubated overnight at 4°C and constant shaking with 0.1 μg of purified integral p73, $\Delta\text{Np73}\alpha$, and $\Delta\text{Np73}\beta$ proteins fused to HaloTag and 6xHisTag for their covalent immobilization. After covalent immobilization of the proteins to the magnetic beads, beads were extensively washed with PBST containing 0.05% Triton-X100, and finally with 0.1 M glycine, pH 2.7 to remove any unspecific protein bound to beads. After elution, the beads coupled with the proteins were blocked with 3%-BSA-PBST, and subsequently incubated with pooled plasma of patients seroreactive to either $\Delta\text{Np73}\alpha$ or to $\Delta\text{Np73}\beta$ diluted 1:200 preincubated with indicated amounts of proteins for 2 h at room temperature, using seroreactivity to p73 and EBNA1 as controls of the assay.

qPCR analysis of Δ Np73 and TAp73. Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed in a Light Cycler apparatus (Roche Diagnostics) using the LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics). The primer sets for Δ NP73, and the reaction conditions were as described previously^{58,59}. The housekeeping gene succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA) was used to normalize gene expression results.

Statistical analysis. All statistical analyses were done with Microsoft Office Excel and the R program. For the analysis of ELISA and qPCR datasets, data distribution using the Shapiro-Wilk test and variance homogeneity using the Bartlett test was first evaluated. Since data normality and homogeneous variances were discarded in all cases, we assessed whether the means of control individuals, and premalignant individuals and CRC groups were statistically different from each other using the non-parametric U-Mann Whitney test. All given values correspond to the trimmed mean $\pm$ SEM to compensate for extreme values. p -values < 0.05 were considered statistically significant. Individual autoantibody against each indicated target was evaluated as marker in plasma of premalignant individuals, CRC patients and control individuals by a ROC curve. ROC curves were constructed with the R program (version 3.2.3) using the R package Epi⁶⁰; and the corresponding AUC and the maximized sensitivity and specificity values were calculated.

Data Availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information Files).

References

- Collavin, L., Lunardi, A. & Del Sal, G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Differ* **17**, 901–911, <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.35> (2010).
- Lu, W. J., Amatruda, J. F. & Abrams, J. M. p53 ancestry: gazing through an evolutionary lens. *Nat Rev Cancer* **9**, 758–762, <https://doi.org/10.1038/nrc2732> (2009).
- Yang, A., Kaghad, M., Caput, D. & McKeon, F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* **18**, 90–95 (2002).
- Hainaut, P. *et al.* Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res* **25**, 151–157 (1997).
- Donehower, L. A. & Lozano, G. 20 years studying p53 functions in genetically engineered mice. *Nat Rev Cancer* **9**, 831–841, <https://doi.org/10.1038/nrc2731> (2009).
- Flores, E. R. *et al.* Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* **7**, 363–373, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.02.019> (2005).
- Guo, X. *et al.* TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis *in vivo*. *Nat Cell Biol* **11**, 1451–1457, <https://doi.org/10.1038/ncb1988> (2009).
- Gressner, O. *et al.* TAp63 α induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J* **24**, 2458–2471, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600708> (2005).
- Lin, Y. L. *et al.* p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS Genet* **5**, e1000680, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000680> (2009).
- Deyoung, M. P. & Ellisen, L. W. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* **26**, 5169–5183, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210337> (2007).
- Petrenko, O., Zaika, A. & Moll, U. M. Δ Np73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation *in vivo*. *Mol Cell Biol* **23**, 5540–5555 (2003).
- Tannapfel, A. *et al.* Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis* **29**, 211–218, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm236> (2008).
- Soussi, T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: A review. *Cancer Res* **60**, 1777–1788 (2000).
- Katchman, B. A. *et al.* Proteomic mapping of p53 immunogenicity in pancreatic, ovarian, and breast cancers. *Proteomics Clin Appl* **10**, 720–731, <https://doi.org/10.1002/prca.201500096> (2016).
- Garranzo-Asensio, M. *et al.* Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatfroms. *Anal Chem* **88**, 12339–12345, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03526> (2016).
- Pedersen, J. W. *et al.* Seromic profiling of colorectal cancer patients with novel glycopeptide microarray. *Int J Cancer* **128**, 1860–1871, <https://doi.org/10.1002/ijc.25778> (2011).
- Pedersen, J. W. *et al.* Early detection of cancer in the general population: a blinded case-control study of p53 autoantibodies in colorectal cancer. *Br J Cancer* **108**, 107–114, <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.517> (2013).
- Ebrahimi, M. *et al.* Detection of antibodies against p63 and p73 isoforms in sera from patients diagnosed with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **36**, 93–98, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00504.x> (2007).
- Tominaga, O., Unsal, K., Zalcman, G. & Soussi, T. Detection of p73 antibodies in patients with various types of cancer: immunological characterization. *Br J Cancer* **84**, 57–63, <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1542> (2001).
- Ebrahimi, M., Nylander, K. & van der Waal, I. Oral lichen planus and the p53 family: what do we know? *J Oral Pathol Med* **40**, 281–285, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00979.x> (2011).
- Romano, R. A., Solomon, L. W. & Sinha, S. Tp63 in oral development, neoplasia, and autoimmunity. *J Dent Res* **91**, 125–132, <https://doi.org/10.1177/0022034511411302> (2012).
- Fierabracci, A. & Pellegrino, M. The Double Role of p53 in Cancer and Autoimmunity and Its Potential as Therapeutic Target. *Int J Mol Sci* **17**, <https://doi.org/10.3390/ijms17121975> (2016).
- Marcel, V. & Hainaut, P. p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? *Cell Mol Life Sci* **66**, 391–406, <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8336-3> (2009).
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D. P. & Bourdon, J. C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* **13**, 962–972, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401914> (2006).
- Suppiah, A. & Greenman, J. Clinical utility of anti-p53 auto-antibody: systematic review and focus on colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **19**, 4651–4670, <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i29.4651> (2013).
- Wang, J. *et al.* A versatile protein microarray platform enabling antibody profiling against denatured proteins. *Proteomics Clin Appl* **7**, 378–383, <https://doi.org/10.1002/prca.201200062> (2013).
- Yu, X. *et al.* Host-pathogen interaction profiling using self-assembling human protein arrays. *J Proteome Res* **14**, 1920–1936, <https://doi.org/10.1021/pr5013015> (2015).

28. Hurst, R. *et al.* Protein-protein interaction studies on protein arrays: effect of detection strategies on signal-to-background ratios. *Anal Biochem* **392**, 45–53, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.028> (2009).
29. Anderson, K. S. *et al.* p53 autoantibodies as potential detection and prognostic biomarkers in serous ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**, 859–868, <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0880> (2010).
30. Jassam, N., Jones, C. M., Briscoe, T. & Horner, J. H. The hook effect: a need for constant vigilance. *Ann Clin Biochem* **43**, 314–317, <https://doi.org/10.1258/00045630677695726> (2006).
31. Anderson, K. S. & LaBaer, J. The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J Proteome Res* **4**, 1123–1133, <https://doi.org/10.1021/pr0500814> (2005).
32. Murphy, M. A. *et al.* Epitope presentation is an important determinant of the utility of antigens identified from protein arrays in the development of autoantibody diagnostic assays. *Journal of proteomics* **75**, 4668–4675, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.02.031> (2012).
33. Barderas, R., Villar-Vázquez, R. & Casal, J. I. Colorectal Cancer Circulating Biomarkers. *Biomarkers in Cancer*, 1–21, https://doi.org/10.1007/978-94-007-7744-6_29-1 (2015).
34. Casal, J. I. & Barderas, R. Identification of cancer autoantigens in serum: toward diagnostic/prognostic testing? *Molecular diagnosis & therapy* **14**, 149–154, <https://doi.org/10.2165/11534760-000000000-00000> (2010).
35. Barderas, R. *et al.* Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. *Sci Rep* **3**, 2938, <https://doi.org/10.1038/srep02938> (2013).
36. Anderson, K. S. *et al.* Protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer. *J Proteome Res* **10**, 85–96, <https://doi.org/10.1021/pr100686b> (2011).
37. Babel, I. *et al.* Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2382–2395, <https://doi.org/10.1074/mcp.M800596-MCP200> (2009).
38. Babel, I. *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* **10**, M110 001784, <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.001784> (2011).
39. Barderas, R., Babel, I. & Casal, J. I. Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl* **4**, 159–178, <https://doi.org/10.1002/prca.200900131> (2010).
40. Dumstrei, K., Chen, H. & Brenner, H. A systematic review of serum autoantibodies as biomarkers for pancreatic cancer detection. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7098> (2016).
41. Zaenker, P. & Ziman, M. R. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers—a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **22**, 2161–2181, <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0621> (2013).
42. Rosenberg, J. M. & Utz, P. J. Protein microarrays: a new tool for the study of autoantibodies in immunodeficiency. *Front Immunol* **6**, 138, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00138> (2015).
43. Lee, J. R., Magee, D. M., Gaster, R. S., LaBaer, J. & Wang, S. X. Emerging protein array technologies for proteomics. *Expert Rev Proteomics* **10**, 65–75, <https://doi.org/10.1586/epr.12.67> (2013).
44. Wei, J., Zaika, E. & Zaika, A. p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *J Nucleic Acids* **2012**, 687359, <https://doi.org/10.1155/2012/687359> (2012).
45. Bourdon, J. C. p53 Family isoforms. *Curr Pharm Biotechnol* **8**, 332–336 (2007).
46. Khoury, M. P. & Bourdon, J. C. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer* **2**, 453–465, <https://doi.org/10.1177/1947601911408893> (2011).
47. Rodríguez, N., Pelaez, A., Barderas, R. & Domínguez, G. Clinical implications of the deregulated TP73 isoforms expression in cancer. *Clin Transl Oncol* **20**, 827–836, <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1802-3> (2018).
48. Murphy, M. A., O'Leary, J. J. & Cahill, D. J. Assessment of the humoral immune response to cancer. *Journal of proteomics* **75**, 4573–4579, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.021> (2012).
49. Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M. & Wentzensen, N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1535–1544, <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0733-4> (2009).
50. Yagami, H., Kato, H., Tsumoto, K. & Tomita, M. Monoclonal antibodies based on hybridoma technology. *Pharm Pat Anal* **2**, 249–263, <https://doi.org/10.4155/ppa.13.2> (2013).
51. Ramachandran, N. *et al.* Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat Methods* **5**, 535–538, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1210> (2008).
52. Rodríguez-Salas, N. *et al.* Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol* **109**, 9–19, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.11.007> (2017).
53. Barderas, R. *et al.* An optimized predictor panel for colorectal cancer diagnosis based on the combination of tumor-associated antigens obtained from protein and phage microarrays. *Journal of proteomics* **75**, 4647–4655, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.004> (2012).
54. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**, 845–858, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053> (2015).
55. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10037–10041, <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398> (2001).
56. Seiler, C. Y. *et al.* DNASU plasmid and PSI: Biology-Materials repositories: resources to accelerate biological research. *Nucleic Acids Res* **42**, D1253–1260, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1060> (2014).
57. Barderas, R. *et al.* Designing antibodies for the inhibition of gastrin activity in tumoral cell lines. *Int J Cancer* **122**, 2351–2359, <https://doi.org/10.1002/ijc.23395> (2008).
58. Domínguez, G. *et al.* DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative *in vivo* network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J Clin Oncol* **24**, 805–815, <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.2350> (2006).
59. San Millán, C. *et al.* beta-Cryptoxanthin Synergistically Enhances the Antitumoral Activity of Oxaliplatin through DeltaNP73 Negative Regulation in Colon Cancer. *Clin Cancer Res* **21**, 4398–4409, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2027> (2015).
60. Team, R. C. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. (2015).

Acknowledgements

This work was supported by the Ramon y Cajal programme of the MINECO and the financial support of the PI17CIII/00045 grant from the AES-ISCI program to R.B., cofounded by FEDER funds. G.D. acknowledges the financial support of PI15/00246 grant of the FIS and Cátedra UAM-Roche en Medicina de Innovación. M.G.-A. was supported by a contract of the Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI) with the participation of the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y del Fondo Social Europeo. We thank the excellent technical support of Maricruz Sánchez. A.M.-C. is a recipient of a FPU fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Author Contributions

Conception and design: G.D., R.B. Development of methodology: M.G.-A., A.G.-A., G.D., R.B. Perform Research: C.P., M.J.F.-A., A.M.-C., S.-F.-D., M.A.C. Analysis and interpretation of data: M.G.-A., A.G.-A., C.P., M.J.F.-A., G.D., R.B. Writing, review, and/or revision of the manuscript: M.G.-A., A.G.-A., G.D., R.B. Technical, obtaining and processing of samples, or material support: C.P., M.J.F.-A., A.M.-C., M.A.C., N.R., M.C., A.R.M.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49960-x>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

The specific seroreactivity to Δ Np73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein

María Garranzo-Asensio^{1,2}, Ana Guzmán-Aránguez¹, Carmen Povés³, María Jesús Fernández-Aceñero⁴, Ana Montero-Calle², María Ángeles Ceron⁴, Servando Fernandez-Diez³, Nuria Rodríguez⁵, Marta Gómez de Cedrón⁶, Ana Ramírez de Molina⁶, Gemma Domínguez^{*,7}, Rodrigo Barderas^{*,2}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain, ²UFIEC, Chronic Disease Programme, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda E-28220, Madrid, Spain, ³Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040 Madrid, Spain, ⁴Surgical Pathology Department, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040 Madrid, Spain, ⁵Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, E-28046 Madrid, Spain, ⁶Molecular Oncology and Nutritional Genomics of Cancer, IMDEA-FOOD, E-28049, Madrid, Spain, ⁷Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM, E-28029 Madrid, Spain

*Co-senior authors. To whom correspondence should be addressed:

Supplemental Table S1. Individual clinical information of the colorectal cancer patients and controls used in the study.

Plasma code	Classification	Group	Gender	Age	CRC stage (TNM)	p73 (RLU)*	ANp73α (RLU)*	ANp73β (RLU)*	CEA (ng/ml)
CT1	Asymptomatic	Control	M	51		4192	0	0	0.00
CT2	Asymptomatic	Control	M	56		0	0	2222	0.00
CT3	Asymptomatic	Control	F	51		0	0	0	0.00
CT4	Asymptomatic	Control	F	38		381	0	310	0.00
CT5	Asymptomatic	Control	M	42		1347	2488	553	0.00
CT6	Asymptomatic	Control	F	46		2224	4124	3589	0.00
CT7	Asymptomatic	Control	F	45		2676	4871	7488	0.00
CT8	Asymptomatic	Control	M	41		2697	3330	2361	0.00
CT9	Asymptomatic	Control	M	41		0	0	743	0.00
CT10	Asymptomatic	Control	F	51		678	0	0	0.00
CT11	Asymptomatic	Control	M	49		0	0	0	0.00
CT12	Asymptomatic	Control	F	47		0	0	0	0.00
CT13	Asymptomatic	Control	M	38		0	0	3031	0.00
CT14	Asymptomatic	Control	F	57		4189	0	0	0.00
CT15	Asymptomatic	Control	F	34		0	0	0	0.00
CT16	Asymptomatic	Control	M	34		0	0	0	0.00
CT17	Asymptomatic	Control	F	55		0	0	0	0.00
CT18	Asymptomatic	Control	F	46		1245	0	691	0.00
CT19	Asymptomatic	Control	M	40		0	0	3278	0.00
CT20	Asymptomatic	Control	F	50		0	0	1434	3.67
CT21	Asymptomatic	Control	F	41		0	0	3340	0.00
CT22	Asymptomatic	Control	F	37		0	0	3279	0.00
CT23	Asymptomatic	Control	F	48		0	0	7485	0.00
CT24	Asymptomatic	Control	F	52		0	1376	0	0.00
CT25	Asymptomatic	Control	M	49		0	0	9720	0.00
CT26	Asymptomatic	Control	F	38		0	0	4467	0.00
CT27	Asymptomatic	Control	M	31		0	0	6814	0.00
CT28	Asymptomatic	Control	F	47		300	1964	4379	0.00
CT29	Asymptomatic	Control	F	51		0	4274	7072	0.00
CT30	Asymptomatic	Control	F	45		0	287	2205	0.00
CT31	Asymptomatic	Control	F	34		0	278	1054	0.00
CT32	Asymptomatic	Control	F	50		0	0	46	0.00
CT33	Asymptomatic	Control	F	51		0	12457	0	0.00
CT34	Asymptomatic	Control	F	38		0	0	0	0.00
CT35	Asymptomatic	Control	F	44		12853	4143	0	0.00
CT36	Asymptomatic	Control	F	46		38056	12665	4050	0.00
CT37	Asymptomatic	Control	F	49		0	0	0	0.00
CT38	Asymptomatic	Control	F	52		0	0	0	0.00
CT39	Asymptomatic	Control	F	61		0	0	0	0.00
CT40	Asymptomatic	Control	M	39		0	0	0	2.77
CT41	Asymptomatic	Control	F	29		49439	14076	0	0.00
CT42	Negative colonoscopy	Control	F	46		0	0	0	0.00
CT43	Negative colonoscopy	Control	F	40		0	0	0	0.00
CT44	Negative colonoscopy	Control	F	43		0	0	0	0.00
CT45	Negative colonoscopy	Control	M	35		0	0	0	0.00
CT46	Negative colonoscopy	Control	F	48		0	0	0	0.00
CT47	Negative colonoscopy	Control	M	41		0	0	0	0.00
CT48	Negative colonoscopy	Control	M	36		0	0	0	0.00
CT49	Negative colonoscopy	Control	F	41		0	0	0	0.00
CT50	Negative colonoscopy	Control	M	67		1168000	1078000	0	0.00
CT51	Negative colonoscopy	Control	F	61		157000	326000	0	0.00
CT52	Negative colonoscopy	Control	F	42		0	0	0	0.00
CT53	Negative colonoscopy	Control	F	57		244000	0	106000	0.00
CT54	Negative colonoscopy	Control	F	56		472000	145000	0	2.81
CT55	Negative colonoscopy	Control	M	57		0	0	0	0.00
CT56	Negative colonoscopy	Control	M	58		0	0	0	0.00
CT57	Negative colonoscopy	Control	F	52		261000	309000	187000	0.00
CT58	Negative colonoscopy	Control	M	64		278000	262000	207000	0.00
CT59	Negative colonoscopy	Control	M	70		0	0	0	0.00
CT60	Negative colonoscopy	Control	F	57		0	0	0	0.00
CT61	Negative colonoscopy	Control	F	55		0	0	0	0.00
CT62	Negative colonoscopy	Control	M	57		0	0	0	0.00
CT63	Negative colonoscopy	Control	F	52		0	0	0	0.00
CT64	Negative colonoscopy	Control	F	49		0	0	0	0.00
CT65	Negative colonoscopy	Control	F	64		0	0	0	0.00
CT66	Negative colonoscopy	Control	F	61		285977	188716	167767	0.00
CT67	Negative colonoscopy	Control	F	53		277703	220001	185480	0.00
CT68	Negative colonoscopy	Control	F	59		368277	229277	239277	0.00
PRE1	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60		1070000	887000	508000	0.00
PRE2	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59		1612000	1054000	1200000	0.10
PRE3	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	57		389000	480000	493000	0.00
PRE4	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	64		326000	164000	308000	0.45
PRE5	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	54		301000	926000	548000	0.00
PRE6	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	61		0	0	0	3.14
PRE7	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	65		0	0	0	0.00
PRE8	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60		34000	0	0	0.00
PRE9	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59		0	115000	0	4.09
PRE10	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59		497000	389000	0	0.00
PRE11	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	57		1090000	830000	582000	6.76
PRE12	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	40		367845	254845	183326	0.00
PRE13	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	50		673000	471000	479000	2.35

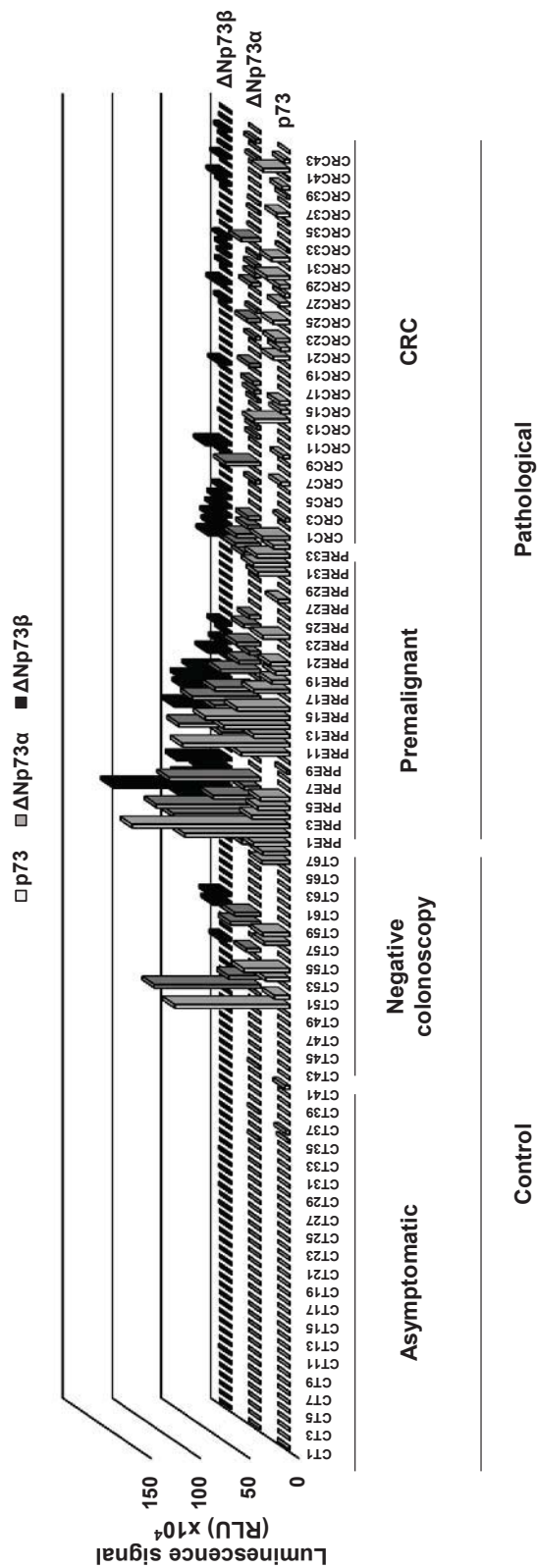
RESULTADOS

PRE14	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	67	857000	691000	499000	0.00
PRE15	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	62	540000	467000	380000	0.00
PRE16	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	60	0	0	0	0.00
PRE17	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	75	365000	405000	241000	0.00
PRE18	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	70	187000	222000	110000	0.00
PRE19	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	61	150000	116000	40000	0.00
PRE20	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	59	197000	241000	125000	0.00
PRE21	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	70	0	0	0	0.00
PRE22	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	60	0	174000	0	3.43
PRE23	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	59	278000	116000	0	2.85
PRE24	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	54	0	0	0	0.47
PRE25	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	67	0	0	0	0.00
PRE26	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	56	0	0	0	0.00
PRE27	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	61	121339	0	0	0.00
PRE28	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	58	0	0	0	0.00
PRE29	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	67	0	0	0	0.00
PRE30	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	60	322455	171455	234455	0.09
PRE31	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	40	367845	254845	183326	0.00
PRE32	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	68	337686	245410	196473	0.00
PRE33	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	64	169029	133444	146760	0.00
PRE34	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	59	281450	130002	129287	0.00
CRC1	CRC	CRC group/pathological	M	66	I	0	77000	5.50
CRC2	CRC	CRC group/pathological	M	75	I	45276	0	3.00
CRC3	CRC	CRC group/pathological	M	89	I	0	0	1.30
CRC4	CRC	CRC group/pathological	M	86	II	0	50308	117.30
CRC5	CRC	CRC group/pathological	F	60	II	0	63000	0.80
CRC6	CRC	CRC group/pathological	M	75	IIA	92955	354955	258955
CRC7	CRC	CRC group/pathological	M	75	IIA	0	0	0.00
CRC8	CRC	CRC group/pathological	M	75	IIA	0	0	0.70
CRC9	CRC	CRC group/pathological	F	75	IIA	77332	40529	15407
CRC10	CRC	CRC group/pathological	F	82	IIA	0	38000	8.40
CRC11	CRC	CRC group/pathological	F	82	IIA	0	10930	8.40
CRC12	CRC	CRC group/pathological	F	82	IIA	0	0	8.40
CRC13	CRC	CRC group/pathological	F	77	IIA	359000	32000	50.00
CRC14	CRC	CRC group/pathological	F	59	IIA	89100	62756	6795
CRC15	CRC	CRC group/pathological	M	87	III	110111	80483	115031
CRC16	CRC	CRC group/pathological	M	85	III	0	0	4.00
CRC17	CRC	CRC group/pathological	M	63	IIIA	0	111664	231.00
CRC18	CRC	CRC group/pathological	M	78	IIIA	0	0	0.00
CRC19	CRC	CRC group/pathological	F	66	IIIA	0	0	1.80
CRC20	CRC	CRC group/pathological	F	60	IIIA	168966	46746	6.30
CRC21	CRC	CRC group/pathological	M	71	IIIA	102685	0	8196
CRC22	CRC	CRC group/pathological	M	61	IIIB	149608	137608	60608
CRC23	CRC	CRC group/pathological	F	85	IIIC	0	40085	0.00
CRC24	CRC	CRC group/pathological	M	75	IIIC	169320	0	137466
CRC25	CRC	CRC group/pathological	M	77	IIIB	0	0	3.20
CRC26	CRC	CRC group/pathological	F	66	IV	109487	96821	50662
CRC27	CRC	CRC group/pathological	F	51	IV	46346	58753	33823
CRC28	CRC	CRC group/pathological	F	66	IV	109463	53709	50340
CRC29	CRC	CRC group/pathological	M	84	IV	236071	31707	65202
CRC30	CRC	CRC group/pathological	M	72	IV	0	0	45.30
CRC31	CRC	CRC group/pathological	F	58	IV	184000	199000	23000
CRC32	CRC	CRC group/pathological	F	87	IV	24000	16000	0
CRC33	CRC	CRC group/pathological	F	74	IV	0	0	8.90
CRC34	CRC	CRC group/pathological	F	59	IV	0	18000	0.00
CRC35	CRC	CRC group/pathological	F	55	IV	19278	12888	47169
CRC36	CRC	CRC group/pathological	F	74	IV	132755	0	132517
CRC37	CRC	CRC group/pathological	M	82	IV	0	0	316.00
CRC38	CRC	CRC group/pathological	M	84	IV	32583	2774	91248
CRC39	CRC	CRC group/pathological	F	58	IV	84957	3247	27593
CRC40	CRC	CRC group/pathological	M	54	IV	19687	35489	17085
CRC41	CRC	CRC group/pathological	M	54	IV	271000	0	62000
CRC42	CRC	CRC group/pathological	F	51	IV	57217	45816	10953
CRC43	CRC	CRC group/pathological	F	77	IV	0	0	2.40

*RLU, Relative Luminescence Units

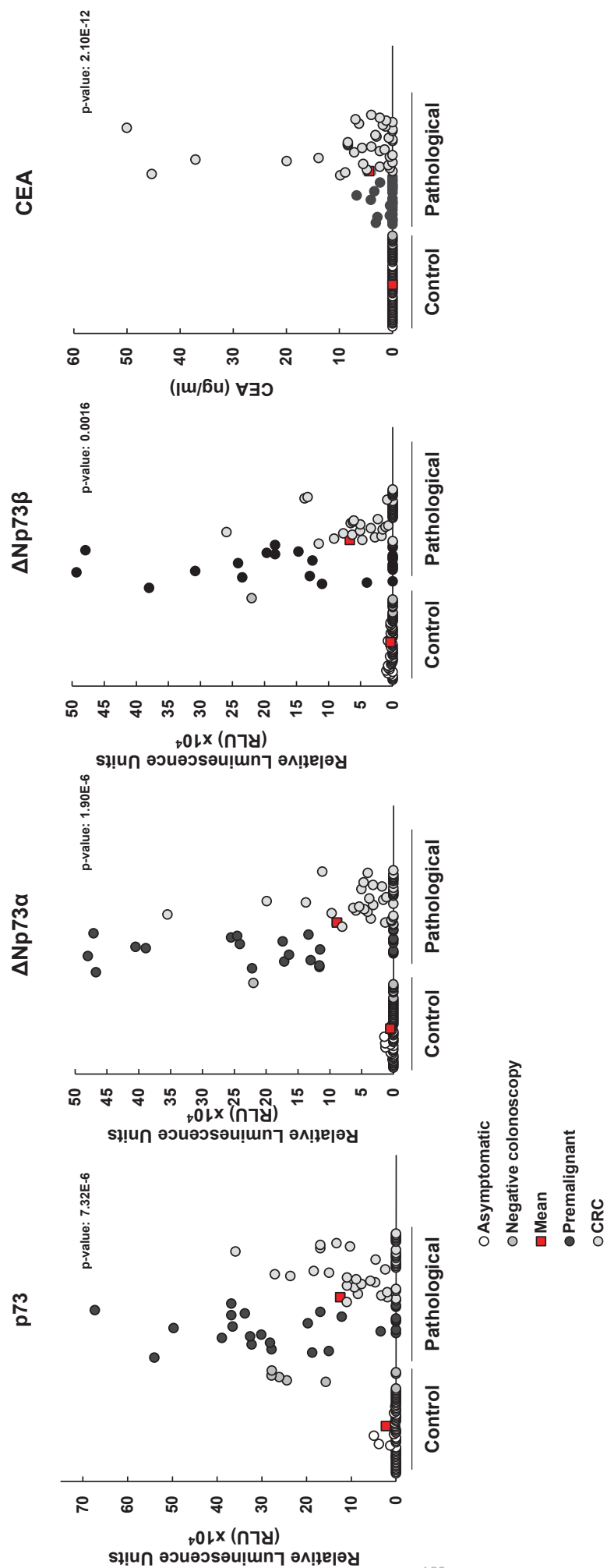
Supplementary Table S2. Information of the primary and secondary antibodies or reagents used in the study.

Primary Antibodies						
Antibody target	Clonality	Source	Application	Dilution	Provider	Reference
p73	Monoclonal	Mouse	WB	1:1000	Pierce	38c674.2
GST	Monoclonal	Mouse	WB	1:5000	Cell Signaling	2624
GST	Polyclonal	Rabbit	ELISA	1:100	GE Healthcare	27457701
HRP-labeled secondary antibodies or HRP-labeled reagents						
Name	Clonality	Source	Application	Dilution	Provider	
HRP anti-mouse	Polyclonal	Goat	WB	1:2500	Dako	
HRP anti-rabbit	Polyclonal	Goat	WB	1:3000	BioRad	
HRP Human-IgG-biotin	Polyclonal	Goat	ELISA	1:20000	Jackson	
HRP-streptavidin			ELISA	1:1000	Raybiotech	
HRP Human-IgG	Polyclonal	Goat	ELISA	1:3000	Dako	



Supplementary Fig. S1.

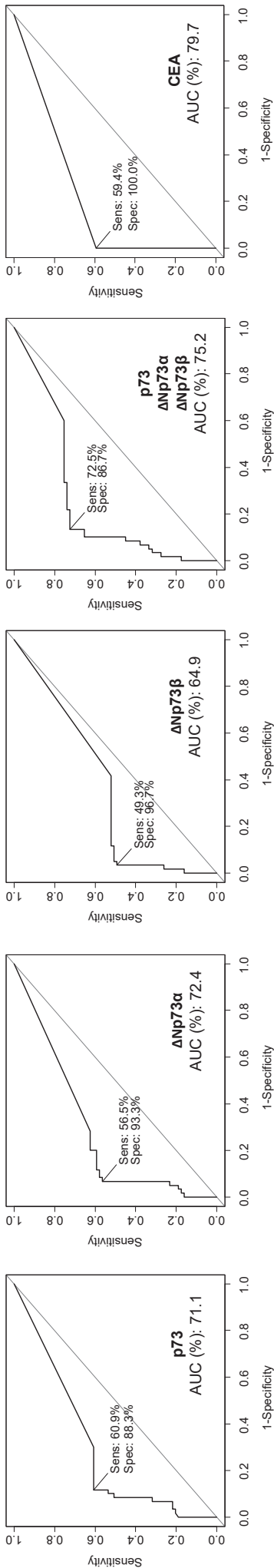
Evaluation of the seroreactivity to p73, ΔNp73α, and ΔNp73β. Plasma from colorectal cancer patients, and premalignant individuals showed specific reactivity against p73, ΔNp73α and ΔNp73β in comparison to control samples (asymptomatic and control individuals with negative colonoscopy). Plasma was tested by the ELISA-based Luminescence test using the proteins expressed in vitro fused to GST in the C-terminal end. Results are represented as bar graph comparing the seroreactivity of each plasma sample against all analyzed proteins. Remarkably, since during the course of the investigations we found six seroreactive controls with negative colonoscopy that were diagnosed cancer lesions non-associated to CRC (not included in the study and in the statistical analysis), those seroreactive control individuals with negative colonoscopy depicted in the figure are subjected to extensive clinical management for further assessment.



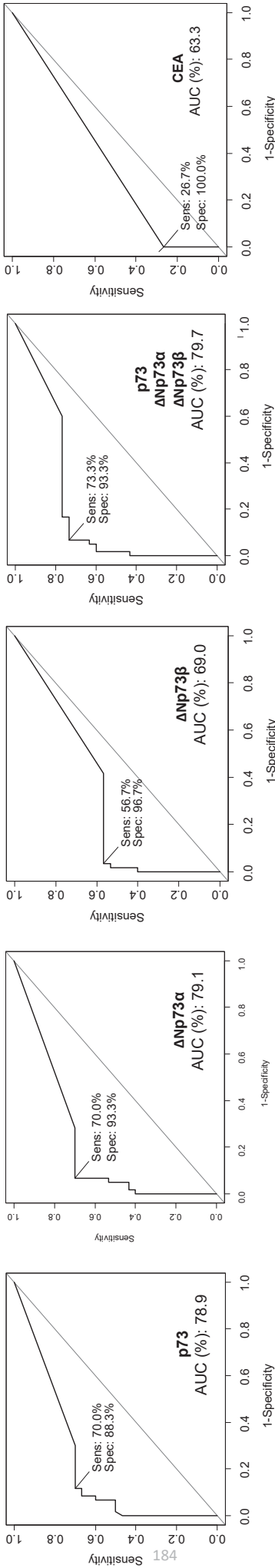
Supplementary Fig. S2.

Dot-plot analysis of the seroreactivity to p73, ΔNp73α, and ΔNp73β in comparison to CEA values. The individual seroreactivity of each patient to p73, ΔNp73α, and ΔNp73β with the characteristics of all plasma samples is shown. Statistical differences (p-value=7.32e-06, 1.90e-06, and 0.0016) were found comparing the mean value of the luminescence signal obtained for each proteoform (p73, ΔNp73α, and ΔNp73β, respectively) for the control group and the pathological groups. Statistical differences (p-value=2e-12) were also found for CEA values in discriminating control and pathological groups.

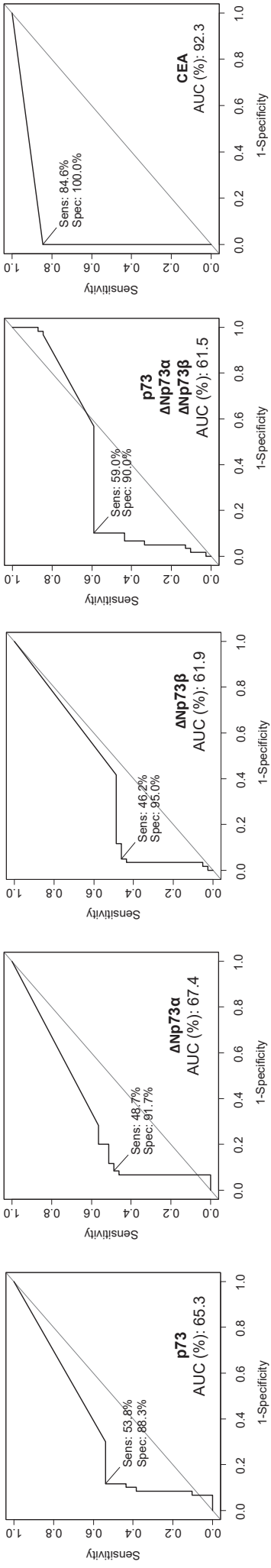
Control group vs pathological group



Control group vs premalignant individuals

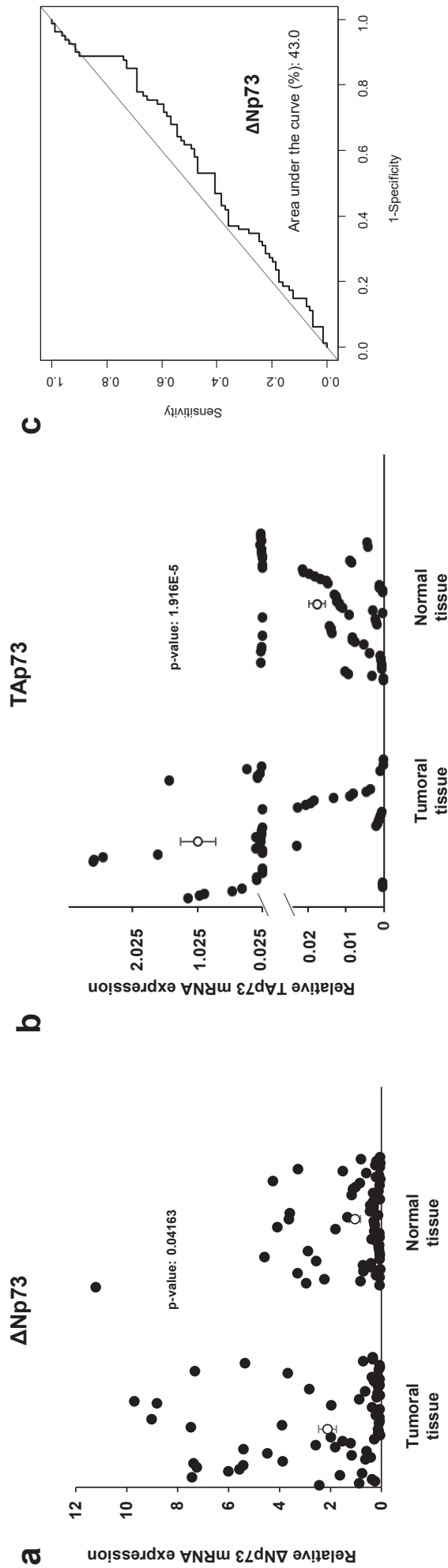


Control group vs CRC patients



Supplementary Fig. S3.

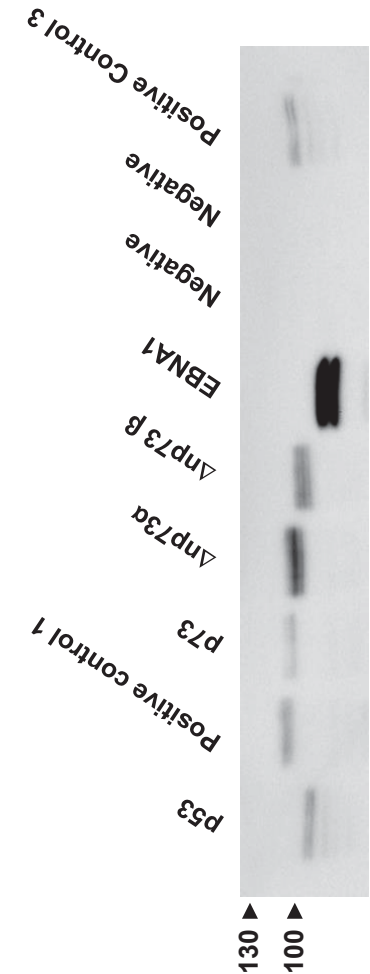
Individual and combined ROC curves for the seroreactivity to p73, $\Delta Np73\alpha$, or $\Delta Np73\beta$ were calculated in comparison to CEA values to assess their predictive value according to the indicated comparisons.



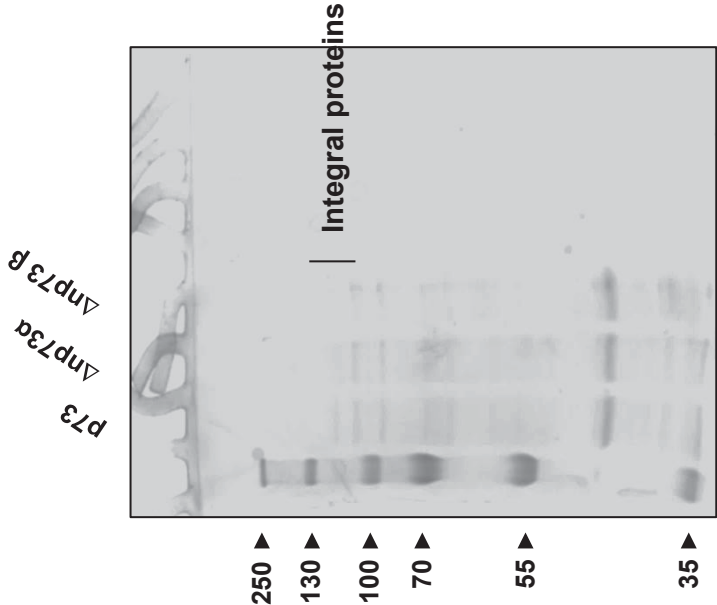
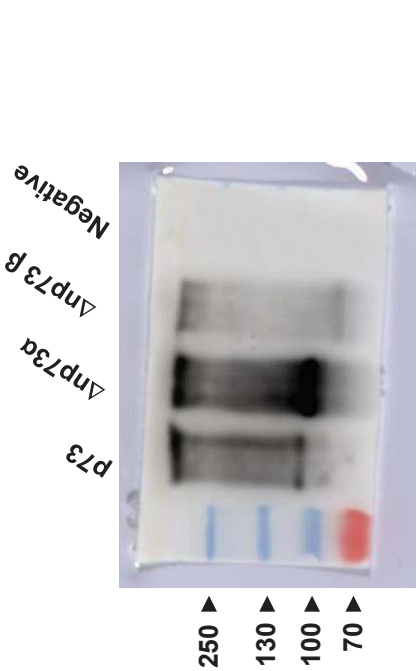
Supplementary Fig. S4.

Dot-plot representation of the evaluation of $\Delta Np73$ and TAp73 relative mRNA expression levels in paired normal and pathological tissue samples by qPCR. (a) For $\Delta Np73$, relative mRNA expression 2.12 ± 0.35 (mean $\pm$ SEM) was found in pathological tissue, while values of 1.05 ± 0.13 (mean $\pm$ SEM) were found in normal tissue (p-value=0.03642). (b) For TAp73, relative mRNA expression of 1.02 ± 0.27 (mean $\pm$ SEM) was found in pathological tissue, while values of 0.017 ± 0.002 (mean $\pm$ SEM) were found in normal tissue (p-value=2.662e-5). (c) Assessment of the predictive value of the relative mRNA expression levels for $\Delta Np73$ in tissue samples of healthy individuals and premalignant and CRC subjects was performed through ROC curves.

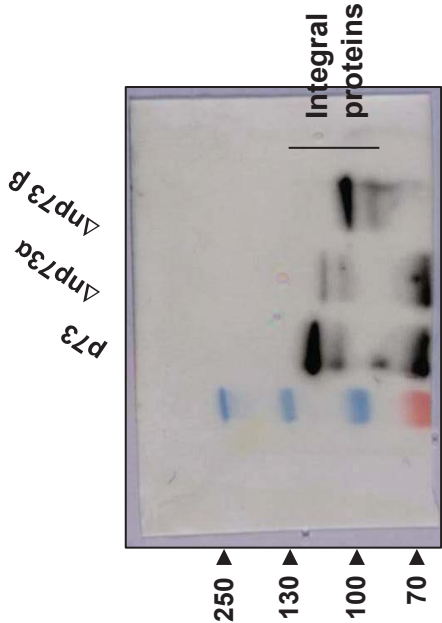
GST mAb immunostaining from Figure 1



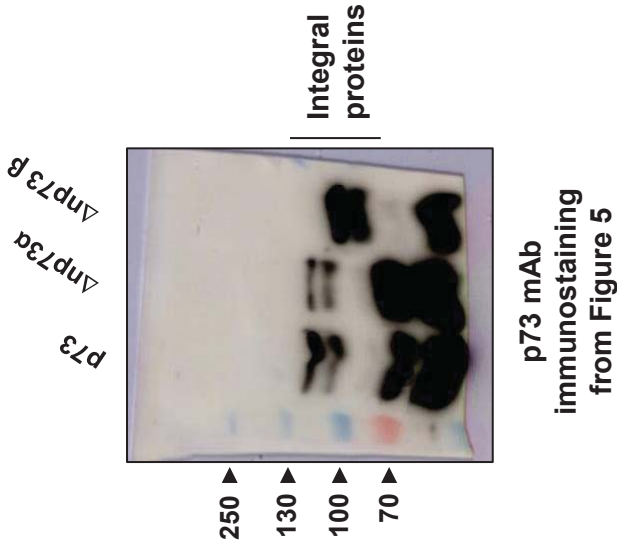
p73 mAb immunostaining from Figure 1



Coomassie Blue staining from Figure 5



HaloTag pAb immunostaining from Figure 5



Supplementary Fig. S5.
Full-length blots/gels from figures 1 and 5 are presented.

Artículo 4

The Humoral Immune Response to PTPRN links Type 2 Diabetes Patients with Colorectal Cancer and Identifies a Potential Therapeutic Target of Colorectal Cancer.

La familia de proteínas PTPRs (compuesta por 21 receptores, la mayoría huérfanos) puede tener funciones oncogénicas o actuar como supresores tumorales. Estas proteínas se han visto involucradas en la regulación del sistema inmune, el desarrollo vascular y el desarrollo del sistema nervioso, aunque se desconocen las señales extracelulares relacionadas con su control. Dentro de la familia PTPR, PTPR tipo N (PTPRN) se ha visto involucrado en distintos tipos de cáncer y en la diabetes tipo 1 [260, 261]. PTPRN, también conocido como IA-2, cuenta con un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Además, la presencia de autoanticuerpos frente a la proteína es indicativo de diabetes tipo 1, sirviendo como elemento diagnóstico [261]. Sin embargo, la presencia de estos autoanticuerpos no se ha estudiado en los pacientes de diabetes tipo 2.

Hasta la fecha, estudios epidemiológicos han relacionado el desarrollo de la diabetes tipo 2 con un mayor riesgo de padecer CCR [262]. Por tanto, la presencia de autoanticuerpos relacionados con la diabetes podría servir para identificar pacientes con CCR o *viceversa*. Con este fin, en este trabajo se ha evaluado el posible papel de PTPRN como elemento diagnóstico en una población de sueros bien caracterizada con CCR con o sin diabetes tipo 2 y su función en la patología.

Mediante ensayos de seroreactividad, se ha comprobado la presencia de autoanticuerpos frente a PTPRN y su dominio extracelular en pacientes con cáncer colorrectal y pacientes con cáncer colorrectal y diabetes tipo 2 en comparación con individuos control (individuos sanos e individuos con diabetes tipo 2). La presencia de autoanticuerpos frente a la proteína completa y su dominio extracelular, además, permitió discriminar entre grupos de pacientes con elevada sensibilidad y especificidad, indicando su utilidad como posible elemento diagnóstico de pacientes de cáncer colorrectal con diabetes tipo 2. Por último, estudios funcionales en células han permitido demostrar el efecto que el silenciamiento de PTPRN tiene sobre las propiedades tumorigénicas de líneas celulares de cáncer de colon KM12C y KM12SM.

En este trabajo de la Tesis Doctoral actualmente eviado a publicar llevé a cabo la expresión de PTPRN in vitro y el subclonaje de sus dominios extra- e intra-celular para su posterior expresión. Además, llevé a cabo los ensayos de seroreactividad y el ensayo de ELISA colorimétrico de detección de EBNA1, así como el silenciamiento transitorio de PTPRN en las líneas celulares KM12C y KM12SM y los ensayos funcionales derivados de dicho silenciamiento. También, tuve una participación fundamental en el análisis de los datos y en la escritura y revisión del manuscrito.

Artículo 5

Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatforms.

Se ha demostrado que los autoanticuerpos que reconocen antígenos asociados a tumor muestran un elevado potencial como marcadores clínicos para el diagnóstico, pronóstico y monitorización del cáncer. En este trabajo, se desarrolló un biosensor electroquímico para la determinación específica y sensible de autoanticuerpos dirigidos frente a p53. Este biosensor emplea el uso de esferas magnéticas unidas covalentemente a proteínas de fusión p53-HaloTag como elemento de captura de los autoanticuerpos. Tras la captura magnética de las esferas, éstas se depositan en electrodos recubiertos de carbono para el desarrollo de una señal amperométrica directamente proporcional a la cantidad de autoanticuerpos frente a p53 empleando el sistema hidroquinona/H₂O₂. En el estudio, se analizaron muestras de plasma de 24 pacientes con elevado riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal, 4 muestras de pacientes de cáncer colorrectal diagnosticado y 2 muestras de pacientes de cáncer de ovario. El biosensor fue capaz de determinar la presencia de autoanticuerpos con una sensibilidad mayor que un ELISA comercial empleando proteínas producidas *in situ* mediante un protocolo más simple, barato y empleando un menor volumen de muestra.

Este trabajo se presenta como parte de la Tesis Doctoral con el consentimiento del resto de coautores. Durante el estudio, llevé a cabo la expresión de las proteínas in vitro y su inmovilización en esferas magnéticas e incubación con los plasmas a analizar con el biosensor. Además, realicé el ELISA comercial de detección de autoanticuerpos frente a p53 para comparar los resultados obtenidos con el sensor. Participé en la escritura y revisión del manuscrito.

Este trabajo se publicó en la revista Analytical Chemistry. 2016 Dec 20;88(24):12339-12345. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03526.

Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatforms

María Garranzo-Asensio,[†] Ana Guzman-Arangué,[†] Carmen Povés,[‡] María Jesús Fernández-Aceñero,[§] Rebeca M. Torrente-Rodríguez,^{||} Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel,^{||} Gemma Domínguez,[¶] Luis San Frutos,[°] Nuria Rodríguez,[⊥] Mayte Villalba,[•] José M. Pingarrón,^{*,||} Susana Campuzano,^{*,||} and Rodrigo Barderas^{*,•}

[†]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

[‡]Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040 Madrid, Spain

[§]Surgical Pathology Department, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040 Madrid, Spain

^{||}Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

[¶]Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, E-28029 Madrid, Spain

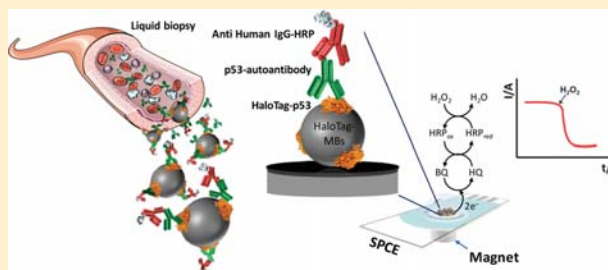
[°]Gynecology and Obstetrics Department, Hospital Puerta de Hierro, E-28222 Majadahonda, Spain

[⊥]Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, E-28046 Madrid, Spain

[•]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Autoantibodies raised against tumor-associated antigens have shown high promise as clinical biomarkers for reliable diagnosis, prognosis, and therapy monitoring of cancer. An electrochemical disposable biosensor for the specific and sensitive determination of p53-specific autoantibodies has been developed for the first time in this work. This biosensor involves the use of magnetic microcarriers (MBs) modified with covalently immobilized HaloTag fusion p53 protein as solid supports for the selective capture of specific autoantibodies. After magnetic capture of the modified MBs onto screen-printed carbon working electrodes, the amperometric signal using the system hydroquinone/H₂O₂ was related to the levels of p53-autoantibodies in the sample. The biosensor was applied for the analysis of sera from 24 patients with high-risk of developing colorectal cancer and 6 from patients already diagnosed with colorectal (4) and ovarian (2) cancer. The developed biosensor was able to determine p53 autoantibodies with a sensitivity higher than that of a commercial standard ELISA using a just-in-time produced protein in a simpler protocol with less sample volume and easily miniaturized and cost-effective instrumentation.



Cancer was the cause of over 8 million deaths worldwide in 2013 and the second leading cause of death just behind cardiovascular disease.¹ Although substantial progress has been made in the last years for prevention and treatment of different cancer types,² cancer incidence and prevalence is increasing worldwide due to the continuous growth and aging of the global population and the maintenance or the increase in smoking, obesity, and risky dietary patterns.^{1,2} Therefore, the implementation of noninvasive massive population screening programs could help reducing cancer mortality due to the detection at early stages when the disease can be successfully

treated and cured in more than 90% of patients of the eight most common cancer types.

The immune system has been largely shown to produce autoantibodies against altered tumor-associated antigens (TAAs).^{3–5} The production of these autoantibodies, related to TAA overexpression, mutation, altered post-translational modification, etc.,⁶ may serve as indicators of tumor initiation, treatment response, or disease prognosis.⁷ Remarkably, the

Received: September 7, 2016

Accepted: November 16, 2016

Published: November 16, 2016

accurate detection of autoantibodies could be used for early diagnosis of cancer patients because it has been demonstrated that the humoral immune response in different cancer types appears several months or years before the clinical symptoms.^{8–12}

In addition, unlike other cancer biomarkers released by cancer cells and related to tumor mass, autoantibodies are indicative of the presence of a few tumor cells due to amplification by the immune system.^{10,13} Despite the advantages of autoantibody detection for cancer diagnosis, the fact that patients develop autoantibodies to multiple TAAs is a major limitation to obtaining clinically validated assays because on one hand autoantibody signature diagnostic panels should be accurately identified, and on the other hand, new immunoassays for multiplexed autoantibody detection should be developed.

A likely candidate in such autoantibody diagnostic panels should be p53. Serum p53 autoantibodies are reported in 10–40% of all cancer patients depending on the cancer type.^{11,14,15} On the other hand, electrochemical biosensors represent a great alternative to conventional immunoassays (i.e., ELISA, WB, or Luminex) for the detection of cancer biomarkers because of their simplicity of use and their versatility to detect various types of molecular targets (proteins, miRNAs, or mRNAs) simultaneously and using the same methodology.^{16–20}

Another major step for the development of immunoassays consists of the production of proteins with good yield, purity, and stability for functional studies. A recent very attractive alternative is to substitute the use of purified expensive cancer proteins for HaloTag fusion proteins produced just-in-time for the assay using a cell-free system. HaloTag is an engineered dehalogenase developed to covalently bind to halogenated alkanes.²¹ Therefore, the use of these HaloTag fusion proteins eliminates the need to express and purify proteins separately, producing in a mammalian milieu the proteins for the assay, abrogating potential concerns about protein folding, stability, and integrity during storage. This in vitro expression system is highly efficient and has succeeded at producing thousands of different proteins for the identification of disease-specific antibodies and host–pathogen interaction profiling.^{21–23} Although the uses of HaloTag fusion proteins or MB-based electrochemical bioplatfroms have been described separately in several papers of different fields, these previous works missed the obvious benefits of the combination of these two attractive technologies. This is what the strategy reported in this communication rectifies, demonstrating for the first time that the use of MBs coupled to in situ expressed HaloTag fusion proteins allows the efficient and selective scavenging of specific autoantibodies from sera samples. The further amperometric transduction permits the implementation of a very attractive, simple, and rapid electrochemical methodology for autoantibody determination. Considering the versatility of the methodology for protein immobilization, this novel strategy can be potentially generalized to other research fields such as the study of other protein-(bio)molecule interactions, making it readily applicable to the determination of other (bio)molecules apart from the relevant clinical application here described for the detection of autoantibodies for early cancer diagnosis.

EXPERIMENTAL SECTION

Apparatus and Electrodes. Amperometric measurements were performed with a CHI812B potentiostat (CH Instruments) controlled by software CHI812B. Screen-printed carbon electrodes (SPCEs)

(DRP-110, DropSens) consisting of a 4 mm diameter carbon working electrode, a carbon counter electrode, and an Ag pseudoreference electrode were employed as transducers, and a specific cable connector (DRP-CAC also from DropSens, S.L.) acted as interface between the SPCEs and the potentiostat. A DynaMag-2 Magnet from Invitrogen (Spain) and a MixMate microtube mixer from Eppendorf (Germany) were employed for the magnetic separation and incubation of the MBs. Capture of the modified MBs onto the working electrode surface of the SPCE was controlled by a neodymium magnet (AIMAN GZ) embedded in a homemade casing of Teflon.

Reagents and Solutions. Antihuman IgG antibody HRP conjugated was from Dako (Barcelona). HaloTag magnetic beads (HaloTag MBs, 50–80 μm $\varnothing$, MBs Magne HaloTag beads, Cat. No: G7281) were obtained from Promega (Promega Biotech Ibérica, Madrid) and used as received according to the manufacturer instructions. Tween 20, hydroquinone (HQ), and H_2O_2 (30% w/v) were purchased from Sigma-Aldrich. A blocker casein solution (a ready-to-use, PBS solution of 1% w/v purified casein) from Thermo Scientific was also used. All other chemicals were of analytical grade, and ultrapure water (Millipore Milli-Q) was used throughout. A 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) solution was used to perform the electrochemical measurements.

Patient Sera. The Institutional Ethical Review Board of the Clínico San Carlos Hospital (Madrid) approved this study on biomarkers. Serum samples were obtained from the biobank of the Clínico San Carlos Hospital, which belongs to the San Carlos Clinical Research Institute of health (IdiSSC) and is part of the Spanish National Biobank Network of the ISCIII, cofunded with FEDER funds.

A total of 62 individuals who followed up in gastroenterology outpatient clinics due to a high risk of colorectal cancer (based on colorectal cancer familial history not linked to a reported inherited disease and a positive fecal occult blood test) were included in the study (see details in Table S1). In all cases, one or two different tissue samples were also obtained from each patient at the Gastroenterology Unit of the Clínico San Carlos Hospital and analyzed in the Surgical Pathology Department of the same hospital (histological data from all patients are also included in Table S1). The p53 autoantibody seroreactivity was analyzed to identify those patients that should be extensively monitored for the presence of neoplastic colorectal lesions. All samples were obtained from the hospital prior to initiating any treatment between June 2015 and March 2016. Samples were collected using a standardized sample collection protocol and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until use.^{10,24–28}

Sera samples from 6 patients already diagnosed with colorectal (4) and ovarian (2) cancer were also obtained from La Paz and Puerta de Hierro Hospitals (Madrid) after approval of the Ethical Review Board of the institution. Written informed consent was obtained from all patients.

In Vitro Optimized Gateway Plasmid Construction, Gene Cloning, DNA Preparation, and in Vitro Protein Expression. Sequence-verified, full-length cDNA plasmids containing *TP53*, *TP63*, and *TP73* in flexible pDONR221 or pENTR223 vector systems were obtained from the publicly available DNASU Plasmid Repository (<https://dnasu.org/DNASU/Home.do>). ORFs were transferred to pANT7_cHalo vector by LR recombinase (Invitrogen, Carlsbad, CA) for in vitro expression of p53, p63, and p73 fusion proteins to HaloTag at the C-terminal end. For the construction of the Gateway compatible pANT7_cHalo plasmid, pANT7_cGST plasmid digested with *XhoI* and *BstBI* was used to subclone the HaloTag cDNA amplified by PCR using the pFN18a plasmid as template and the sense 5'-AAACTCGAGATGGCAGAAATCGGT-3' and the antisense 5'-AAATTCGAATTAACCGGAAATCTC-3' oligonucleotides (purchased from IDT Integrated DNA technologies). After purification, the PCR product was digested with *XhoI* and *BstBI*, ligated into digested pANT7_cGST plasmid, transformed into DB3.1 cells, and grown in Luria–Bertani (LB) supplemented with chloramphenicol and ampicillin. A schematic representation of the steps followed to construct the pANT7_cHalo plasmid is displayed in Figure S1. Then, the plasmid was purified using the NucleoBond Xtra Midi kit

RESULTS AND DISCUSSION

The fundamentals of the first electrochemical biosensor involving the use of HaloTag fusion proteins-modified MBs for the specific and sensitive quantification of p53-specific autoantibodies in sera and the reactions involved in the electrochemical transduction are depicted in Scheme 1. This novel approach makes use of MBs modified by covalent immobilization of C-terminal-tagged HaloTag fusion in vitro expressed proteins, as efficient magnetic microcarriers to selectively capture the autoantibodies against the immobilized protein present in the sera of patients. Subsequently, the attached autoantibodies are detected with a secondary HRP conjugated antihuman IgG. Then, the MBs bearing the immunocomplexes are magnetically captured on the SPCE, and the biorecognition event is monitored by amperometric transduction at -0.20 V (vs a Ag pseudoreference electrode) of the cathodic current generated by the enzymatic reduction of H_2O_2 mediated by HQ.

Remarkably, this approach may be an interesting alternative for the early detection of tumors in comparison to traditional approaches, which are still either costly in time of manufacturing (i.e., traditional methods that use purified proteins require weeks or months of protein preparation and optimization prior to the development of the immunoassay) or in price (i.e., multiplex technologies like Luminex are difficult to afford in multiple laboratories). In the proposed approach, the proteins used as selective capture bioreceptors are expressed in a mammalian microenvironment during the immunoassay by in vitro transcription/translation, avoiding at the same time the expression and purification steps regarding bacterial, insect, or mammalian cells, the concerns regarding to the stability and integrity of the protein during storage, and the presence of potentially immunogenic bacterial products in the conventional immunoassays. Moreover, the use of MBs is known to be a powerful tool in a variety of bioassays. In particular, they improve the performance of disposable electrochemical biosensors in terms of sensitivity, reduced assay time, and minimization of matrix effects and avoid the need for delicate electrode preparation to enable control of density and orientation of recognition probes at the surface.^{32–34} In addition, the required instrumentation with MB-based immunosensing platforms is inexpensive and might be reduced to pocket-size dimensions ideal for their integration in point-of-care devices.³⁵

First, covalent immobilization of HaloTag p53, p63, and p73 fusion proteins expressed in vitro to MBs was assessed. The efficiency of the immobilization onto MBs was evaluated by using anti-HaloTag, anti-p53, and anti-p73 antibodies. Amperometric (Figure 1) and luminescence (Figure S3 in the Supporting Information) measurements were carried out for this purpose.

Results obtained with both strategies were in full agreement. Specific responses were only obtained in the presence of anti-HaloTag to all fusion proteins and with anti-p53 and anti-p73 antibodies when the p53 and the p73 HaloTag fusion proteins were immobilized, respectively, onto the MBs. These results demonstrated the great potential of the surface chemistry involved (HaloTag fusion protein-HaloTag-MBs), suitable for the efficient immobilization of all proteins with similar yields without particular optimization parameters and the feasibility of the so prepared biosensors for the specific detection of autoantibodies. Subsequent experiments were focused on p53

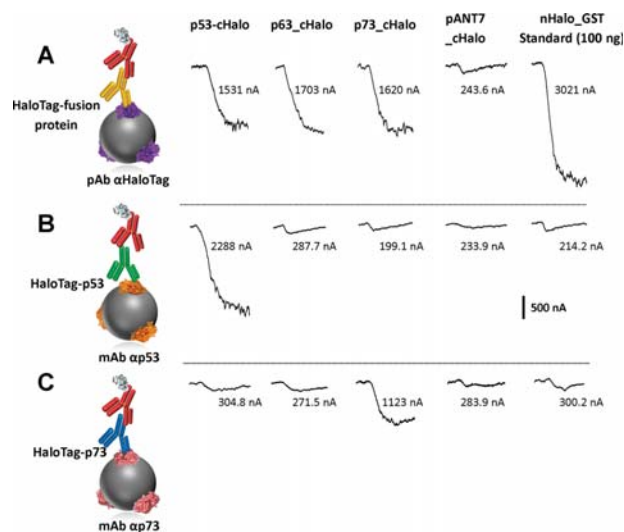


Figure 1. Specific biosensing detection of HaloTag fusion proteins. DNA expression plasmids were used to express in vitro p53, p63, and p73 proteins, which were then covalently immobilized onto HaloTag MBs and detected by amperometry using (A) an anti-HaloTag pAb, (B) an anti-p53 mAb, and (C) anti-p73 mAb followed by conjugation with specific secondary HRP-labeled antibodies. Amperometric traces recorded with the HaloTag fusion protein modified MB-based biosensors are shown. pANT7_cHalo DNA (no protein expression) and HaloTag-GST protein were included as negative and positive controls, respectively.

autoantibodies for their important role in early cancer detection, reported to be elevated up to 3.8 years before clinical diagnosis and in stratification according to the cancer patient risk.^{11,14} Therefore, the use of a low-cost screening assay for the detection of p53 autoantibodies should be of worldwide public health benefit.^{1,2,11,14} In addition, the detection of p53 autoantibodies is of interest in the follow-up of cancer patients during or after treatment and to detect recurrences (because it has been reported that after cancer curation p53 autoantibodies progressively decline^{13,36}).

The detection of the presence of autoantibodies to p53 was performed on a noncharacterized population of 62 sera from individuals at the high-risk program to develop colorectal cancer (Table S1). ELISA test determined that 32 out of the 62 analyzed sera (mean $\pm$ SEM 0.33 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.008 , $p < 0.01$) were positive for the presence of p53 autoantibodies with an absorbance 5 times higher than that of the negative control (Figure 2 and Table S1 in the Supporting Information). The seroreactivity to EBNA1 was employed as a control because 90–95% of all human individuals are reactive to that virus. Only 5 individuals in total were found to be nonreactive to EBNA1. As it can be seen in Figure 2, a similar seroreactivity to EBNA1 was found in p53 reactive and nonreactive patients (mean $\pm$ SEM 0.88 ± 0.08 vs 0.98 ± 0.10 , $p = 0.414$). Therefore, these data confirmed the selective seroreactivity to p53 in the analyzed population.

The experimental variables involved in the amperometric detection of p53 autoantibodies were optimized by comparing the analytical responses obtained with a pool of p53 positive and p53 negative sera following the protocol described in section Preparation of the HaloTag Fusion Protein Modified MB- Based Biosensor and Assay Procedure. The volume of IVTT was optimized to be $1.8 \mu\text{L}$ per $1 \mu\text{L}$ of functionalized

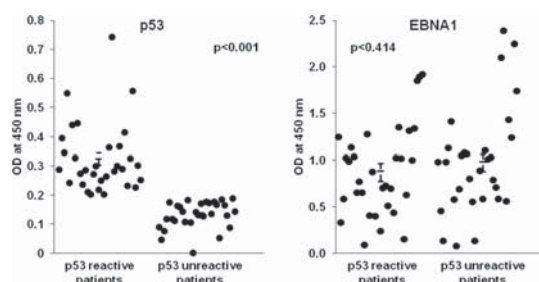


Figure 2. Analysis of the seroreactivity to p53 by ELISA. The specific autoantibody response to p53 was analyzed in comparison to EBNA1, a protein of the capsid of the Epstein–Barr Virus.²⁵ Sera from the 62 individuals were analyzed at a 1:100 dilution, and the specific IgGs bound to either p53 or EBNA1 were detected using a secondary HRP-labeled antihuman IgG.

MBs. It is important to note that the one-step protocol for in situ production and selective capture of the HaloTag fusion protein is much simpler than the conventional procedure to get purified p53 produced in bacteria, insect, or mammalian cells, which usually requires weeks or months. Incubation times of HaloTag-p53-MBs with serum sample (1 h) and with the secondary antibody (30 min) were also optimized. Importantly, the whole protocol took no more than 5.5 h. However, it is important to mention that HaloTag fusion protein-modified MBs could be prepared in advance and stored at least during 7 days in filtered PBS at 4 °C (no longer times were assayed) until the determinations should be performed, reducing the assay time to only 1.5 h. Moreover, the detection potential used was previously optimized for the HRP/HQ/H₂O₂ system at SPCEs.³⁷

The analytical performance of the electrochemical biosensing approach was characterized using as standard the calibrator provided in the commercial ELISA kit (diluted human serum with a defined p53 autoantibody concentration of 10 U mL⁻¹, being 1 U defined as p53 binding activity which corresponds to the binding activity of 100 μ L of undiluted calibrator). Under the selected experimental conditions, the calibration plot constructed with serial dilutions of this standard (Figure 3) exhibited a linear relationship ($r = 0.999$) between 1.1 and 5 U mL⁻¹ with a slope value of (215.2 ± 0.2) nA mL U⁻¹. Detection (LOD) and quantification (LQ) limits of 0.34 and 1.1 U mL⁻¹, respectively, were calculated according to the $3 \times s_b/m$ and $10 \times s_b/m$ criteria, respectively, where m is the slope

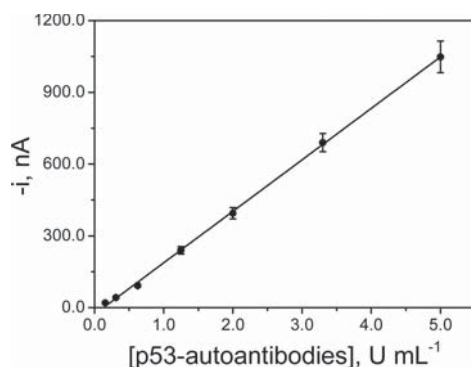


Figure 3. Calibration plot constructed for p53 autoantibodies standard with the developed electrochemical biosensor. Error bars are estimated as triple of the standard deviation ($n = 3$).

of the linear calibration plot and s_b was estimated as the standard deviation of ten amperometric signals measured for a 2 times diluted negative control provided by the ELISA kit (a 1:100 dilution of serum containing no p53 autoantibodies). A relative standard deviation (RSD) value of 6.2% was estimated from the measurements made with 5 different sensors for the 1.25 U mL⁻¹ p53-autoantibodies standard solution, demonstrating a great reproducibility of the whole MB-based sensor fabrication, including in situ expression of the HaloTag fusion protein and the signal transduction protocols. It is important to mention also that although the LOD is not included in the specifications of the ELISA kit, the minimum recommended dilution of the calibrator is 32 times (~ 0.3 U mL), very similar to the value estimated with the electrochemical bioplatfrom. Moreover, the sensitivity of the developed biosensor is 440 higher than the ELISA methodology (215.2 nA mL U⁻¹ vs 0.4876 absorbance units mL U⁻¹). As demonstrated below, this significantly higher sensitivity allows both a better discrimination between p53 reactive and nonreactive serum samples and the possibility of using serum samples in 2 times larger dilutions for the analysis.

The applicability of the developed bioanalytical scaffold to the analysis of real samples was checked by analyzing serial dilutions (between 1:50 and 1:1200) of raw human sera from a pool of patients nonreactive to p53 and a pool of seroreactive individuals to p53 using two detection antibodies: a HRP-labeled secondary antibody and a biotin-labeled secondary antibody with further labeling with streptavidin-HRP (Figure S4). For all sera assayed, the nonspecific amperometric signal (obtained with MBs modified with reticulocyte containing pANT7_cHalo (no protein expression)) was subtracted from each specific signal to p53. Best results for the detection of p53 autoantibodies with biotin labeled anti-human IgG followed by streptavidin-HRP were observed using a serum 1:600 dilution (Figure S4). However, the best results in terms of positive/control signal ratio for the sera pool were achieved by using a 1:200 human serum dilution followed by a 1:600 dilution of HRP-labeled secondary antibody (Figure S4).

The diagnostic effectiveness of the biosensing approach was then evaluated by analyzing 24 human sera (12 random p53 seroreactive and 12 random nonseroreactive patients identified by ELISA, Table S1), and the results were compared with those obtained by using the ELISA test. In general, both methodologies significantly detected higher levels of autoantibodies against p53 in p53 seroreactive patients in comparison to p53 nonseroreactive patients (Figure 4). However, the results from sera of CSC16, CSC30, CSC31, CSC36, CSC46, and CSC47 individuals were discordant between ELISA and biosensing methods involving MBs (both using amperometric and luminescence detection). In addition, no significant amperometric signal was obtained with the developed immunosensor for the nonseroreactive patients, whereas ELISA measurements for these patients always gave OD background values at 450 nm ranging between 0.05 and 0.2, which can lead to the misidentification of patients. These discordances can be attributed to the differences in concentration, type, and immobilization of bioreceptors (p53 expressed in bacteria in the ELISA test and HaloTag-p53 expressed in a mammalian milieu in the MB-based approaches) which certainly affect the autoantibodies capture efficiency. In addition, the remarkably lower sensitivity and the lower sera dilution factor required (100 vs 200 times) by the ELISA kit compared with the electrochemical biosensor made the conventional methodology

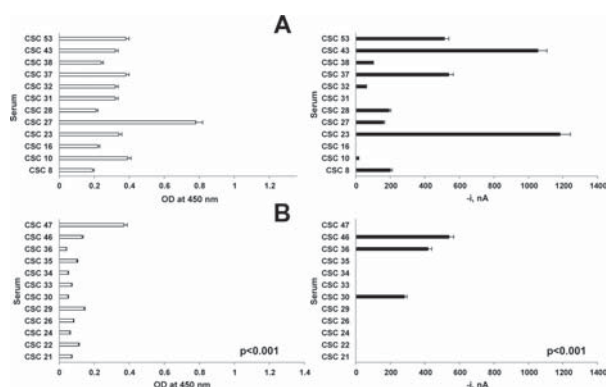


Figure 4. Comparison of the analysis of p53 autoantibody levels in 24 serum samples from p53 reactive (A) and p53 nonreactive (B) patients as identified by ELISA with the commercial ELISA kit (based on p53 produced in bacteria coated plates) (left) and the p53-HaloTag fusion protein modified MB-based biosensor (using p53 produced in a mammalian milieu rabbit reticulocyte) (right). Error bars represented the SEM p value calculated with the data from p53 seroreactive patients vs p53 nonseroreactive patients as identified by both approaches.

more prone to produce false positive results. Moreover, the presence of bacterial contaminants can produce an IgG response by ELISA unrelated to p53.

It is important to remark that better discrimination between p53 seroreactive patients and p53 nonseroreactive individuals was achieved with the electrochemical biosensor in comparison with that achieved with the ELISA test. Mean values (estimated from data of Figure 4) for p53 seroreactive and nonseroreactive patients were 404.6 ± 101.4 and 0 ± 0 nA, respectively (p value < 0.001), while the mean ODs with the ELISA test were 0.34 ± 0.045 and 0.11 ± 0.026 , respectively (p value < 0.001). Therefore, all p53 seroreactive patients and those discordant between ELISA and the biosensor will be exhaustively managed at the hospital because they are considered at very high risk to develop colorectal cancer.

Quantification of p53 autoantibodies in these complex biological samples could be accomplished simply by interpolation of the amperometric signals measured for the sera samples diluted 200 times into the calibration graph constructed with the developed biosensor using as standard the calibrator provided in the ELISA methodology (Figure 3). The obtained results (expressed in U per mL) in all sera analyzed are summarized in Table S2. Mean values (estimated from data of Table S2) for p53 seroreactive and nonseroreactive patients were 445.08 ± 105.34 and nondetectable 27.21 ± 1.22 U mL⁻¹ p53 autoantibodies, respectively (p value < 0.001), in good agreement with the cutoff value of 120 U mL⁻¹ established in the specifications by the commercial ELISA kit to discriminate between positive and negative samples for p53 autoantibodies.

Additional data were obtained in the analysis of sera samples collected from patients already diagnosed with cancer (four colorectal and two ovarian). Results are summarized in Table S3 and demonstrated again the reliability of the developed electrochemical biosensor to also perform selective determination of the p53 autoantibodies in sera samples from different cohorts of patients.

CONCLUSIONS

To our knowledge, this work reports the first electrochemical biosensor to monitor the humoral immune response of cancer patients through the determination of p53 autoantibodies using HaloTag technology. The methodology, involving the use of MBs modified with HaloTag, in vitro expressed fusion proteins, and disposable electrodes, exhibits an excellent performance to provide accurate determination of p53 autoantibodies, which might serve to monitor patient specific levels of p53 antibodies during the course of the disease or therapeutic manipulations. Compared with the conventional ELISA, the developed biosensor provided more sensitive determination (440 times) and better discrimination between p53 seroreactive and nonseroreactive patients and allowed the analysis to be performed with lower cost and in shorter time. Moreover, the developed approach substitutes the use of purified expensive cancer proteins for their just-in-time production for the assay using a cell-free system, abrogating potential concerns about stability and integrity of the proteins during storage. All of these interesting capabilities make the developed approach a promising tool compared both to the ELISA and also to the luminescence approach to be readily implemented in low-cost, simple use, short time analysis and in high-throughput and multiplexed devices for diagnostics, patient follow-up, and monitoring of cancer patients alone or in combination with other biomarkers. Furthermore, given the suitability of the developed HaloTag surface chemistry-based electrochemical approach for the immobilization of multiple proteins with similar yields without particular optimization parameters, the presented approach could also find widespread interest in the evaluation and study of other protein-(bio)molecule interactions such as fundamental studies involving protein–protein or drug–protein interactions.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03526.

Schematic display of steps, protein expression analysis, luminescence analysis, and optimization charts (Figures S1–S4) and patient clinical information and quantification of autoantibodies (Tables S1–S3) (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Tel.: +34 913944315; Fax: +34 913944329; E-mail: pingarro@quim.ucm.es.

*Tel.: +34 913944368; Fax: +34 913944329; E-mail: susanacr@quim.ucm.es.

*Tel.: +34 913944155; Fax: +34 913946859; E-mail: rbarderas@quim.ucm.es.

Author Contributions

M.G., A.G.A., C.P., M.J.F.A., R.M.T.R., V.R.V.M., S.C., and R.B. performed research. A.G.A., J.M.P., M.V., G.D., L.S.F., N.R., S.C., and R.B. contributed reagents and essential samples to the work. The manuscript was written through contributions of all authors. M.G., R.M.T.R., V.R.V.M., J.M.P., S.C., and R.B. wrote the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript. *J.M.P., S.C. and R.B. contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects CTQ2015-64402-C2-1-R and SAF2014-53209-R and the NANOAVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2013/MT-3029) is gratefully acknowledged. R.M.T.R. and V.R.V.M. acknowledge predoctoral contracts from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and Universidad Complutense de Madrid, respectively. R.B. is supported by the Ramón y Cajal Programme of the MINECO. M.G.A. is supported by a contract of the Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI) with the participation of the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y del Fondo Social Europeo.

REFERENCES

- (1) Naghavi, M.; et al. *Lancet* **2015**, 385, 117–171.
- (2) Allemani, C.; Weir, H. K.; Carreira, H.; Harewood, R.; Spika, D.; Wang, X. S.; Bannon, F.; Ahn, J. V.; Johnson, C. J.; Bonaventure, A.; Marcos-Gragera, R.; Stiller, C.; Silva, G. A. E.; Chen, W. Q.; Ogundbiyi, O. J.; Rachet, B.; Soeberg, M. J.; You, H.; Matsuda, T.; Bielska-Lasota, M.; Storm, H.; Tucker, T. C.; Coleman, M. P.; Grp, C. W. *Lancet* **2015**, 385, 977–1010.
- (3) Anderson, K. S.; LaBaer, J. J. *Proteome Res.* **2005**, 4, 1123–1133.
- (4) Tan, E. M. *J. Clin. Invest.* **2001**, 108, 1411–1415.
- (5) Zaenker, P.; Gray, E. S.; Ziman, M. R. *Autoimmun. Rev.* **2016**, 15, 477–483.
- (6) Casal, J. I.; Barderas, R. *Mol. Diagn. Ther.* **2010**, 14, 149–154.
- (7) Piura, E.; Piura, B. *J. Oncol.* **2011**, 2011, 982425.
- (8) Nesterova, M.; Johnson, N.; Cheadle, C.; Cho-Chung, Y. S. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2006**, 1762, 398–403.
- (9) Noaki, R.; Kawahara, H.; Watanabe, K.; Ushigome, T.; Kobayashi, S.; Yanaga, K. *Int. Surg* **2010**, 95, 287–292.
- (10) Barderas, R.; Villar-Vazquez, R.; Fernandez-Acenero, M. J.; Babel, I.; Pelaez-Garcia, A.; Torres, S.; Casal, J. I. *Sci. Rep.* **2013**, 3, 2938.
- (11) Pedersen, J. W.; Gentry-Maharaj, A.; Fourkala, E. O.; Dawnay, A.; Burnell, M.; Zaikin, A.; Pedersen, A. E.; Jacobs, I.; Menon, U.; Wandall, H. H. *Br. J. Cancer* **2013**, 108, 107–114.
- (12) Qiu, J.; Choi, G.; Li, L.; Wang, H.; Pitteri, S. J.; Pereira-Faca, S. R.; Krasnoselsky, A. L.; Randolph, T. W.; Omenn, G. S.; Edelstein, C.; Barnett, M. J.; Thornquist, M. D.; Goodman, G. E.; Brenner, D. E.; Feng, Z.; Hanash, S. M. *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5060–5066.
- (13) Hafner, N.; Nicolaus, K.; Weiss, S.; Frey, M.; Diebold, H.; Rengsberger, M.; Durst, M.; Runnebaum, I. B. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2013**, 139, 1207–1210.
- (14) Soussi, T. *Cancer Res.* **2000**, 60, 1777–1788.
- (15) Katchman, B. A.; Barderas, R.; Alam, R.; Chowell, D.; Field, M. S.; Esserman, L. J.; Wallstrom, G.; LaBaer, J.; Cramer, D.; Hollingsworth, M. A.; Anderson, K. S. *Proteomics: Clin. Appl.* **2016**, 10, 720.
- (16) Chikkaveeraiah, B. V.; Bhirde, A. A.; Morgan, N. Y.; Eden, H. S.; Chen, X. Y. *ACS Nano* **2012**, 6, 6546–6561.
- (17) Elettigerra, U.; Martinez-Perdiguerro, J.; Barderas, R.; Pingarron, J. M.; Campuzano, S.; Merino, S. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 905, 156–162.
- (18) Elettigerra, U.; Martinez-Perdiguerro, J.; Merino, S.; Barderas, R.; Torrente-Rodriguez, R. M.; Villalonga, R.; Pingarron, J. M.; Campuzano, S. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 70, 34–41.
- (19) Esteban-Fernandez de Avila, B.; Araque, E.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Dalkiran, B.; Barderas, R.; Villalonga, R.; Kilic, E.; Pingarron, J. M. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 2290–2298.
- (20) Torrente-Rodriguez, R. M.; Campuzano, S.; Lopez-Hernandez, E.; Montiel, V. R.; Barderas, R.; Granados, R.; Sanchez-Puelles, J. M.; Pingarron, J. M. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 66, 385–391.
- (21) Hurst, R.; Hook, B.; Slater, M. R.; Hartnett, J.; Storts, D. R.; Nath, N. *Anal. Biochem.* **2009**, 392, 45–53.
- (22) Wang, J.; Barker, K.; Steel, J.; Park, J.; Saul, J.; Festa, F.; Wallstrom, G.; Yu, X.; Bian, X.; Anderson, K. S.; Figueroa, J. D.; LaBaer, J.; Qiu, J. *Proteomics: Clin. Appl.* **2013**, 7, 378–383.
- (23) Yu, X.; Decker, K. B.; Barker, K.; Neunuebel, M. R.; Saul, J.; Graves, M.; Westcott, N.; Hang, H.; LaBaer, J.; Qiu, J.; Machner, M. P. *J. Proteome Res.* **2015**, 14, 1920–1936.
- (24) Babel, I.; Barderas, R.; Diaz-Uriarte, R.; Martinez-Torrecuadrada, J. L.; Sanchez-Carbayo, M.; Casal, J. I. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8, 2382–2395.
- (25) Babel, I.; Barderas, R.; Diaz-Uriarte, R.; Moreno, V.; Suarez, A.; Fernandez-Acenero, M. J.; Salazar, R.; Capella, G.; Casal, J. I. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, 10, 1784.
- (26) Barderas, R.; Babel, I.; Diaz-Uriarte, R.; Moreno, V.; Suarez, A.; Bonilla, F.; Villar-Vazquez, R.; Capella, G.; Casal, J. I. *J. Proteomics* **2012**, 75, 4647–4655.
- (27) Barderas, R.; Mendes, M.; Torres, S.; Bartolome, R. A.; Lopez-Lucendo, M.; Villar-Vazquez, R.; Pelaez-Garcia, A.; Fuente, E.; Bonilla, F.; Casal, J. I. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, 12, 1602–1620.
- (28) Villar-Vazquez, R.; Padilla, G.; Fernandez-Acenero, M. J.; Suarez, A.; Fuente, E.; Pastor, C.; Calero, M.; Barderas, R.; Casal, J. I. *Proteomics* **2016**, 16, 1280–1290.
- (29) Ramachandran, N.; Raphael, J. V.; Hainsworth, E.; Demirkan, G.; Fuentes, M. G.; Rolfs, A.; Hu, Y.; LaBaer, J. *Nat. Methods* **2008**, 5, 535–538.
- (30) Barderas, R.; Shochat, S.; Timmerman, P.; Hollestelle, M. J.; Martinez-Torrecuadrada, J. L.; Hoppener, J. W.; Altschuh, D.; Meloen, R.; Casal, J. I. *Int. J. Cancer* **2008**, 122, 2351–2359.
- (31) Anderson, K. S.; Sibani, S.; Wallstrom, G.; Qiu, J.; Mendoza, E. A.; Raphael, J.; Hainsworth, E.; Montor, W. R.; Wong, J.; Park, J. G.; Lokko, N.; Logvinenko, T.; Ramachandran, N.; Godwin, A. K.; Marks, J.; Engstrom, P.; Labaer, J. *J. Proteome Res.* **2011**, 10, 85–96.
- (32) Ma, W.; Situ, B.; Lv, W.; Li, B.; Yin, X.; Vadgama, P.; Zheng, L.; Wang, W. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 80, 344–351.
- (33) Esteban Fernandez de Avila, B.; Watkins, H. M.; Pingarron, J. M.; Plaxco, K. W.; Palleschi, G.; Ricci, F. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 6593–6597.
- (34) Campuzano, S.; Pedrero, M.; Nikoleli, G. P.; Pingarron, J. M.; Nikolelis, D. P. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 89, 269.
- (35) Larsson, A.; Greig-Pylypczuk, R.; Huisman, A. *Upsala J. Med. Sci.* **2015**, 120, 1–10.
- (36) Mitsudomi, T.; Suzuki, S.; Yatabe, Y.; Nishio, M.; Kuwabara, M.; Gotoh, K.; Hatooka, S.; Shinoda, M.; Suyama, M.; Ogawa, M.; Takahashi, T.; Ariyoshi, Y.; Takahashi, T. *J. Natl. Cancer Inst* **1998**, 90, 1563–1568.
- (37) Gamella, M.; Campuzano, S.; Conzuelo, F.; Reviejo, A. J.; Pingarron, J. M. *Electroanalysis* **2012**, 24, 2235–2243.

SUPPORTING INFORMATION

Towards liquid biopsy: Rapid Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients using HaloTag Fusion protein-Modified Electrochemical Bioplatfoms

María Garranzo-Asensio[†], Ana Guzmán-Aránguez[†], Carmen Povés[‡], María Jesús Fernández-Aceñero[§], Rebeca M. Torrente-Rodríguez^{||}, Víctor Ruiz-Valdepeñas-Montiel^{||}, Gemma Domínguez[^], Luis San Frutos^ξ, Nuria Rodríguez[⊥], Mayte Villalba^ε, José M. Pingarrón^{*||}, Susana Campuzano^{*||}, Rodrigo Barderas^{*ε}

[†]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid E-28040, Madrid (Spain)

[‡]Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos E-28040, Madrid (Spain)

[§]Surgical Pathology Department, Hospital Universitario Clínico San Carlos E-28040, Madrid (Spain)

^{||}Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid (Spain).

[^]Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, E-28029 Madrid (Spain)

^ξGynecology and Obstetrics Department, Hospital Puerta de Hierro E-28222, Majadahonda (Spain)

[⊥]Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz E-28046 Madrid (Spain)

^εDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid (Spain).

TABLE OF CONTENTS	PAGE
Figure S1	S-2
Figure S2	S-3
Figure S3	S-4
Table S1	S-5
Figure S4	S-7
Table S2	S-8
Table S3	S-9

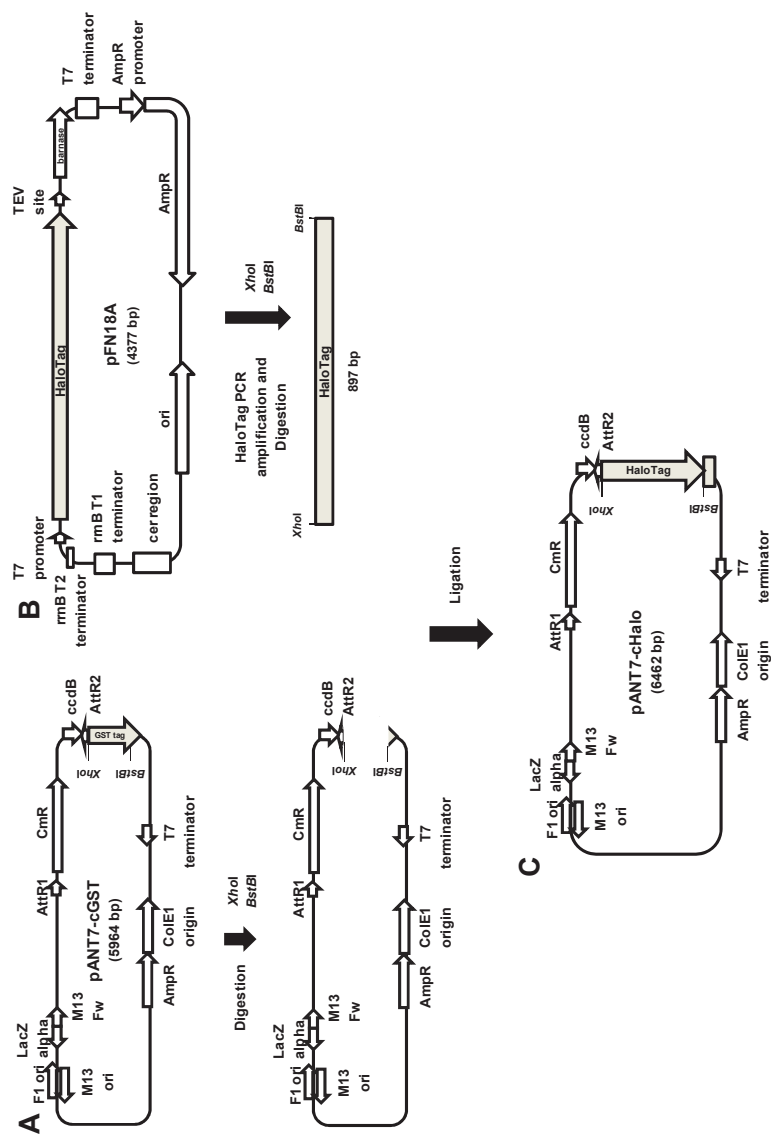


Figure S1. Schematic display of the subcloning steps to get the destination pANT7_cHalo compatible vector with Gateway and optimized for *in vitro* protein expression of C-terminal HaloTagged proteins. A) pANT7_cGST destination vector was digested with *XhoI* and *BstBI* restriction enzymes to remove GST gene from the plasmid to be substituted by HaloTag gene. B) pFN18a vector containing HaloTag gene was amplified by PCR with specific primers, purified and digested with *XhoI* and *BstBI* restriction enzymes. C) pANT7_cHalo destination vector was obtained by ligation of the purified digested products with T4 DNA ligase. pANT7_cHalo was then used in subsequent LR clonase reactions (Invitrogen) according to the manufacturer instructions.

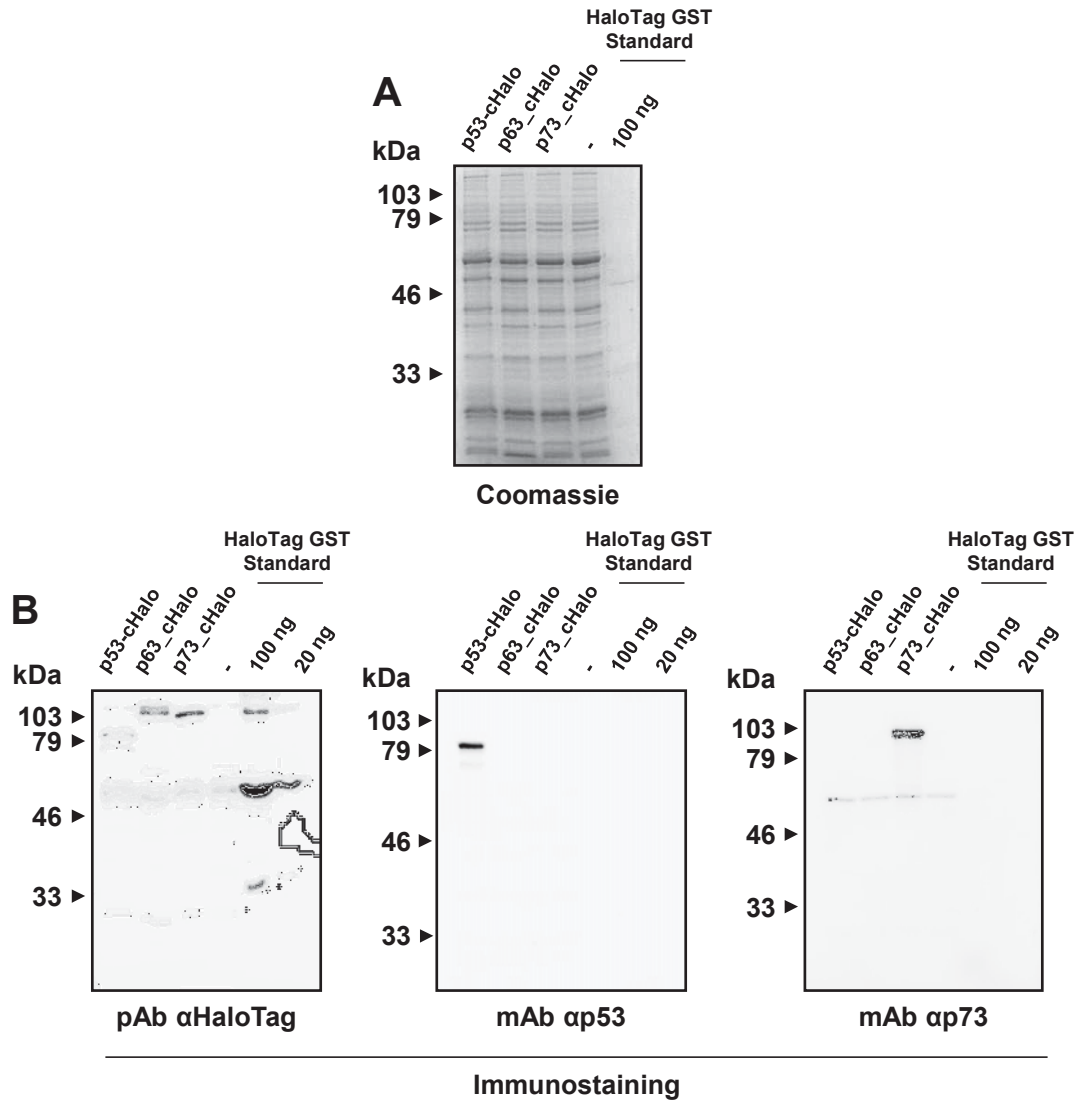


Figure S2. *In vitro* protein expression analysis. p53, p63 and p73 HaloTag fusion proteins were expressed in a rabbit reticulocyte cell-free system and analyzed on a 10% SDS-PAGE gel. A) Coomassie Blue staining of 2 μ L of IVTT. pANT7_cHalo DNA (no protein expression) was included as negative control of the assay and 100 ng of HaloTag-GST protein (Promega) as positive control. B) Immunostaining with specific antibodies of 2 μ L of IVTT shows the specific protein expression of p53, p63 and p73 HaloTag fusion proteins. pANT7_cHalo DNA (no protein expression) was included as negative control of the assay and 100 and 20 ng of HaloTag-GST protein (Promega) as calibration samples to estimate the expression levels of HaloTag fusion proteins.

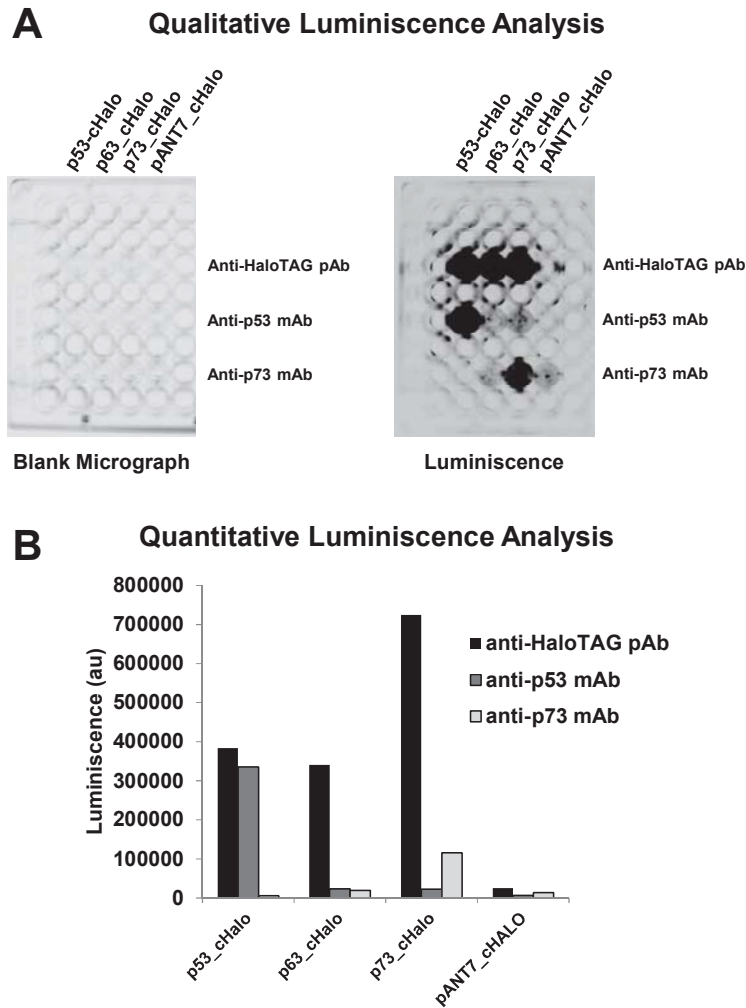


Figure S3. Specific detection of HaloTag fusion proteins by Luminiscence. DNA expression plasmids were used to express *in vitro* p53, p63 and p73 proteins, which are then covalently immobilized to HaloTag MBs and detected by Luminiscence using an anti-HaloTag pAb, an anti-p53 mAb and anti-p73 mAb followed by specific HRP conjugated secondary antibodies. A) MBs were placed on 96-well Maxisorp black plates and Luminiscence was developed with ECL Western Blotting Substrate. A) Left, Blank micrograph depicting the position of the indicated MBs. Right, Luminiscence recorded on a Fujifilm LAS-3000 Imager. B) Quantitative Luminiscence was measured on FLUOstar Optima and data represented on a Bar graph. pANT7_cHalo DNA was included as negative control (no protein expression) of the assay.

Table S1

Clinical information of the 62 patients from individuals at the high-risk program to develop colorectal cancer tested during the study.

Sera Patient number	Pathological Tissue Analysis*		p53 autoantibody levels analysis by ELISA in serum [^]	
	Sample 1	Sample 2	Abs 450 nm	Presence of p53 antibodies ^{''}
CSC 1	Adenoma	Normal	0.07	-
CSC 2	Normal	—	0.06	-
CSC 3	Normal	Pseudopolyp	0.10	-
CSC 6	Adenoma	Normal	0.09	-
CSC 8	Normal	Adenoma	0.19	+
CSC 7	Normal	Hyperplasia	0.06	-
CSC 9	Adenoma	—	0.04	-
CSC 11	Normal	Adenoma	2.34	
CSC 10	Normal	Adenoma	0.39	+
CSC 12	Adenoma	Normal	0.09	-
CSC 13	Adenoma	Normal	0.11	-
CSC 14	Hyperplasia	Normal	0.32	
CSC 19	Normal	—	0.09	
CSC 16	Normal	—	0.22	+
CSC 15	Normal	—	0.05	-
CSC 18	Hyperplasia	Normal	0.05	-
CSC 17	Adenoma	Normal	0.06	-
CSC 20	Adenoma	Normal	0.04	-
CSC 21	Normal	—	0.07	-
CSC 22	Normal	—	0.11	-
CSC 23	Adenoma	Normal	0.34	+
CSC 25	Normal	—	0.04	-
CSC 24	Adenoma	Normal	0.06	-
CSC 30	Adenoma	Normal	0.05	-
CSC 29	Normal	Adenoma	0.14	-
CSC 28	Adenoma	Normal	0.21	+
CSC 27	Normal	Hyperplasia	0.78	+
CSC 26	Normal	—	0.08	-
CSC 32	Normal	—	0.32	+
CSC 31	Normal	Adenoma	0.32	+
CSC 33	Adenoma	Normal	0.07	-
CSC 34	Normal	Adenoma	0.05	-
CSC 37	Normal	Adenoma	0.38	+
CSC 36	Adenoma	Normal	0.04	-
CSC 35	Normal	—	0.10	-
CSC 39	Normal	Adenoma	0.05	-
CSC 38	Normal	—	0.24	+
CSC 41	Normal	—	0.06	-

CSC 40	Normal	—	0.12	-
CSC 44	Normal	—	0.05	-
CSC 45	Normal	Adenoma	0.03	-
CSC 43	Adenoma	Normal	0.31	+
CSC 42		Normal	0.03	-
CSC 46	Normal	Adenoma	0.13	-
CSC 47	Normal	—	0.37	-
CSC 48	Normal	—	0.06	-
CSC 49	Normal	—	0.08	-
CSC 52	Normal	Adenoma	0.12	-
CSC 50	Normal	—	0.03	-
CSC 51	Normal	—	0.09	-
CSC 53	Adenoma	Hyperplasia	0.38	+
CSC 54	Hyperplastic polyp	Normal	0.03	-
CSC 55	Normal	Adenoma	0.09	-
CSC 56	Normal	—	0.09	-
CSC 57	Normal	Adenoma	0.05	-
CSC 63	Normal	Adenoma	0.08	-
CSC 58	Normal	—	0.08	-
CSC 59	Adenoma	Normal	0.09	-
CSC 60	Normal	Adenoma	0.05	-
CSC 62	Normal	Adenoma	0.05	-
CSC 61	Normal	Adenoma	0.07	-
CSC 64	Normal	Adenoma	0.13	-

**, One or two tissue samples corresponding to different potential lesions were obtained from the same patient during the colonoscopy. The corresponding pathological information for all samples is included in the table. ^, Those serum samples from patients denoted as normal in the tissue pathological analysis and negative for the presence of p53 autoantibodies in serum by ELISA could be considered as healthy individuals. ¨, Positive (+) or negative (-) for the presence of p53 autoantibodies as determined by ELISA.*

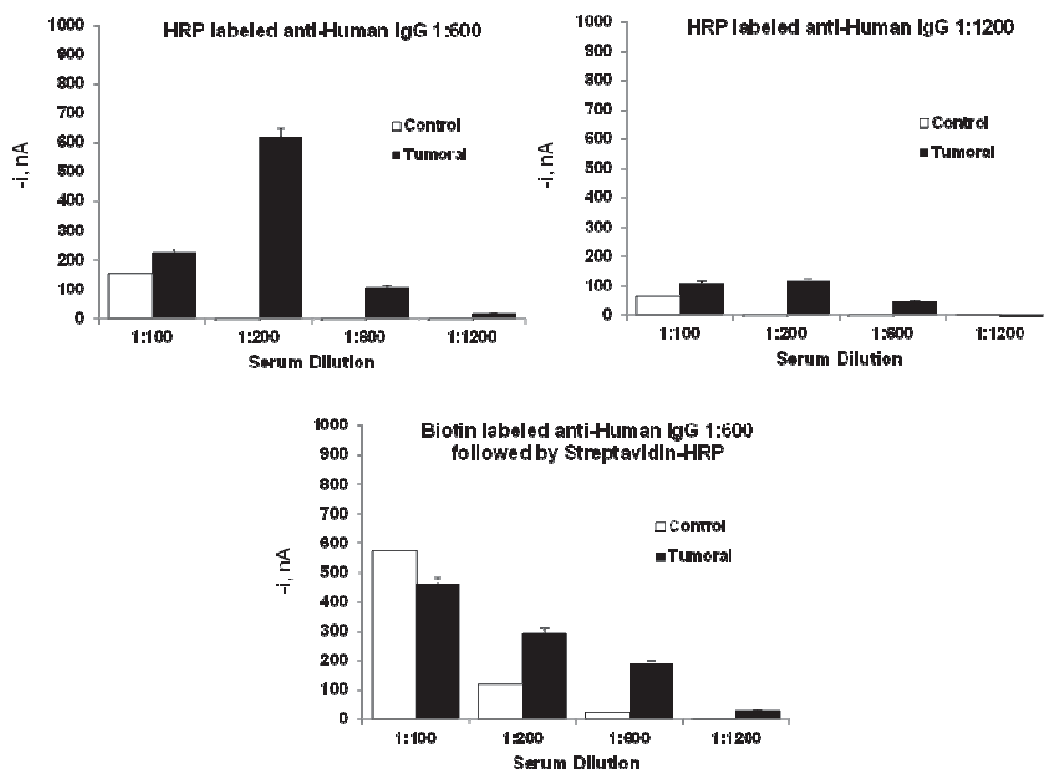


Figure S4. Optimization of the HaloTag fusion protein modified MBs-based biosensor to detect p53 autoantibodies in sera from cancer patients. Effect of the serum samples dilution and selection of the HRP-labeled secondary antibody and its dilution. A sera pool of 4 control individuals negative to p53 autoantibodies and a sera pool of 4 high risk individuals to develop CRC positive to p53 autoantibodies were used in these studies. Amperometric detection at -0.20 V (vs de Ag pseudoreference electrode). Error bars represented the SEM.

Table S2

Quantification of p53 autoantibodies (expressed in U mL⁻¹) in sera samples using the developed electrochemical platform.

Serum sample	[p53-autoantibodies], U mL ⁻¹
p53-reactive patients	CSC 8
	212.8
	CSC 10
	41.8
	CSC 16
	26.0
	CSC 23
	1126.2
	CSC 27
	173.7
	CSC 28
	206.3
p53-non reactive patients	CSC 31
	26.0
	CSC 32
	81.8
	CSC 37
	525.9
	CSC 38
	117.1
	CSC 43
	1006.3
	CSC 53
	502.7
p53-non reactive patients	CSC 21
	ND
	CSC 22
	ND
	CSC 24
	ND
	CSC 26
	ND
	CSC 29
	ND
	CSC 30
	288.0
p53-non reactive patients	CSC 33
	ND
	CSC 34
	ND
	CSC 35
	ND
	CSC 36
	415.3
p53-non reactive patients	CSC 46
	527.8
p53-non reactive patients	CSC 47
	ND

ND: non-detectable

Table S3

Quantification of p53 autoantibodies (expressed in U mL^{-1}) in serum samples from colorectal and ovarian cancer diagnosed patients using the developed electrochemical platform.

Serum sample	Cancer Type	-i, nA	[p53-autoantibodies], U mL^{-1}
LP7	Colorectal	484	475.7
LP18	Colorectal	249	257.4
LP31	Colorectal	619	601.2
LP40	Colorectal	1662	1570.3
OV1	Ovarian	283	289.0
OV3	Ovarian	258	265.7

Artículo 6

Multiplexed monitoring of a novel autoantibody diagnostic signature of colorectal cancer using HaloTag technology-based electrochemical immunosensing platform

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se ha demostrado que la respuesta inmune humoral puede emplearse para el diagnóstico temprano de pacientes de cáncer gracias a la gran versatilidad que confiere la detección de los autoanticuerpos frente a los antígenos asociados a tumor. En este trabajo, se ha evaluado la capacidad diagnóstica de autoanticuerpos frente a autoantígenos específicos de cáncer colorrectal previamente descartados por su dificultad de expresión en combinación con autoantígenos fáciles de expresar y purificar, para el posterior desarrollo de un sensor electroquímico multiplex para la determinación en plasma de la presencia de los autoanticuerpos. Para ello, se han empleado esferas magnéticas para la inmovilización de los autoantígenos fusionadas a HaloTag y el sistema hidroquinona/H₂O₂ para el desarrollo de la señal amperométrica.

En total, se ha analizado la presencia de 8 autoanticuerpos en plasma de pacientes sanos asintomáticos, pacientes con elevado riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal y pacientes de cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer de pulmón. Además, el sensor implica un protocolo de detección utilizando un volumen mínimo de muestra e instrumentación barata que podría emplearse para el cribado poblacional para la detección temprana de cáncer colorrectal.

Este trabajo se presenta como parte de la Tesis Doctoral con el consentimiento del resto de coautores. Durante el estudio, llevé a cabo la expresión de las proteínas in vitro y su inmovilización en esferas magnéticas e incubación con los plasmas a analizar mediante el inmunoensayo de luminiscencia y con el biosensor. Participé en la escritura y revisión del manuscrito.

Este trabajo se ha publicado en la revista Theranostics. 2020; 10(7): 3022-3034. doi:10.7150/thno.42507

Research Paper

Multiplexed monitoring of a novel autoantibody diagnostic signature of colorectal cancer using HaloTag technology-based electrochemical immunosensing platform

María Garranzo-Asensio^{1,2}, Ana Guzmán-Aránguez¹, Eloy Povedano³, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel³, Carmen Poves⁴, María Jesús Fernandez-Aceñero⁵, Ana Montero-Calle², Guillermo Solís-Fernández², Servando Fernandez-Diez⁴, Jordi Camps⁶, Meritxell Arenas⁶, Elisabeth Rodríguez-Tomás^{6,7}, Jorge Joven⁶, Maricruz Sanchez-Martinez², Nuria Rodríguez⁸, Gemma Dominguez⁹, Paloma Yáñez-Sedeño³, José Manuel Pingarrón^{3,*}, Susana Campuzano^{3,*}, Rodrigo Barderas^{2,*}

1. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, 28037 Madrid, Spain.
2. UFIEC, Chronic Disease Programme, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda 28220, Madrid, Spain.
3. Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
4. Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040, Madrid, Spain
5. Pathology Department, University Hospital Gregorio Marañón, E-28007 Madrid, Spain
6. Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus (Spain).
7. Department of Radiation Oncology, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus (Spain).
8. Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, E-28046, Madrid, Spain.
9. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, E-28029, Madrid, Spain.

* Co-senior authors

✉ Corresponding authors: Rodrigo Barderas, Functional Proteomics Unit, UFIEC, Chronic Disease Programme, Instituto de Salud Carlos III, E-28220 Majadahonda, Madrid, Spain; Tel.: 34-91-8223231; E-mail: r.barderasm@isciii.es. Susana Campuzano, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; Tel.: 34-91-3944219; E-mail: susanacr@ucm.es. José M. Pingarrón, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; Tel.: 34-91-3944315; E-mail: pingarro@quim.ucm.es

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2019.11.27; Accepted: 2020.01.02; Published: 2020.02.10

Abstract

Background and Purpose: The humoral immune response in cancer patients can be used for early detection of the disease. Autoantibodies raised against tumor-associated antigens (TAAs) are promising clinical biomarkers for reliable cancer diagnosis, prognosis, and therapy monitoring. In this study, an electrochemical disposable multiplexed immunosensing platform able to integrate difficult- and easy-to-express colorectal cancer (CRC) TAAs is reported for the sensitive determination of eight CRC-specific autoantibodies.

Methods: The electrochemical immunosensing approach involves the use of magnetic microcarriers (MBs) as solid supports modified with covalently immobilized HaloTag fusion proteins for the selective capture of specific autoantibodies. After magnetic capture of the modified MBs onto screen-printed carbon working electrodes, the amperometric responses measured using the hydroquinone (HQ)/H₂O₂ system were related to the levels of autoantibodies in plasma.

Results: The biosensing platform was applied to the analysis of autoantibodies against 8 TAAs described for the first time in this work in plasma samples from healthy asymptomatic individuals (n=3), and patients with high-risk of developing CRC (n=3), and from patients already diagnosed with colorectal (n=3), lung (n=2) or breast (n=2) cancer. The developed bioplatfrom demonstrated an improved discrimination between CRC patients and controls (asymptomatic healthy individuals and breast and lung cancer patients) compared to an ELISA-like luminescence test.

Conclusions: The proposed methodology uses a just-in-time produced protein in a simpler protocol, with low sample volume, and involves cost-effective instrumentation, which could be used in a high-throughput manner for reliable population screening to facilitate the detection of early CRC patients at affordable cost.

Key words: colorectal cancer; biosensor; early cancer detection; electrochemical bioplatfroms; halotag fusion proteins; liquid biopsy

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second deadliest cancer worldwide because of its late diagnosis. The 5-year survival rate associated to late diagnosis drops to 6-10% [1]. The study of the humoral immune response has been demonstrated useful to identify tumor-associated antigens (TAAs) in CRC with diagnostic ability. Autoantibodies against TAAs appear up to three years before clinical symptoms because of the immune system amplification, making them interesting targets for early cancer detection [2-6]. Early CRC diagnosis by population screening would increase overall patient well-being, as well as have an important impact on overall Health Systems since 90% of early diagnosed patients are successfully cured.

By protein and phage microarrays, among other approaches, numerous CRC TAAs whose autoantibodies have potential diagnostic ability have been described [4, 7-12]. However, the detection of autoantibodies to some of these TAAs had to be discarded because they were difficult-to-express and/or purify proteins because of degradation or aggregation during purification or storage. These problems make it very difficult and time-costly (if possible) to include them into multiplexed diagnostic panels. Thus, the development of multiplexed biosensing strategies coupled to *in vitro* expression systems for autoantibody detection able to overcome such problems would be of great interest. On the one hand, mammalian cellular extracts would be ideal since it would allow the proteins to be expressed in a short period of time with correct folding and no degradation to ensure its functionality. On the other hand, current electrochemical biosensing platforms, entailing straightforward processes and capable of accurately detecting specific targets in scarcely treated biofluids represent an interesting alternative to conventional immunoassays. Their versatility, amenability to detect numerous molecular targets simultaneously with high levels of sensitivity and specificity, capacity for automation, affordability, portability and minuscule amount of sample requirement make them ideal candidates to be adapted in clinical routine for point-of-care (POC) diagnosis of cancer and other prevalent diseases [13-28].

This work reports the construction of an electrochemical immunosensing platform using *in vitro* transcription/translation expressed HaloTag fusion proteins self-assembled onto commercial magnetic microparticles (MBs). HaloTag is an engineered dehalogenase developed to covalently bind to halogenated alkanes [29, 30], which in addition can improve the solubility of fusion proteins providing higher yields, purity and overall recovery of the expressed proteins in comparison to other tags as FLAG, 3×FLAG or His(6)Tag [30]. Amperometric detection at screen-printed carbon electrodes (SPCEs) was performed to evaluate the diagnostic potential of a novel autoantibody panel composed of eight TAAs (GTF2B, MAPKAPK3, PIM1, PKN1, SRC, STK4, SULF1, and p53) previously validated or not validated for CRC diagnosis because of their difficulty to be expressed or purified [7, 9]. It is worth to remark that in a previous work, we reported the use of MBs coupled to *in situ* expressed HaloTag fusion proteins and electrochemical detection at SPCEs for the accurate determination of blood autoantibodies. However, this technology was applied only to the determination of antibodies against a single TAA (p53) [13]. This work showed that the HaloTag fusion protein-based electrochemical immunosensing was less prone to false results than ELISA involving recombinant TAAs produced in bacterial hosts. This fact was attributed to the differences in concentration, type, and immobilization of bioreceptors (p53 expressed in bacteria vs HaloTag-p53 expressed in a mammalian milieu) which certainly affected the autoantibody capture efficiency, and to the remarkably higher sensitivity (440 times) and the larger sera dilution factor required by the electrochemical method compared to the ELISA test. Interestingly, the analysis of the difficult-to-express TAAs PKN1, SRC, and SULF1 could not be carried out by ELISA and/or Luminex methods. Moreover, PIM1 forms dimers that can block antibody recognition sites and, therefore, if aggregation occurs becomes useless for patient diagnosis, as in Luminex-based approaches [7]. In addition, MAPKAPK3, STK4, and p53 were included as controls to evaluate whether these TAAs maintain their previously described diagnostic potential [7, 9].

In vitro expressed TAAs coupled to HaloTag were immobilized *in situ* into MBs to avoid protein degradation. Then, modified MBs were incubated with plasma samples from controls, CRC patients, or colorectal individuals carrying premalignant lesions to assess the diagnostic ability of the autoantibodies. The developed biosensing multiplexed platform can be envisioned as a point-of-care (POC) device capable of detecting these autoantibodies in plasma.

Results

Colorectal cancer tumor-associated antigens selection

Previous studies related to the analysis of the humoral immune response in CRC identified 91 possible TAAs by using protein microarrays. Among them, difficult-to-express and difficult-to-purify TAAs or autoantigens suffering from extensive degradation with high diagnostic potential were discarded for analysis and/or validation. Therefore, only a panel consisting of 6 TAAs was considered for early CRC detection [4, 7, 10, 11].

In this work, we have developed an electrochemical immunosensing strategy based on HaloTag technology able to include previously discarded proteins, due to their challenging production and/or purification, into diagnostic panels with the ultimate goal of constructing a POC device able to discriminate CRC patients and individuals carrying premalignant lesions from controls. For such a purpose, eight CRC TAAs were selected for the study: GTF2B, MAPKAPK3, PIM1, PKN1, SRC, STK4, SULF1, and p53, where PIM1, PKN1, SRC, and SULF1 (and p53) are difficult-to-express and/or purify proteins and GTF2B, MAPKAPK3, and STK4 are easy-to-express proteins used as controls to ascertain whether this approach maintains their previously described CRC diagnostic ability [7, 9].

CRC TAAs encoding cDNAs were cloned as HaloTag-fusion proteins into vectors optimized for *in vitro* protein expression for subsequent covalent immobilization of the proteins onto MBs for direct evaluation of autoantibody levels in plasma of patients and controls (Table 1 and Table S1) to avoid any degradation or precipitation during purification and storage, compulsory steps for other techniques (i.e. ELISA, Luminex...) [13]. Once verified the correct protein expression and established the diagnostic signature by luminescence [31], a multiplexed electrochemical immunoassay capable of detecting autoantibody presence as a POC device for CRC detection was developed (Figure 1).

Cloning and *in vitro* protein expression

To evaluate whether the proposed system of *in vitro* protein expression and immobilization of the autoantibody targets onto MBs could successfully render all TAA fusion proteins, we evaluated their correct *in vitro* expression. Figure S1A shows as immunostaining of the expression product exhibited a correct expression. Next, to verify that the HaloTag fusion proteins were functional for their covalent binding to functionalized chloroalkane MBs, and thus, could be used for selective capture of autoantibodies against them, we immobilized them onto MBs through the HaloTag and incubated the resulting HaloTag fusion protein-MBs with, alternatively, a specific antibody against the tag or against the indicated TAAs. A specific luminescence signal was obtained for all proteins using the anti-HaloTag mAb (Figure S1B) or for the indicated TAAs using their specific antibodies (Figure S1C). These results confirmed the successful immobilization of functional HaloTag fusion proteins on the MBs and the great potential of the protocols applied to any protein without particular optimization.

Table 1. Samples used in the study.

Classification		Age (years) ± SD	Sample size (Male/Female)
Control	Negative colonoscopy/asymptomatic	44±7	11/19
	Other cancers	58±12	16/24
Pathological	Premalignant	60±7	16/9
	CRC	70±11	13/13

Evaluation of autoantibody seroreactivity levels by luminescence beads immunoassay

Once established the optimal working conditions, we evaluated the optimal plasma dilution to be used by luminescence beads immunoassay to compare the results with those previously reported for GTF2B, MAPKAPK3, and STK4 [7, 9]. Figure S1D shows as better discrimination between the tumor and control group for the determination of autoantibodies a 1:300 dilution. Next, we proceeded to evaluate the seroreactivity levels of 125 individuals -31 asymptomatic healthy individuals, 20 lung cancer patients, 20 breast cancer patients, 28 premalignant individuals, and 26 CRC patients- to determine whether autoantibody presence could discriminate between groups, and to assess whether the developed methodology was successful to be used with difficult-to-express and easy-to-express CRC TAAs proteins for diagnostic purposes (Figure 2).

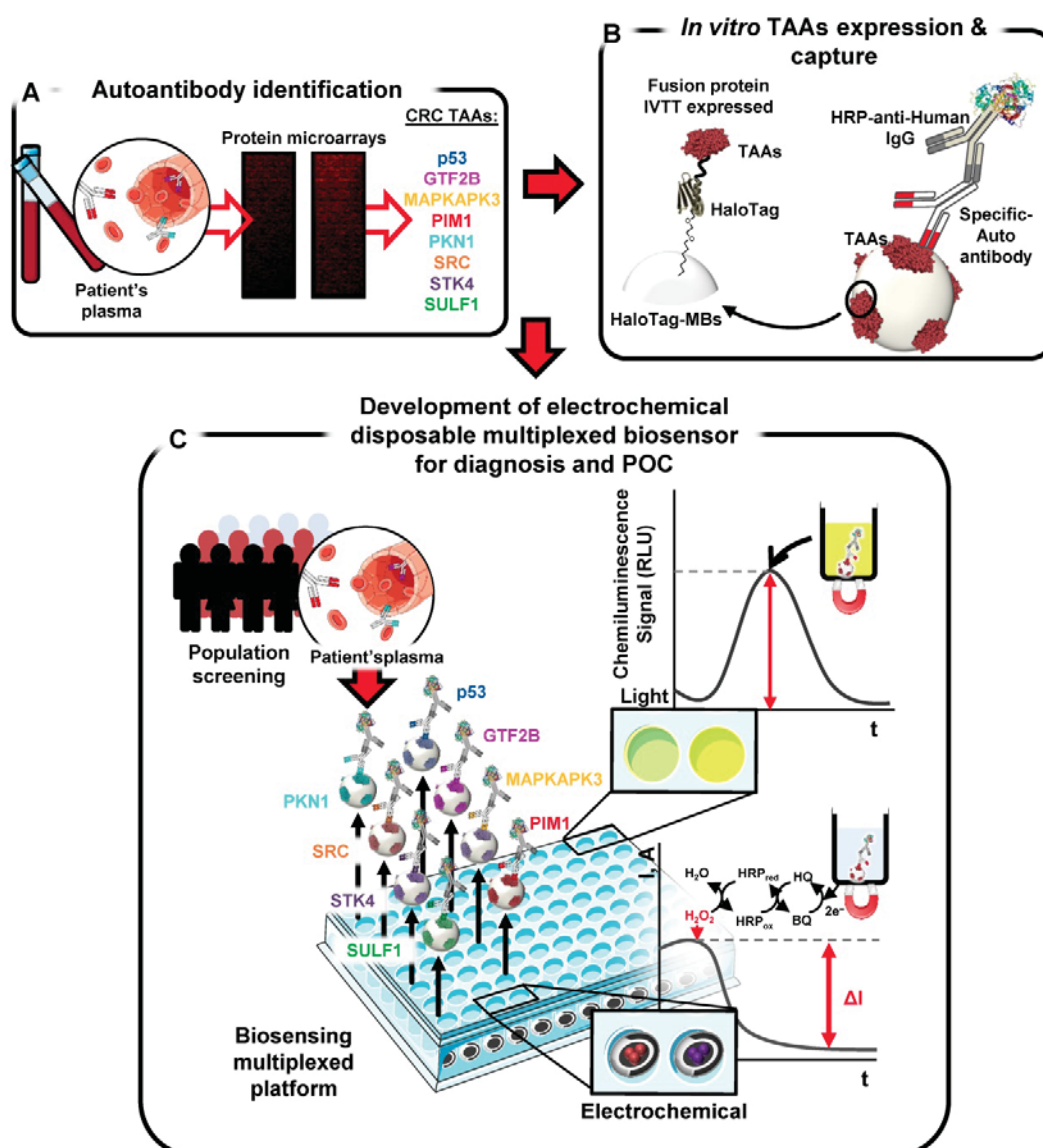


Figure 1. Schematic design of the strategy. Autoantibody targets were identified using protein microarrays incubated with plasma samples from CRC patients. Targets were then *in vitro* expressed as HaloTag fusion proteins for their subsequent immobilization onto MBs for evaluation of their diagnostic potential and development of a multiplexed electrochemical immunosensing platform for CRC early diagnosis.

Overall, we found that the evaluated autoantigens target of autoantibodies -except p53- could discriminate with statistical significance ($p < 0.05$) among the pathological individuals (CRC patients and premalignant individuals) and all control groups, as well as all controls *vs* CRC patients (Figure 3A, B). However, when comparing the control and premalignant patients, GTF2B and p53 failed to distinguish between groups with statistical significance even though the premalignant group showed higher autoantibody levels (Figure 3C). When comparing the autoantibody levels in asymptomatic individuals and the pathological group, all the autoantibody targets except SRC could significantly discriminate between groups, while all autoantibody

targets could discriminate between them with statistical significance when comparing the asymptomatic individuals with the CRC patients (Figure 3D, E). However, GTF2B, SRC, SULF1 and p53 could not discriminate between the asymptomatic and premalignant subjects with statistical significance although the premalignant group showed higher autoantibody levels (Figure 3F). To evaluate whether autoantibodies were CRC specific, we compared levels between the asymptomatic subjects and breast and lung cancer individuals. Autoantibodies against p53 could discriminate with statistical significance ($p < 0.05$) between both groups but none of the CRC TAAs (Figure 3G).

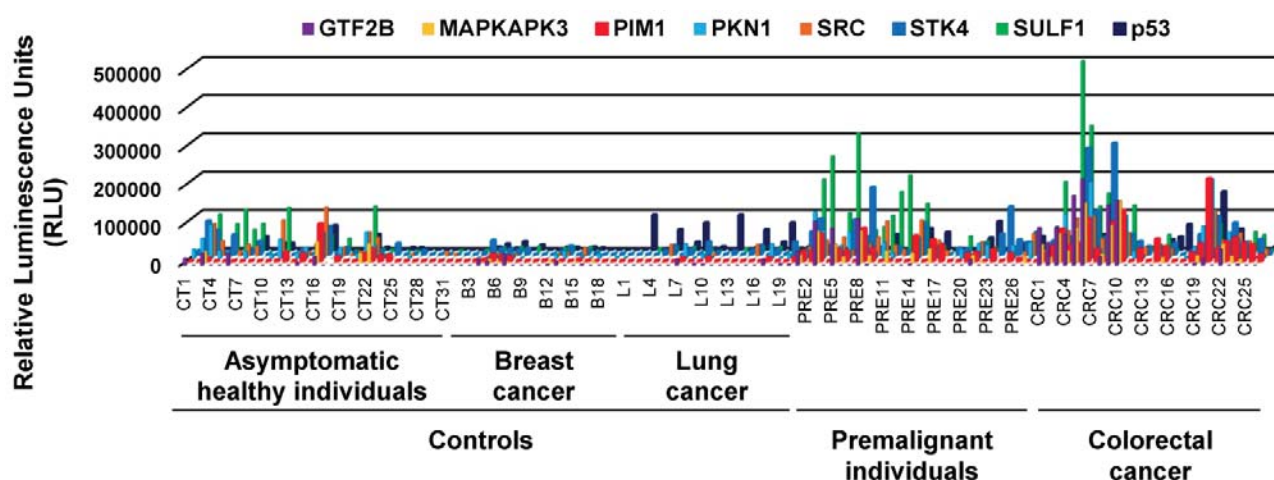


Figure 2. Autoantibody measurement by luminescence of the plasma samples. Evaluation of autoantibody presence showed that the luminescence signal obtained for the premalignant and CRC groups was considerably higher than the signal obtained for the control groups.

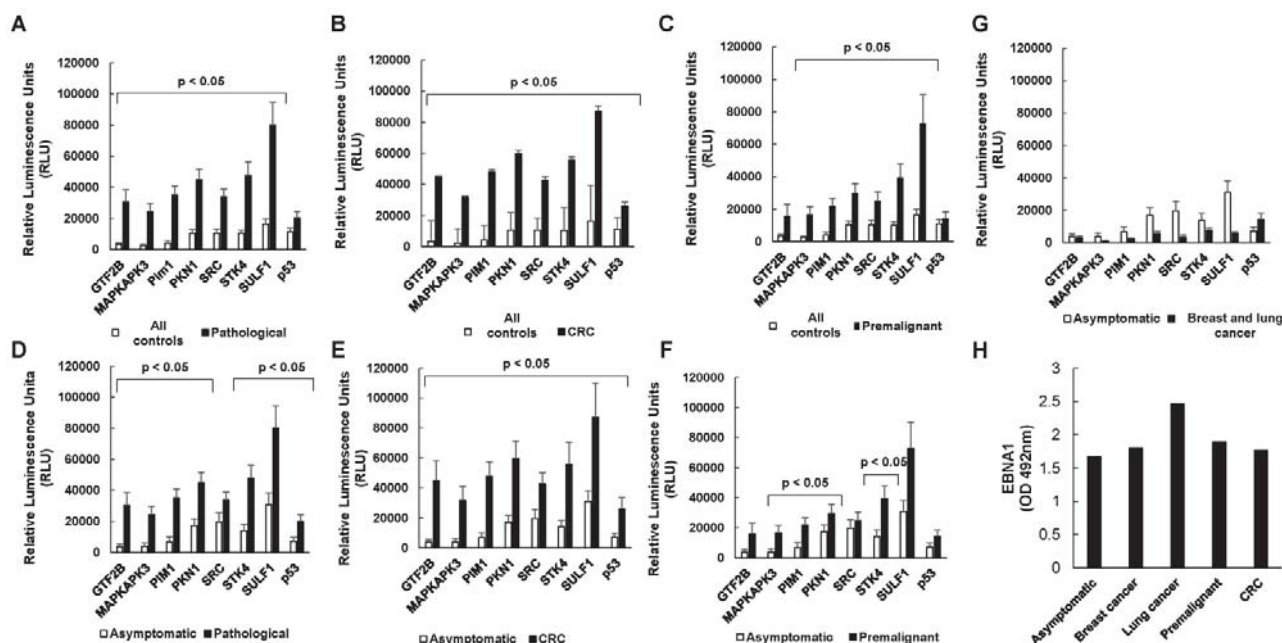


Figure 3. Statistical analysis of autoantibody levels according to patients' groups. Autoantibodies against the eight targets could discriminate between the control and pathological group (A) and between controls and CRC patients (B). However, GTF2B and p53 could not discriminate between the control and premalignant subjects (C). All the autoantibodies but SRC could discriminate between the asymptomatic subjects and the pathological group (D). Moreover, the 8 autoantibodies could discriminate between the asymptomatic individuals and CRC patients (E). However, only MAPKAPK3, PIM1, PKN1, and STK4 could discriminate between asymptomatic and premalignant subjects (F). Furthermore, just p53 could differentiate between the asymptomatic individuals and breast and lung cancer patients (G). EBNA-I seroreactivity was analyzed as a test for the specificity of the assay, showing similar levels in all groups (H). Since >95% of the human population has been infected with the Epstein Barr virus, antibodies specific against EBNA1 would serve as specific control of the seroreactivity among all the analyzed groups. All controls: asymptomatic individuals, and breast and lung cancer patients.

EBNA1 seroreactivity was analyzed as control of the specific CRC seroreactivity. A no clear pattern of seroreactivity to EBNA1 was observed among all groups with non-significant p-values. These results clearly confirmed that the seroreactivity observed for the indicated CRC-specific autoantibodies was characteristic of the analyzed groups (Figure 3H).

Evaluation of the diagnostic potential of selected autoantibodies

Next, ROC curves were obtained to search for the optimal TAA combination to discriminate

between patients and controls (Table S2). The optimal AUC values were achieved with those autoantibodies that could discriminate patients with statistical significance, with a value of 92.4% (sensitivity 76.0%, specificity 96.7%) when comparing the asymptomatic group vs the CRC patients, and 91.8% (sensitivity 76.0% and specificity 98.6%) when factoring in the breast and lung cancer subjects with the asymptomatic group against the CRC subjects (Figure 4A, B).

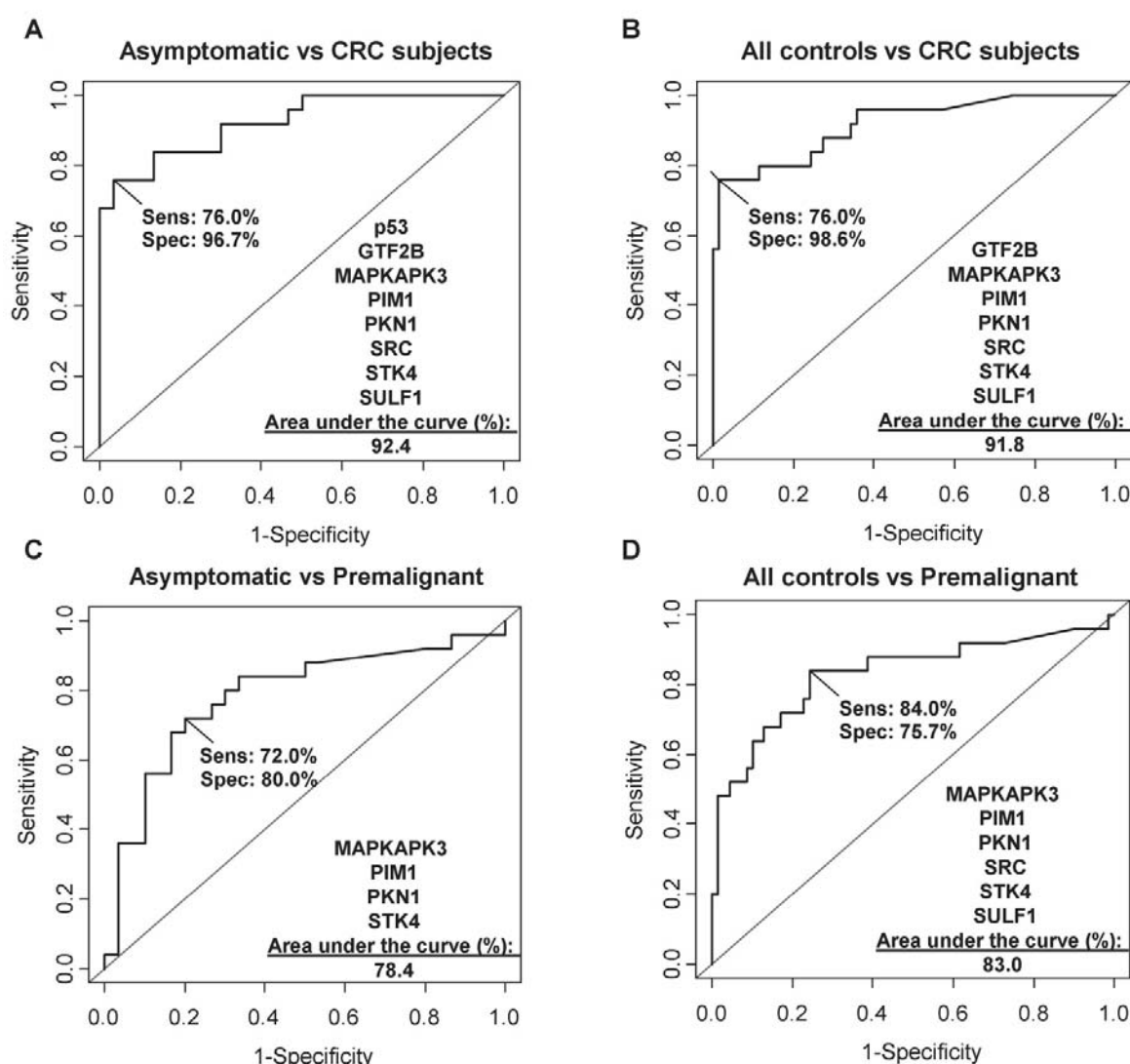


Figure 4. Diagnostic potential of the simultaneous detection of the TAAs. The diagnostic potential was analyzed by ROC curves comparing the asymptomatic vs CRC group (A), all controls vs CRC subjects (B), asymptomatic individuals vs premalignant subjects (C), and all controls vs the premalignant group (D). All controls: asymptomatic individuals, and breast and lung cancer patients.

To evaluate whether the proposed markers could also detect premalignant subjects, ROC curves comparing the asymptomatic group with the premalignant subjects as well as the control group (with the breast and lung cancer subjects) with the premalignant subjects were constructed. AUC values of 78.4% (sensitivity 72%, specificity 80%) and 83.0% (sensitivity 84%, specificity 75.7%) were found, respectively (Figure 4C, D). These AUC values, although lower than those obtained for discriminating the CRC subjects, also indicated that the markers are useful for the early detection of premalignant individuals.

These data were compared with those previously reported for GTF2B, STK4, MAPKAPK3, and p53 to ascertain whether this approach keeps their previously reported CRC diagnostic values

(Table S2, and Table S3). Our data showed that the here proposed approach is suitable for difficult-to-express and difficult-to-purify TAAs as well as for those easy-to-produce. In this sense, GTF2B, STK4, MAPKAPK3 and p53 showed a similar or even higher diagnostic ability using the here described approach than that previously reported (Table S3), which may be attributed to the lower false positives and the high sensitivity demonstrated by the HaloTag technology compared to ELISA [4, 7, 9, 11, 13].

Development of an electrochemical multiplexed immunosensing platform as a tool for early and affordable diagnostic test

The CRC autoantibody targets were also tested by means of a multiplexing electrochemical

immunosensing platform as a proof-of-concept of a POC device that could be used in a clinical setting for CRC detection (Figure 5A).

Under the optimized conditions described in the Experimental Section, the ability of the developed platform to detect the presence of autoantibodies against GTF2B, MAPKAPK3, PIM1, PKN1, SRC, STK4, SULF1, and p53 in human plasma was tested. Three asymptomatic plasma samples, samples from three premalignant individuals, three CRC patients and four breast and lung cancer patients were analysed (Figure 5B, C). As it was previously observed by luminescence, most CRC patients were reactive to most if not all TAAs, while premalignant individuals were reactive to >4 TAAs apart from p53.

We analyzed premalignant individuals, CRC patients and control groups according to this differential specific seroreactivity as cut-off. Remarkably, none of the asymptomatic patients (with most values close to background) and breast cancer patients showed seroreactivity to four or more different CRC autoantigens and were clearly discriminated from CRC patients. However, one lung cancer patient also presented seroreactivity to 4 out of 8 different CRC autoantigens. In addition, all premalignant and CRC individuals possessed autoantibodies for more than four CRC autoantigens and showed a clear signal above background, indicating the usefulness of the methodology as a possible clinical tool for the detection of CRC (Figure 5D). Furthermore, ROC curve analysis showed that the multiplexed simultaneous detection of autoantibodies against the eight CRC TAAs has a powerful diagnostic ability for CRC and colorectal premalignant individuals, with an AUC of 100% (Figure 5E).

Collectively, these results show that the developed methodology overcomes the drawbacks regarding purification, degradation and immobilization of difficult-to-express CRC TAAs so that they do not have to be discarded with the implicated loss of diagnostic ability. Moreover, the use of these TAAs allowed us to find a novel diagnostic signature with high potential for the detection of CRC through a POC device.

Discussion

The humoral immune response has been proven useful for early cancer diagnosis [2, 3, 5, 32-34]. Through different methodologies, such as ELISA, SEREX, SERPA, or other proteomic techniques, multiple potential tumor associated targets of the immune system have been identified [8, 11, 12, 35-37]. However, these methodologies are not ideal for

validation or to be used in a clinical setting, since they require either large volumes of biological samples or are expensive and time-consuming when they have to detect multiple targets simultaneously, or require a high specialized setting. In this work, we have optimized a novel methodology based on the *in vitro* expression of CRC-specific autoantibody targets coupled to HaloTag that allows their immobilization onto MBs and the construction of an electrochemical immunosensing platform with multiplexing capabilities ideal as a POC device for the analysis in serum/plasma.

In vitro protein expression using mammalian cellular extracts offers numerous advantages versus the most common bacteria and yeast expression systems. As it has been shown in previous studies, some TAAs in CRC exhibited expression and purification drawbacks which made it hard to develop with them a methodology for CRC diagnosis [4, 7, 9-11]. The expression of the autoantibody targets coupled to the HaloTag using a previously developed system for p53 made it possible to obtain the difficult-to-express proteins previously discarded with their correct folding and no degradation, and in less time than with conventional techniques. Moreover, through the HaloTag, these functionalized proteins were covalently immobilized *in situ* to carry out the assay, so that no storage or dimerization problems occurred and autoantibody detection was not hindered by their degradation or oligomerization. It is important to note also that this protocol for *in situ* production and selective capture of the HaloTag fusion proteins onto the MBs is much simpler and shorter (just one overnight step) than the conventional procedure to get purified TAAs produced in bacteria, insect, or mammalian cells, which usually requires weeks or months, and sometimes makes it impossible to produce difficult-to-express or -purify proteins and are more prone to give false positive results due to the presence of bacterial contaminants.

Autoantibody detection in plasma samples is an interesting alternative to conventional diagnostic techniques for CRC -such as colonoscopy- since it is a non-invasive (or low- invasive since blood collection is required) approach that can detect the disease at either premalignant (low- and high-grade adenomas) and CRC at early stages when its treatment get more than 90% of curation only with tumor resection. Up to date, autoantibody levels have been described to be useful for the diagnosis of multiple different diseases [35, 38-40], apart from other cancer malignancies [41, 42], and thus, this methodology could also be applied for different diseases.

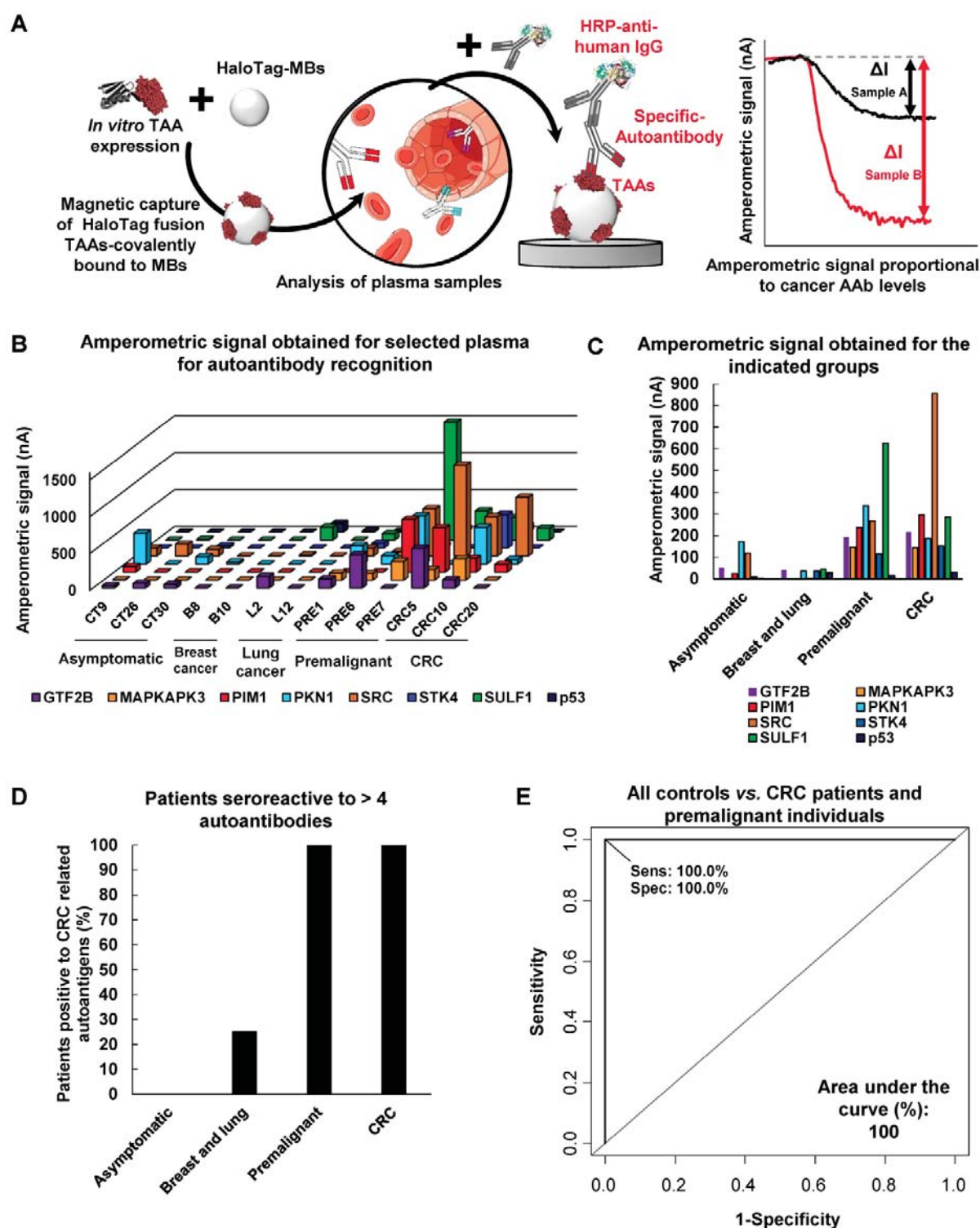


Figure 5. Autoantibody measurement in plasma samples by the multiplexed electrochemical immunosensing platform. (A) Schematic design of the proposed strategy. (B, C) Amperometric responses obtained for the TAAs were larger for the premalignant and CRC subjects in comparison to the asymptomatic, where they were almost undetectable. (D) Percentage of patients positive to CRC related autoantigens detected by the biosensor. (E) ROC curve of autoantibody detection against all targets using the electrochemical immunosensing platform. Premalignant, premalignant colorectal individuals.

In this work, we found that the simultaneous detection of autoantibodies against GTF2B, MAPKAPK3, p53, PIM1, PKN1, SRC, STK4, and SULF1 could discriminate between control

individuals and CRC patients and premalignant subjects with an AUC well above than that for CEA (the established clinical marker recommended for monitoring recurrent CRC) 90% *vs* 80%, and

especially for the comparison between control individuals and premalignant patients 91% *vs* 57%. Moreover, this autoantibody panel was specific of CRC, since it could not discriminate individuals with breast and lung cancer patients, indicating their great potential in a clinical setting.

Electrochemical biosensors are attractive potential diagnostic tools, since they offer numerous advantages in comparison to other techniques such as ELISA or Luminex [13, 43, 44]. They have a great multiplexing capability, with ability to detect different biomarkers in nature in a single measurement and directly in complex biological matrices [43]. This characteristic makes this type of biosensors ideal for CRC diagnosis since it would allow for the simultaneous autoantibody detection against the eight TAAs using a minimal plasma sample volume. The multiple detection of autoantibodies is needed for a more specific and sensitive diagnosis of the disease, and to discriminate CRC patients from other cancer patients. As shown in this work, the ROC curves of the biosensing approach demonstrated that this methodology could be successfully used in clinics to detect CRC patients. In addition, the developed methodology meets better the requirements of hospital routine and POC testing since it greatly reduces assay time and production costs. In comparison to other techniques, the simultaneous detection of the autoantibody presence takes up to 3.5 hours after protein immobilization on chloroalkane MBs. This assay time is much shorter than that required by using ELISA or Luminex for testing the same number of TAAs (about 6 hours after protein immobilization without considering the overnight immobilization of the TAAs by ELISA or the 3 days required after protein immobilization by Luminex prior to seroreactive analysis). Importantly, the multiplexed electrochemical biosensing for 8 TAAs detection is about 3 euros per patient that would be 10-20 times less expensive than other conventional immunoassays. In addition, the TAAs used for selective capture of the autoantibodies are expressed just-in-time using a cell-free expression system, allowing for the first time the determination of autoantibodies against TAAs difficult to express and/or purify. Furthermore, this methodology avoids the expensive and time demanding protocols required to express and purify cancer recombinant proteins in bacterial, insect, or mammalian cells and the concerns regarding the stability and integrity of the protein during storage, as well as the presence of potentially immunogenic bacterial products that can be a source of false positives in ELISA or Luminex assays.

Besides the use of HaloTag technology, the proposed electrochemical immunosensing platform

possesses unique features, in comparison with ELISA, derived from the use of MBs as solid supports to perform the bioassay and the electrochemical transduction at disposable electrodes. MBs have demonstrated to be a powerful and versatile tool to improve the sensitivity of bioassays, minimize matrix effect, reduce largely the assay time and make analytical procedures more compatible with higher sample throughput and automation [45-49]. Screen-printed electrodes (SPEs), can be massively and inexpensively produced from a variety of materials, in different geometries and in miniaturized and multiplexed formats and allow working with small sample volumes [47, 50]. Moreover, the developed technology is amenable to automate and implement using cost-effective and low-power requirement instrumentation, which make it applicable in both diagnostic and outpatient routines and even in limited-resource settings [23]. All these interesting features and the ability to discriminate between patient groups, make the developed bioplatfrom a promising tool compared both to ELISA and the luminescence approach to be readily implemented in low-cost, simple use, short time analysis and in high-throughput and multiplexed devices for early diagnostics, patient follow-up, and monitoring of cancer patients through reliable autoantibodies signatures determination. However, the main issue the developed electrochemical methodology would have to face might be precisely to convince of the potential and these competitive advantages to the users of ELISA technology, very accustomed with using this methodology long adopted in centralized laboratories for this type of determinations.

In conclusion, in this work we have designed and optimized a novel and versatile electrochemical biosensing strategy compatible with POC demands for the detection of multiple TAAs, even those difficult-to-be-expressed, based on the use of HaloTag fusions proteins obtained by *in vitro* expression systems maintaining or increasing their diagnostic ability. The autoantibodies against the described TAAs could discriminate CRC and premalignant subjects from control individuals with great specificity and sensitivity. The capability of the developed technology was demonstrated by performing 104 and 1,000 determinations using electrochemical and chemiluminescence detection, respectively. The results obtained using both detection techniques were comparable and showed that while no seroreactivity was observed against any of the tumor antigens selected in asymptomatic patients, 100% of patients with premalignant lesions or CRC exhibit seroreactivity to at least 4 out of the 8

selected antigens. These results confirm the possibility of reliably and minimally invasively diagnose CRC by analyzing molecular signatures comprising these eight autoantibodies. Although further improvements could be made by including other CRC TAAs to increase the diagnostic ability of the developed electrochemical technology, and further validations using larger independent patient's cohorts, the capabilities and advantages demonstrated so far reveal its potential to integrate difficult- and easy-to-express TAAs to contribute to early and reliable CRC diagnosis, and thus greatly increasing patient income and benefiting the cost associated to CRC treatment by Health Systems.

Materials and methods

Plasma samples

The Institutional Ethical Review Boards of the Instituto de Salud Carlos III, Hospital Clínico San Carlos, and La Paz Hospital approved this study on biomarker discovery and validation (CEI PI 45). Plasma samples (Table 1 and Table S1) were used accomplishing all the ethical issues and relevant guidelines and regulations.

Plasma samples (Table 1 and Table S1) were obtained from the biobanks of the Hospital Clínico San Carlos and Hospital La Paz after approval of the Ethical Review Boards of these institutions. Breast and lung cancer samples provided by Hospital Universitari de Sant Joan (Tarragona, Spain) were used accomplishing all the ethical issues and relevant guidelines and regulations. All subjects in the study gave their written informed consent to participate and all experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

For the analysis of the CRC diagnostic ability of autoantibodies, a panel of 125 plasma samples from colorectal cancer patients and premalignant colon subjects (low- and high-grade adenomas), and control individuals (asymptomatic healthy and negative colonoscopy individuals, Fecal Occult Blood Test – FOBT- positive and colonoscopy negative individuals, and breast and lung cancer patients) was used (Table 1, and Table S1). Plasma samples were collected using a standardized sample collection protocol and stored at -80°C until use [4, 9–11].

Gateway plasmid construction, gene cloning, DNA preparation and protein expression

Sequence-verified, full-length cDNA plasmids containing selected targets for validation in flexible pDONR221 or pENTR223 vector system were obtained from the publicly available DNASU Plasmid Repository (<https://dnasu.org/DNASU/>) [51]. The ORFs were transferred by LR clonase reactions

(Invitrogen, Carlsbad, CA), alternatively, to a pANT7_cHalo or pJFT7_nHalo vector for *in vitro* protein expression to get the autoantigens expressed as fusion proteins to HaloTag in the C-terminal or in the N-terminal, respectively [13, 52]. All donor and expression plasmids were sequence verified prior to a subsequent use.

To obtain high-quality supercoiled DNA, plasmids were transformed into TOP10 *E. coli* cells and grown in 250 mL Luria Bertani (LB) supplemented with the appropriate antibiotic (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicilin and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin). Plasmid DNA was purified using the NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA). Proteins were cell-free expressed *in vitro* using HeLa cell lysate from the 1-Step Human Coupled IVT Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) per manufacturer's recommendations to carry out the ELISA studies.

SDS-PAGE and western blot analysis

SDS-PAGE and western blot analysis to assess protein quality was performed as previously reported [53]. Briefly, 0.67 μL of the *in vitro* protein extracts were run in 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra). After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with an anti-HaloTag monoclonal antibody. Immunodetection on the membranes was achieved using HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Table S4). Chemiluminescence signal was developed with ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) and detected on an Amersham Imager 680 (GE Healthcare).

EBNA-I ELISA

Colorimetric ELISA for EBNA-I antibody determination for the evaluation of the CRC autoantibody response specificity was accomplished by coating 0.05 μg of EBNA-I protein kindly provided by Protein Alternatives, S.L. per well in 50 μL of phosphate-buffer saline solution (PBS) in 96-well Maxisorp plates (Nunc) overnight at 4°C . Plates were then blocked using a 3% (w/v) skimmed-milk solution in PBS supplemented with 0.1% Tween (PBST) for 1 h at 37°C and then incubated 1 h at 37°C with 50 μL of the 1:300 diluted plasma samples. After extensive washing with PBST, plates were incubated for 1 h at 37°C with 50 μL of an HRP-labeled secondary antibody. Colorimetric signal was developed as previously described [54, 55].

Autoantibody analysis by luminescence beads immunoassay

Protein coupling to Magne HaloTag beads (MBs, Promega) was performed overnight at 4°C and

1000 rpm according to the manufacturer instructions using 0.67 μ L of IVT expression reaction and 0.5 μ L of HaloTag MBs per measurement. For covalent binding, a mixture of the required amount of protein and MBs was made taking into account the number of replicates and measurements to be performed [13, 35, 56]. After extensive washing with PBS, Tween 0.1%, Triton X-100 0.05% using a magnet and removal of non-covalently bound proteins with 0.1 M glycine, pH 2.7, HaloTag fusion proteins immobilized onto MBs were blocked with Superblock (Pierce) for 1 h. To verify covalent protein immobilization, the HaloTag fusion proteins were detected with either anti-HaloTag (Promega), or specific antibodies against the TAAs followed by 1 h incubation with the corresponding diluted HRP conjugated secondary antibody (Table S4). Alternatively, they were incubated overnight with pooled or individual plasma samples at indicated dilutions at 1000 rpm and 4 °C. After washing with PBS, Tween 0.1%, Triton X-100 0.05% as above, HRP-conjugated anti-human IgG antibody (Dako) 1:10000 diluted in PBS supplemented with Tween 20 0.1% (v/v) and 3% (w/v) BSA was incubated with the MBs. The MBs were collected and placed on black Maxisorp 96-well plates (Nunc). Signal was developed using 50 μ L of SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, IL) for the detection of luminescence on The Spark multimode microplate reader (Tecan Trading AG, Switzerland). Alternatively, plates were also recorded on an Amersham Imager 680 (GE Healthcare).

Autoantibody analysis by electrochemical beads immunoassay

The protocol was previously reported and optimized for the determination of p53 autoantibodies [13]. The same protocol was followed for the determination of CRC-specific autoantibodies against GTF2B, MAPKAPK3, PIM1, PKN1, SRC, STK4, SULF1, and p53. To verify the correct protein immobilization, the HaloTag fusion proteins were detected with anti-HaloTag mAb (Promega), followed by 1 h incubation with 1:3000 diluted HRP-conjugated anti-mouse IgG (Sigma Aldrich). The amperometric measurements were performed in the presence of the hydroquinone (HQ)/H₂O₂ system [57] at disposable screen-printed carbon electrodes (SPCEs) upon magnetic capture of the MBs bearing the immunocomplexes on the working electrode [13]. The biorecognition event is monitored by the variation in the cathodic current generated by the enzymatic (HRP) reduction of H₂O₂ mediated by HQ and measured at -0.20 V (vs a Ag pseudoreference electrode) [57].

The amperometric measurements were carried out with a single SPCE for each measurement (that do not take more than 3 min) and discarded afterwards. However, no significant change in the working protocol would be required to measure simultaneous signals at arrays of 8 electrodes or even at electrochemical plates of 96 electrodes.

Statistical analysis

All statistical analyses were done with Microsoft Office Excel and the R program. For the analysis of the results obtained by luminescence and electrochemical beads immunoassays, Mann-Whitney U test was performed, and statistically significant levels were considered at $p < 0.05$. The diagnostic capacity of each individual protein as well as the combination of markers was evaluated by a receiver operating characteristic (ROC) curve. ROC curves, their corresponding area under the curve (AUC) and maximized sensitivity and specificity values were calculated using the R package Epi [58].

Supplementary Material

Supplementary figure and tables.

<http://www.thno.org/v10p3022s1.pdf>

Acknowledgments

This work was supported by the financial support of the PI17CIII/00045 grant from the AES-ISCI program to R.B., cofounded by FEDER funds. The financial support of the CTQ2015-64402-C2-1-R (Spanish Ministerio de Economía y Competitividad) and RTI2018-096135-B-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades) Research Projects and the TRANSNANOAVA NSENS-CM Program from the Comunidad de Madrid (Grant S2018/NMT-4349) to P.Y-S., S.C. and J.M.P are gratefully acknowledged. G.D. acknowledges the financial support of PI15/00246 grant of the FIS and Cátedra UAM-Roche en Medicina de Innovación. M.G-A. was supported by a contract of the Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI) with the participation of the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y del Fondo Social Europeo. A.M-C. is a recipient of a FPU fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. G.S-F. is recipient of a predoctoral contract (grant number 1193818N) supported by The Flanders Research Foundation (FWO). Predoctoral contracts from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (E.P.) and Universidad Complutense de Madrid (V.R.V-M.) are also gratefully acknowledged.

Author Contributions

Conception and design: J.M.P., S.C., R.B. Development of methodology: M.G.-A., A.G.-A., A.M.-C., G.S.-F., E.P., VRV, P.Y.-S., J.M.P., S.C., R.B. Perform Research: M.G.-A., M.J.F.-A., A.M.-C., G.S.-F., E.P., VRV, S.F.-D. Analysis and interpretation of data: M.G.-A., A.G.-A., C.P., M.J.F.-A., S.C., J.M.P., R.B. Writing, review, and/or revision of the manuscript: M.G.-A., A.G.-A., C.P., M.J.F.-A., J.M.P., S.C., R.B. Technical, obtaining and processing of samples, or material support: C.P., M.J.F.-A., A.M.-C., J.C., M.A., E.R.-T., J.J., N.R., G.D.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Bradley CJ, Given CW, Roberts C. Disparities in cancer diagnosis and survival. *Cancer*. 2001; 91: 178-88.
- Nesterova M, Johnson N, Cheadle C, Cho-Chung YS. Autoantibody biomarker opens a new gateway for cancer diagnosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1762: 398-403.
- Noaki R, Kawahara H, Watanabe K, Ushigome T, Kobayashi S, Yanaga K. Serum p53 antibody is a useful tumor marker of early colorectal cancer. *Int Surg*. 2010; 95: 287-92.
- Barderas R, Villar-Vazquez R, Fernandez-Acenero MJ, Babel I, Pelaez-Garcia A, Torres S, et al. Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. *Sci Rep*. 2013; 3: 2938.
- Pedersen JW, Gentry-Maharaj A, Fourkala EO, Dawney A, Burnell M, Zaikin A, et al. Early detection of cancer in the general population: a blinded case-control study of p53 autoantibodies in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013; 108: 107-14.
- Qiu J, Choi G, Li L, Wang H, Pitteri SJ, Pereira-Faca SR, et al. Occurrence of autoantibodies to annexin I, 14-3-3 theta and LAMR1 in prediagnostic lung cancer sera. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 5060-6.
- 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: 1280-90.
- Barderas R, Babel I, Casal JI. Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl*. 2010; 4: 159-78.
- Barderas R, Babel I, Diaz-Uriarte R, Moreno V, Suarez A, Bonilla F, et al. An optimized predictor panel for colorectal cancer diagnosis based on the combination of tumor-associated antigens obtained from protein and phage microarrays. *J Proteomics*. 2012; 75: 4647-55.
- Babel I, Barderas R, Diaz-Uriarte R, Moreno V, Suarez A, Fernandez-Acenero MJ, et al. Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer by using phage microarrays. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10: M110 001784.
- 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. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8: 2382-95.
- Casal JI, Barderas R. Identification of cancer autoantigens in serum: toward diagnostic/prognostic testing? *Mol Diagn Ther*. 2010; 14: 149-54.
- Garranzo-Asensio M, Guzman-Aranguez A, Poves C, Fernandez-Acenero MJ, Torrente-Rodriguez RM, Ruiz-Valdepenas Montiel V, et al. Toward liquid biopsy: determination of the humoral immune response in cancer patients using halotag fusion protein-modified electrochemical bioplatfroms. *Anal Chem*. 2016; 88: 12339-45.
- Serafin V, Valverde A, Garranzo-Asensio M, Barderas R, Campuzano S, Yanez-Sedeno P, et al. Simultaneous amperometric immunosensing of the metastasis-related biomarkers IL-13Ralpha2 and CDH-17 by using grafted screen-printed electrodes and a composite prepared from quantum dots and carbon nanotubes for signal amplification. *Mikrochim Acta*. 2019; 186: 411.
- Valverde A, Povedano E, Ruiz-Valdepenas Montiel V, Yanez-Sedeno P, Garranzo-Asensio M, Rodriguez N, et al. Determination of Cadherin-17 in tumor tissues of different metastatic grade using a single incubation-step amperometric immunosensor. *Anal Chem*. 2018; 90: 11161-7.
- Chikkaveeriah BV, Bhirde AA, Morgan NY, Eden HS, Chen X. Electrochemical immunosensors for detection of cancer protein biomarkers. *ACS Nano*. 2012; 6: 6546-61.
- Eletxigerra U, Martinez-Perdiguero J, Barderas R, Pingarron JM, Campuzano S, Merino S. Surface plasmon resonance immunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum and raw cancer cell lysates. *Anal Chim Acta*. 2016; 905: 156-62.
- Eletxigerra U, Martinez-Perdiguero J, Merino S, Barderas R, Torrente-Rodriguez RM, Villalonga R, et al. Amperometric magnetoimmunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum, cell lysates and intact breast cancer cells. *Biosens Bioelectron*. 2015; 70: 34-41.
- Esteban-Fernandez de Avila B, Araque E, Campuzano S, Pedrero M, Dalkiran B, Barderas R, et al. Dual functional graphene derivative-based electrochemical platforms for detection of the TP53 gene with single nucleotide polymorphism selectivity in biological samples. *Anal Chem*. 2015; 87: 2290-8.
- Torrente-Rodriguez RM, Campuzano S, Lopez-Hernandez E, Montiel VR, Barderas R, Granados R, et al. Simultaneous detection of two breast cancer-related miRNAs in tumor tissues using p19-based disposable amperometric magnetobiosensing platforms. *Biosens Bioelectron*. 2015; 66: 385-91.
- Li X, Ye M, Zhang W, Tan D, Jaffrezic-Renault N, Yang X, et al. Liquid biopsy of circulating tumor DNA and biosensor applications. *Biosens Bioelectron*. 2019; 126: 596-607.
- Kelley SO, Das J. High-performance nucleic acid sensors for liquid biopsy applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2019; 58: 2-13.
- Dai Y, Liu CC. Recent advances on electrochemical biosensing strategies toward universal point-of-care systems. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2019; 58: 12355-68.
- Li H, Huang Y, Zhang B, Yang D, Zhu X, Li G. A new method to assay protease based on amyloid misfolding: application to prostate cancer diagnosis using a panel of proteases biomarkers. *Theranostics*. 2014; 4: 701-7.
- Zhang Y, Gao G, Liu H, Fu H, Fan J, Wang K, et al. Identification of volatile biomarkers of gastric cancer cells and ultrasensitive electrochemical detection based on sensing interface of Au-Ag alloy coated MWCNTs. *Theranostics*. 2014; 4: 154-62.
- Lee JR, Appelmann I, Miething C, Shultz TO, Ruderman D, Kim D, et al. Longitudinal multiplexed measurement of quantitative proteomic signatures in mouse lymphoma models using magneto-nanosensors. *Theranostics*. 2018; 8: 1389-98.
- Li Y, Xiong Y, Fang L, Jiang L, Huang H, Deng J, et al. An electrochemical strategy using multifunctional nanoconjugates for efficient simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Vibrio cholerae* O1. *Theranostics*. 2017; 7: 935-44.
- Liu TC, Lee YC, Ko CY, Liu RS, Ke CC, Lo YC, et al. Highly sensitive/selective 3D nanostructured immunoparticle-based interface on a multichannel sensor array for detecting amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Theranostics*. 2018; 8: 4210-25.
- Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, et al. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol*. 2008; 3: 373-82.
- Ohana RF, Hurst R, Vidugiriene J, Slater MR, Wood KV, Urh M. HaloTag-based purification of functional human kinases from mammalian cells. *Protein Expr Purif*. 2011; 76: 154-64.
- Garranzo-Asensio M, Guzman-Aranguez A, Poves C, Fernandez-Acenero MJ, Montero-Calle A, Ceron MA, et al. The specific seroreactivity to ΔNp73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein. *Sci Rep*. 2019; 9: 13547.
- Edelsberg J, Weycker D, Atwood M, Hamilton-Fairley G, Jett JR. Cost-effectiveness of an autoantibody test (EarlyCDT-Lung) as an aid to early diagnosis of lung cancer in patients with incidentally detected pulmonary nodules. *PLoS One*. 2018; 13: e0197826.
- Jett JR, Peek LJ, Fredericks L, Jewell W, Pingleton WW, Robertson JF. Audit of the autoantibody test, EarlyCDT(R)-lung, in 1600 patients: an evaluation of its performance in routine clinical practice. *Lung Cancer*. 2014; 83: 51-5.
- Lam S, Boyle P, Healey GF, Maddison P, Peek L, Murray A, et al. Early CDT-Lung: an immunobiomarker test as an aid to early detection of lung cancer. *Cancer Prev Res*. 2011; 4: 1126-34.
- San Segundo-Acosta P, Montero-Calle A, Fuentes M, Rabano A, Villalba M, Barderas R. Identification of Alzheimer's Disease autoantibodies and their target biomarkers by phage microarrays. *J Proteome Res*. 2019; 18: 2940-53.
- Kostianets O, Shyyan M, Antoniuk SV, Filonenko V, Kiyamova R. Panel of SEREX-defined antigens for breast cancer autoantibodies profile detection. *Biomarkers*. 2017; 22: 149-56.
- Beutgen VM, Perumal N, Pfeiffer N, Grus FH. Autoantibody biomarker discovery in primary open angle glaucoma using serological proteome analysis (SERPA). *Front Immunol*. 2019; 10: 381.
- Camacho-Encina M, Balboa-Barreiro V, Rego-Perez I, Picchi F, VanDuin J, Qiu J, et al. Discovery of an autoantibody signature for the early diagnosis of knee osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *Ann Rheum Dis*. 2019.
- Nagele E, Han M, Demarshall C, Belinka B, Nagele R. Diagnosis of Alzheimer's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera. *PLoS One*. 2011; 6: e23112.
- Han M, Nagele E, DeMarshall C, Acharya N, Nagele R. Diagnosis of Parkinson's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera. *PLoS One*. 2012; 7: e32383.

41. Zaenker P, Gray ES, Ziman MR. Autoantibody production in cancer--the humoral immune response toward autologous antigens in cancer patients. *Autoimmun Rev.* 2016; 15: 477-83.
42. Anderson KS, LaBaer J. The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J Proteome Res.* 2005; 4: 1123-33.
43. Yanez-Sedeno P, Campuzano S, Pingarron JM. Pushing the limits of electrochemistry toward challenging applications in clinical diagnosis, prognosis, and therapeutic action. *Chem Commun.* 2019; 55: 2563-92.
44. Campuzano S, Pedrero M, González-Cortés A, Yáñez-Señedo P, Pingarrón JM. Electrochemical biosensors for autoantibodies in autoimmune and cancer diseases. *Anal Methods.* 2019; 11: 871-87.
45. Rocha-Santos TAP. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends in Anal Chem* 2014; 62: 28-36.
46. Reverte L, Prieto-Simon B, Campas M. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review. *Anal Chim Acta.* 2016; 908: 8-21.
47. Yanez-Sedeno P, Campuzano S, Pingarron JM. Magnetic particles coupled to disposable screen printed transducers for electrochemical biosensing. *Sensors.* 2016; 16: 1585.
48. Kudr J, Klejdus B, Adam V, Zitka O. Magnetic solids in electrochemical analysis. *TrAC Trends Anal Chem* 2018; 98: 104-13.
49. Pastucha M, Farka Z, Lacina K, Mikusova Z, Skladal P. Magnetic nanoparticles for smart electrochemical immunoassays: a review on recent developments. *Mikrochim Acta.* 2019; 186: 312.
50. Vasilescu A, Nunes G, Hayat A, Latif U, Marty JL. Electrochemical affinity biosensors based on disposable screen-printed electrodes for detection of food allergens. *Sensors.* 2016; 16: 1863.
51. Seiler CY, Park JG, Sharma A, Hunter P, Surapaneni P, Sedillo C, et al. DNASU plasmid and PSI: Biology-Materials repositories: resources to accelerate biological research. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: D1253-60.
52. Katchman BA, Barderas R, Alam R, Chowell D, Field MS, Esserman LJ, et al. Proteomic mapping of p53 immunogenicity in pancreatic, ovarian, and breast cancers. *Proteomics Clin Appl.* 2016; 10: 720-31.
53. Barderas R, Shochat S, Timmerman P, Hollestelle MJ, Martinez-Torrecuadrada JL, Hoppener JW, et al. Designing antibodies for the inhibition of gastrin activity in tumoral cell lines. *Int J Cancer.* 2008; 122: 2351-9.
54. Mas S, Boissy P, Monsalve RI, Cuesta-Herranz J, Diaz-Perales A, Fernandez J, et al. A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic allergen from *Salsola kali* pollen for allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015; 167: 83-93.
55. Mas S, Oeo-Santos C, Cuesta-Herranz J, Diaz-Perales A, Colas C, Fernandez J, et al. A relevant IgE-reactive 28kDa protein identified from *Salsola kali* pollen extract by proteomics is a natural degradation product of an integral 47kDa polygalacturonase. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2017; 1865: 1067-76.
56. Montero-Calle A, San Segundo-Acosta P, Garranzo-Asensio M, Rabano A, Barderas R. The molecular misreading of APP and UBB induces a humoral immune response in Alzheimer's Disease patients with diagnostic ability. *Mol Neurobiol.* 2019; [Epub ahead of print].
57. Camacho C, Matías JC, Chico B, Cao R, Gómez L, Simpson BK, et al. Amperometric Biosensor for hydrogen peroxide, using supramolecularly immobilized horseradish peroxidase on the β -cyclodextrin-coated gold electrode. *Electroanalysis.* 2007; 19: 2538-42.
58. Carstensen B, Plummer M, Laara E, Hills M. Epi: A Package for Statistical Analysis in Epidemiology. R package version 2.40. <https://CRAN.R-project.org/package=Epi>; 2019.

Multiplexed monitoring of a novel autoantibody diagnostic signature of colorectal cancer using HaloTag technology-based electrochemical immunosensing platform

María Garranzo-Asensio^{1,2}, Ana Guzmán-Aránguez¹, Eloy Povedano³, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel³, Carmen Poves⁴, María Jesús Fernandez-Aceñero⁵, Ana Montero-Calle², Guillermo Solís-Fernández², Servando Fernandez-Diez⁴, Jordi Camps⁶, Meritxell Arenas⁶, Elisabeth Rodríguez-Tomás^{6,7}, Jorge Joven⁶, Maricruz Sanchez-Martinez², Nuria Rodríguez⁸, Gemma Dominguez⁹, Paloma Yáñez-Sedeño³, José Manuel Pingarrón^{3,*}, Susana Campuzano^{3,*}, Rodrigo Barderas^{2,*}.

* Co-senior authors and co-corresponding authors.

1. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.
2. UFIEC, Chronic Disease Programme, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda 28222, Madrid, Spain.
3. Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
4. Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, E-28040, Madrid, Spain
5. Pathology Department, University Hospital Gregorio Marañón, E-28007 Madrid, Spain
6. Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus (Spain).
7. Department of Radiation Oncology, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus (Spain).
8. Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, E-28046, Madrid, Spain.
9. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, E-28029, Madrid, Spain.

*To whom correspondence should be addressed:

Rodrigo Barderas.

Functional Proteomics Unit, UFIEC, Chronic Disease Programme, Instituto de Salud Carlos III, E-28222 Majadahonda, Madrid, Spain; Tel.: 34-91-8223231; E-mail: r.barderasm@isciii.es

Susana Campuzano

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; Tel.: 34-91-3944219; E-mail: susanacr@ucm.es

José M. Pingarrón

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; Tel.: 34-91-3944315; E-mail: pingarro@quim.ucm.es

Supplementary Tables and figures

Table S1. Individual clinical information of the colorectal cancer patients and controls used in the study.

Plasma code	Clasification	Group	Gender	Age	Cancer stage
CT1	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	F	43	-
CT2	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	M	35	-
CT3	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	F	48	-
CT4	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	M	41	-
CT5	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	M	36	-
CT6	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	F	46	-
CT7	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	F	40	-
CT8	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	F	41	-
CT9	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	M	41	-
CT10	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	55	-
CT11	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	M	49	-
CT12	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	44	-
CT13	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	52	-
CT14	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	M	31	-
CT15	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	38	-
CT16	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	41	-
CT17	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	46	-
CT18	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	37	-
CT19	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	M	57	-
CT20	Negative colonoscopy	Asymptomatic/Control	M	58	-
CT21	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	38	-
CT22	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	51	-
CT23	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	29	-
CT24	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	50	-
CT25	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	M	39	-
CT26	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	45	-
CT27	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	47	-
CT28	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	F	51	-
CT29	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	M	34	-
CT30	Asymptomatic	Asymptomatic/Control	M	40	-
B1	Breast cancer	Control	F	61	III
B2	Breast cancer	Control	F	50	II
B3	Breast cancer	Control	F	55	I
B4	Breast cancer	Control	F	57	II
B5	Breast cancer	Control	F	72	II
B6	Breast cancer	Control	F	60	I
B7	Breast cancer	Control	F	50	II
B8	Breast cancer	Control	F	68	I

B9	Breast cancer	Control	F	34	II
B10	Breast cancer	Control	F	46	III
B11	Breast cancer	Control	F	69	II
B12	Breast cancer	Control	F	79	III
B13	Breast cancer	Control	F	55	I
B14	Breast cancer	Control	F	41	I
B15	Breast cancer	Control	F	83	II
B16	Breast cancer	Control	F	65	I
B17	Breast cancer	Control	F	65	II
B18	Breast cancer	Control	F	47	I
B19	Breast cancer	Control	F	54	III
B20	Breast cancer	Control	F	55	III
L1	Lung cancer	Control	M	84	I
L2	Lung cancer	Control	M	72	II
L3	Lung cancer	Control	M	55	III
L4	Lung cancer	Control	M	55	III
L5	Lung cancer	Control	M	59	III
L6	Lung cancer	Control	M	85	I
L7	Lung cancer	Control	M	68	II
L8	Lung cancer	Control	F	63	III
L9	Lung cancer	Control	M	67	III
L10	Lung cancer	Control	M	71	III
L11	Lung cancer	Control	M	75	I
L12	Lung cancer	Control	F	53	III
L13	Lung cancer	Control	M	84	I
L14	Lung cancer	Control	M	82	I
L15	Lung cancer	Control	M	65	II
L16	Lung cancer	Control	M	64	III
L17	Lung cancer	Control	F	57	II
L18	Lung cancer	Control	M	79	I
L19	Lung cancer	Control	F	59	II
L20	Lung cancer	Control	M	71	III
PRE1	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59	-
PRE2	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	64	-
PRE3	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	65	-
PRE4	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60	-
PRE5	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59	-
PRE6	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	57	-
PRE7	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	70	-
PRE8	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	40	-
PRE9	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	57	-
PRE10	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60	-
PRE11	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	50	-
PRE12	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	67	-
PRE13	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	61	-
PRE14	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	62	-

PRE15	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	59	-
PRE16	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	54	-
PRE17	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60	-
PRE18	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	69	-
PRE19	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	60	-
PRE20	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	62	-
PRE21	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	60	-
PRE22	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	75	-
PRE23	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	61	-
PRE24	Adenoma	Premalignant group/pathological	F	59	-
PRE25	Adenoma	Premalignant group/pathological	M	57	-
CRC1	CRC	CRC group/pathological	F	85	IIIC
CRC2	CRC	CRC group/pathological	F	74	IV
CRC3	CRC	CRC group/pathological	M	63	IIIA
CRC4	CRC	CRC group/pathological	F	60	IIIA
CRC5	CRC	CRC group/pathological	M	75	IIIC
CRC6	CRC	CRC group/pathological	F	74	IV
CRC7	CRC	CRC group/pathological	M	82	IV
CRC8	CRC	CRC group/pathological	M	85	III
CRC9	CRC	CRC group/pathological	F	58	IV
CRC10	CRC	CRC group/pathological	M	54	IV
CRC11	CRC	CRC group/pathological	F	87	IV
CRC12	CRC	CRC group/pathological	M	84	IV
CRC13	CRC	CRC group/pathological	F	58	IV
CRC14	CRC	CRC group/pathological	F	51	IV
CRC15	CRC	CRC group/pathological	M	84	IV
CRC16	CRC	CRC group/pathological	M	62	III
CRC17	CRC	CRC group/pathological	M	71	IIIA
CRC18	CRC	CRC group/pathological	M	72	IV
CRC19	CRC	CRC group/pathological	F	55	IV
CRC20	CRC	CRC group/pathological	M	78	IIIA
CRC21	CRC	CRC group/pathological	M	61	IIIB
CRC22	CRC	CRC group/pathological	F	66	IIIA
CRC23	CRC	CRC group/pathological	F	59	IV
CRC24	CRC	CRC group/pathological	M	82	IV
CRC25	CRC	CRC group/pathological	F	66	IV
CRC26	CRC	CRC group/pathological	F	66	IV

Table S2. Analysis of the diagnostic value of indicated autoantibodies by means of ROC curves analyses.

Autoantibody target	All controls vs Pathological				All controls vs CRC				All controls vs Premalignant			
	AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)		AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)		AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	
GTF2B	60.6	26.0	100.0		69.1	44.0	92.9		52.1	16.0	100.0	
MAPKAPK3	72.5	50.0	95.7		75.8	56.0	95.7		69.1	44.0	95.7	
PIM1	81.3	68.0	92.9		87.2	76.0	97.1		75.4	56.0	94.3	
PKN1	77.1	70.0	80.0		83.5	76.0	81.4		70.7	64.0	80.0	
SRC	70.1	64.0	82.9		75.9	72.0	84.3		64.3	56.0	82.9	
STK4	75.9	68.0	82.9		76.1	72.0	82.9		75.7	68.0	80.0	
SULF1	72.2	64.0	81.4		77.7	64.0	85.7		66.7	60.0	81.4	
p53	57.4	36.0	87.1		62.2	44.0	87.1		52.7	36.0	80.0	
Combination of statistically significant proteins	87.6	72.0	92.9		91.8	76.0	98.6		83.0	84.0	75.7	
RESULTADOS												
Autoantibody target	Asymptomatic vs Pathological				Asymptomatic vs CRC				Asymptomatic vs Premalignant			
	AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)		AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)		AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	
GTF2B	63.8	26.0	100.0		71.4	56.0	83.3		70.3	53.8	83.3	
MAPKAPK3	71.9	58.0	90.0		75.4	64.0	90.0		76.0	65.4	90.0	
PIM1	78.9	62.0	93.3		85.1	76.0	93.3		85.5	76.9	93.3	
PKN1	71.4	62.0	76.7		77.6	68.0	76.7		77.6	69.2	76.7	
SRC	62.1	62.0	73.3		68.1	72.0	73.3		68.8	73.1	73.3	
STK4	73.4	68.0	80.0		73.8	72.0	80.0		74.3	73.1	80.0	
SULF1	64.8	72.0	53.3		69.3	88.0	46.7		70.4	88.5	46.7	
p53	63.1	36.0	90.0		67.3	69.0	76.6		68.2	61.5	76.7	
Combination of statistically significant proteins	85.3	74.0	90.0		92.4	76.0	96.7		78.4	72.0	80.0	

Table S3. Comparison of the AUC obtained in different studies.

Autoantibody target	Here described methodology			Previous methodologies		
	Asymptomatic healthy control individuals vs CRC					
	AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
GTF2B	71.4	56.0	83.3	66.0*	69.0*	60.0*
GTF2B	71.4	56.0	83.3	62.9^	13.0^	90.0^
MAPKAPK3	75.4	64.0	90.0	64.4^	8.0^	90.0^
PIM1	85.1	76.0	93.3	63.6	13	90.0
PKN1	77.6	68.0	76.7	-	-	-
SRC	68.1	72.0	73.3	-	-	-
STK4	73.8	72.0	80.0	64.4^	18.0^	90.0^
SULF1	69.3	88.0	46.7	-	-	-
p53	67.3	69.0	76.6	62.0*	71.0*	40.0*
p53	67.3	69.0	76.6	68.8^	13	90.0^

* Data from Barderas, R.; Villar-Vazquez, R.; Fernandez-Acenero, M. J.; Babel, I.; Pelaez-Garcia, A.; Torres, S.; Casal, J. I. Sci Rep 2013, 3, 2938.

^ Data from Villar-Vazquez, R.; Padilla, G.; Fernandez-Acenero, M. J.; Suarez, A.; Fuente, E.; Pastor, C.; Calero, M.; Barderas, R.; Casal, J. I. Proteomics 2016, 16, 1280-1290.

Table S4. Primary and secondary antibodies used in the study.

Primary Antibodies					
Antibody target	Clonality	Source	Application	Dilution	Provider
HaloTag p53 SRC MAPKAPK3	Monoclonal	Mouse	WB/ELISA	1:1000	Promega
	Monoclonal	Mouse	ELISA	1:1000	SCBT
	Polyclonal	Goat	ELISA	1:1000	R&D Systems
	Monoclonal	Mouse	ELISA	1:1000	Abnova
HRP-labeled secondary antibodies or HRP-labeled reagents					
Name	Clonality	Source	Application	Dilution	Provider
HRP anti-mouse IgG	Polyclonal	Goat	WB/ELISA	1:2500	Dako
HRP anti-rabbit IgG	Polyclonal	Goat	WB	1:3000	BioRad
HRP anti-goat IgG	Polyclonal	Rabbit	ELISA	1:1000	Jackson
HRP anti-human IgG	Polyclonal	Goat	ELISA	1:10000	Jackson

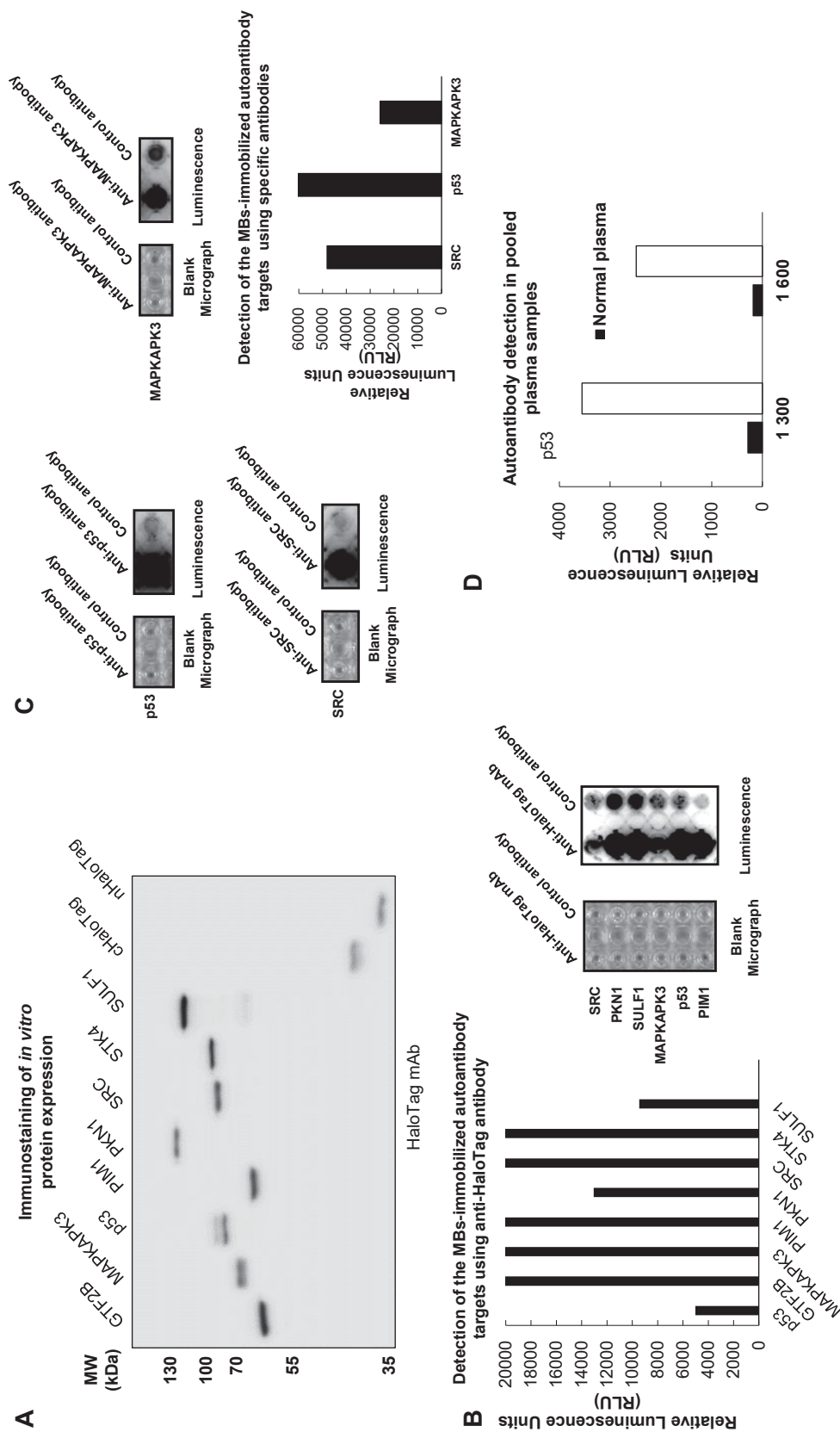


Figure S1. Verification of the *in vitro* protein expression and immobilization onto magnetic beads of the HaloTagged fusion proteins. (A) Autoantibody targets expression as HaloTag fusion proteins was verified by immunostaining using an antibody against the tag. The molecular mass of the proteins was in accordance to their theoretical mass with the HaloTag. **(B)** The correct immobilization of the proteins was verified by luminescence using an anti-HaloTag antibody. **(C)** The correct immobilization of the proteins was verified by luminescence using the indicated specific antibodies against the TAAs. **(B, C)** Quantitative luminescence was measured on The Spark multimode microplate reader (Tecan) and depicted by bar graph. Indicated MBs were placed on 96-well Maxisorp white plates and Luminescence was developed with ECL Western Blotting Substrate. Blank micrograph depicting the position of the indicated MBs, and luminescence recorded on an Amersham Imager 680 (GE Healthcare) are depicted. **(D)** Optimal assay conditions for the luminescence beads assay were found using pooled plasma samples at a 1:300 dilution.

DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal es uno de los tipos de cáncer más frecuentes y letales en países desarrollados. Esta letalidad se debe principalmente a su diagnóstico tardío ya que el porcentaje de pacientes diagnosticados de forma temprana (estadios I y II) es drásticamente inferior al porcentaje de pacientes diagnosticados en estadios tardíos de la patología (aproximadamente el 61% de los casos se diagnostican en estadios III y IV). Además, debido a la industrialización y al incremento de hábitos no saludables, la incidencia se ha visto aumentada en los últimos años. El diagnóstico suele llevarse a cabo mediante colonoscopia tras un cribado inicial mediante FOBT [263]. Este diagnóstico, además de altamente invasivo, principalmente identifica a los pacientes en las etapas más avanzadas de la enfermedad, habiendo además un gran número de falsos positivos. Por tanto, existe una clara necesidad de conocer más a fondo los posibles efectores de la patología, posibilitando el estudio de nuevas dianas terapéuticas, así como identificar nuevos biomarcadores tempranos de la patología. En este sentido, las técnicas proteómicas son herramientas útiles para la identificación simultánea de posibles marcadores diagnósticos y terapéuticos de la patología. Además, el uso de la respuesta humoral como elemento diagnóstico presenta numerosas ventajas debido a su aparición temprana durante la formación y progresión de la enfermedad y a la posibilidad de utilizar muestras de suero/plasma para la detección de CCR, aunque para ello es necesario el desarrollo e implementación de nuevas herramientas que puedan ser implementadas en clínica.

El trabajo de esta Tesis Doctoral se ha dividido en dos bloques complementarios entre sí. En el primer bloque, se ha evaluado el uso de técnicas proteómicas para la búsqueda de posibles biomarcadores de CCR con potencial diagnóstico. En el segundo bloque, se ha profundizado en el uso de la respuesta inmune humoral como marcador temprano de la patología y en el desarrollo de posibles herramientas diagnósticas de uso clínico. Además, se ha evaluado la relación entre los antígenos asociados a tumor susceptibles de desarrollar una respuesta inmune y su papel en las propiedades tumorigénicas de líneas celulares de CCR.

1. Identificación de biomarcadores de cáncer colorrectal mediante técnicas proteómicas y su validación funcional

Las técnicas proteómicas se consideran muy versátiles a la hora de buscar proteínas características de un proceso biológico concreto ya que permiten la identificación simultánea de éstas. Hasta la fecha, han permitido la identificación de interacciones proteicas, el cribado de posibles fármacos y moléculas pequeñas, el mapeo epitópico, el estudio de interacciones huésped-patógeno y la identificación de posibles autoantígenos [264-268]. En el contexto del cáncer, se ha destacado el uso de los geles bidimensionales, la espectrometría de masas y los microarrays de proteínas. Sin embargo, el uso de estas tecnologías por separado presenta sus limitaciones. Por un lado, en los estudios mediante microarrays la densidad total alcanzada para la impresión del proteoma en estas plataformas llega a ser de un máximo del 70-75% en el caso del proteoma humano, pero sin tener en cuenta las múltiples proteoformas de las proteínas [269-271]. Como alternativa, se han producido arrays tipo PrEST (*Protein-epitope signature tags*) de alta densidad que abarcan el proteoma completo [271]. Sin embargo, hacen uso de péptidos de tamaño medio de entre 50-150 aminoácidos sin segmentos transmembrana ni péptidos señal por lo que se pueden llegar a perder epítomos 3D discontinuos durante el cribado [272].

Por otro lado, la espectrometría de masas ha permitido identificar autoantígenos en distintos tipos de cáncer, incluyendo el CCR [273-275]. Estos estudios se han centrado fundamentalmente en la combinación de inmunodetección en membrana de extractos proteicos separados

mediante electroforesis en 2D empleando sueros de pacientes para la identificación de *spots* reactivos y su consiguiente identificación proteica mediante espectrometría de masas, por lo que se limita la identificación a proteínas de expresión media o abundante.

Identificación de proteínas desreguladas en el secretoma de células con sobreexpresión de Δ Np73 mediante microarrays de proteínas y proteómica cuantitativa SILAC.

En este trabajo, se ha estudiado el efecto de la desregulación proteica asociada a la sobreexpresión de Δ Np73 empleando de manera complementaria los microarrays de proteínas y proteómica cuantitativa SILAC. La estrategia de emplear ambas metodologías permite que, mediante el análisis por espectrometría de masas, se identifiquen proteínas que no suelen encontrarse impresas en la superficie de los arrays. Por otro lado, el uso de los microarrays permite identificar proteínas que no suelen aparecer en ensayos de espectrometría de masas por su extrema poca abundancia, completándose así al máximo el catálogo de proteínas afectadas por la sobreexpresión de Δ Np73. La clara implicación de Δ Np73 como la principal isoforma de TAp73 con propiedades oncogénicas en CCR [96, 276-279] y el hecho de que su presencia en exosomas de células de este tipo de cáncer aumente la progresión tumoral [280], hizo que este trabajo se centrara en esta isoforma, hipotetizándose que los efectores de Δ Np73 contribuirían al proceso metastásico o a la formación del nicho pre-metastásico [281].

La combinación del marcaje mediante SILAC y la espectrometría de masas junto con los microarrays de anticuerpos permitió comparar el medio condicionado de las células con sobreexpresión de Δ Np73 y las células control. De esta forma, se identificaron un gran número de efectores secretados al medio de cultivo que mimetizaría el secretoma tumoral presente en la sangre de pacientes de CCR con sobreexpresión de Δ Np73. Cabe recalcar que más del 75% de las proteínas identificadas se habían detectado previamente en exosomas según la base de datos ExoCarta. Este hecho es de especial relevancia dada la relación existente entre los exosomas y el nicho metastásico. Durante el desarrollo del tumor primario, el microambiente tumoral y los órganos del organismo susceptibles a metástasis van variando en composición mediante el reclutamiento de diversas moléculas que forman dicho nicho metastásico [282]. Es durante la formación del nicho cuando los exosomas secretados por el tumor primario juegan un papel importante al facilitar la comunicación intercelular y transporte de diversas moléculas [283-286]. Este nicho confiere a los órganos las características necesarias para que se pueda dar metástasis, de forma que facilita la supervivencia de las células tumorales metastásicas. Por tanto, el hecho de que la sobreexpresión de Δ Np73 conlleve a la detección de una gran cantidad de proteínas en exosomas pone de manifiesto su posible papel regulador en la metástasis del CCR. Estas proteínas, además, podrían ser posibles dianas terapéuticas para frenar la metástasis y progresión tumoral.

Dentro de las proteínas que se identificaron mediante la combinación de ambas estrategias proteómicas, nuestros estudios de validación se centraron en el eje de interacción EMAP-II-VEGFC-VEGFR3 y BDNF. EMAP-II es una citoquina proinflamatoria con actividades anti-angiogénicas que suprime el crecimiento tumoral inicial y metastásico a través de la interacción con VEGFR, compitiendo así con las proteínas VEGF e interfiriendo en su señalización [287]. La bajada en los niveles de expresión de EMAP-II y la subida en los niveles de VEGFR3 y VEGFC descritas en este trabajo debido a la sobreexpresión de Δ Np73 indicarían la importancia de esta proteína en la formación de vasos sanguíneos y linfáticos. Esta posible implicación de Δ Np73 en la formación de vasos se corroboró mediante ensayos funcionales empleando células HUVEC y

HLEC. Aunque en estudios previos ya se describió la asociación de Δ Np73 con la formación de vasos sanguíneos a través de la modulación de las proteínas HIF, VEGF y TGF β [288, 289], este trabajo es el primero en demostrar el papel de este modulador en la formación y desarrollo de vasos sanguíneos. Por tanto, las proteínas pertenecientes a este eje podrían servir como posible diana terapéutica o biomarcadores de la patología, como es el caso de EMAP-II. El uso de EMAP-II se está empleando en combinación con otros fármacos como el *gemcitabine* en ensayos clínicos de diferentes tipos tumorales [290-293], por lo que el estatus genético de Δ Np73 podría emplearse como medida indirecta de sus niveles al poder analizarse de manera sencilla en la clínica mediante qPCR. En cuanto a BDNF, ésta es una molécula que se ha visto implicada en la angiogénesis de distintos tipos de cáncer a través de la regulación del eje VEGF-HIF [294-296]. Sin embargo, no existen estudios sobre su posible papel en la linfangiogénesis. Los datos obtenidos en este trabajo mediante proteómica indicarían que la sobreexpresión de Δ Np73 produciría un aumento en la secreción de BDNF y disminución de EMAP-II que, según se vio en los ensayos funcionales mediante células HUVEC y HLEC, estimularía la angiogénesis y linfangiogénesis.

Además de evaluar el posible papel de las proteínas identificadas mediante proteómica en el desarrollo de CCR y sus propiedades metastásicas, se analizó también su presencia en plasma de pacientes. Con ello, se buscó estudiar su posible uso como biomarcadores de la patología en biopsias líquidas mucho menos invasivas que los métodos actuales de diagnóstico. Para ello, se emplearon plasmas de pacientes sanos, pacientes de CCR e individuos premalignos. EMAP-II y BDNF mostraron un elevado potencial diagnóstico, si bien es cierto que la medición de la caída de los niveles de EMAP-II en pacientes de CCR e individuos premalignos es más complicada de trasladar a la clínica que la medición de una sobreexpresión (o presencia) de BDNF en pacientes de CCR o individuos premalignos susceptibles a desarrollar la patología. En este sentido, el área debajo de la curva que se obtuvo para BDNF como valor predictivo de la presencia de CCR fue de un 96.9%, muy por encima de los valores establecidos para el CEA [297]. Los resultados obtenidos con BDNF son indudablemente prometedores, si bien sería necesario emplear un mayor número de muestras de plasma provenientes de distintas cohortes para confirmar los resultados.

Además del mencionado eje EMAP-II-VEG-VEGFR y BDNF, también se identificó la sobreexpresión de efectores implicados en procesos metabólicos (LDHB, aspartato aminotransferasa, GLO1, PFAS y PYGL), migración celular (CXCR4 y S1RP1) [298, 299] y/o invasión (QSOX1) [300]. En cuanto a los procesos metabólicos, el paso de fosforilación oxidativa a glicolisis anaeróbica produce intermediarios para el crecimiento y división celular regulados por oncogenes y genes supresores de tumor. En este sentido, el control de su regulación se ha atribuido a la familia de proteínas p53 [301-303], habiéndose asociado TAp73 (y no Δ Np73) a diferentes rutas metabólicas [304, 305]. Por tanto, los resultados obtenidos mediante proteómica sugerirían un papel clave de Δ Np73 en este sentido aun sin explorar que podría conllevar al desarrollo de nuevas herramientas antitumorales [306]. Además, la adaptabilidad metabólica es esencial para la progresión tumoral e incluye la cooperación entre células tumorales con distintos fenotipos metabólicos. Entre los distintos requisitos del cáncer, se encuentra el aporte de glucosa óptimo a las células glicolíticas tumorales, jugando un papel importante las proteínas identificadas LDHB y PYGL [307, 308], reforzándose por tanto el papel de Δ Np73 en esta característica del proceso tumoral. En cuanto a la posible implicación de Δ Np73 en la migración y/o invasión tumoral a través de la regulación de los efectores mencionados, los ensayos funcionales llevados a cabo en esta Tesis Doctoral empleando el medio condicionado de las células HCT116- Δ Np73 y HCT116-control, corroboraron los

resultados derivados de los ensayos de proteómica. Además, aproximadamente el 20% de las proteínas identificadas estaban relacionadas con la adhesión celular (meosina, calreticulina, sorcina, DSG2, DSC3, LAMC2, LGALS3BP, Talin-1, CDH3, LGALS1, PTPRF, PDCD6IP y COL6A1), proceso imprescindible para la progresión tumoral de CCR y su metástasis a hígado. Por tanto, estos datos sugieren que los efectores asociados a $\Delta Np73$ tienen propiedades pro-oncogénicas y pro-metastásicas, aunque es necesario un estudio funcional más en detalle de ellos.

Búsqueda de antígenos asociados a tumor de cáncer colorrectal mediante inmunoprecipitación acoplada a LC-MS/MS y validación de su potencial diagnóstico

Para la identificación de autoantígenos en cáncer, como ya se ha mencionado anteriormente, las metodologías más usadas hasta la fecha son los microarrays de proteínas y los geles 2D acoplados a espectrometría de masas mediante cribado serológico. Una de las principales razones por las que el trabajo se centró en la búsqueda de biomarcadores relacionados con la respuesta inmune humoral es su utilidad diagnóstica en el caso de patologías cuya detección temprana es imprescindible para el tratamiento correcto del paciente, como es el caso del CCR. La respuesta inmune humoral se induce mucho antes de que aparezcan los síntomas clínicos de los pacientes de CCR, por lo que la detección de los autoanticuerpos generados en etapas tempranas podría suponer un gran avance en la clínica. Además, se ha demostrado que la detección de estos autoanticuerpos es efectiva, fiable y poco invasiva [218, 268, 309-311]. Por otra parte, los anticuerpos son moléculas bastante estables y, hasta la fecha, existen numerosas técnicas para su cribado y detección en muestras de distinto tipo. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares que inducen la generación de autoanticuerpos frente a proteínas propias, se sabe que estas proteínas presentan alteraciones como *splicing* alternativo y mutaciones puntuales, y pueden encontrarse truncadas, sobreactivadas, glicosiladas, sobreexpresadas o sufrir una degradación aberrante [268, 309].

En esta Tesis Doctoral, se empleó una estrategia basada en espectrometría de masas para la búsqueda de autoantígenos. Para ello, y dado que el grupo ya investigó previamente el uso de microarrays de proteínas para identificar estas moléculas, se hizo uso de la metodología SASI de espectrometría de masas modificada sin el paso previo del marcaje SILAC [215]. La combinación de la inmunoprecipitación acoplada a LC-MS/MS permitió la identificación de autoanticuerpos presentes en plasma de pacientes de CCR y sus proteínas diana. La inmunoprecipitación aportó diversas ventajas frente a otros métodos más convencionales. El hecho de emplearse la inmunoprecipitación para aislar las proteínas reactivas en vez de técnicas basadas en inmunodetección en membrana implica la unión de autoantígenos en su conformación 3D en vez de su conformación lineal, por lo que no habría pérdida de autoantígenos que se reconocen por epítopos discontinuos. Este hecho es de especial relevancia ya que está descrito que la respuesta inmune humoral es policlonal, específica de cada paciente y producida en su mayoría frente a epítopos 3D discontinuos que necesitan la estructura secundaria y terciaria de la proteína [144, 216, 218, 268, 309-312] por lo que el uso de técnicas que no permitan la detección de autoantígenos a través de estas características podría producir una incorrecta o escasa identificación de autoantígenos relevantes. Este hecho queda evidenciado en los resultados de esta parte del trabajo gracias a la identificación de p53 como autoantígeno, ya que se ha descrito que presenta epítopos continuos y discontinuos como se ha demostrado previamente mediante ensayos de ELISA, WB y microarrays de proteínas [144, 313, 314]. Otro punto a favor del uso de esta metodología es que no presenta limitaciones en la detección de las proteínas mediante

inmunoprecipitación para su posterior identificación mediante LC-MS/MS ya que se unen a los autoantígenos inmovilizados independientemente de su concentración. Por último, otro dato que se tuvo en cuenta a la hora de desarrollar la metodología fue la elevada heterogeneidad individual de la respuesta inmune humoral de los pacientes de CCR. Por tanto, para obtener resultados mínimamente sesgados, la inmunoprecipitación de las proteínas se llevó a cabo empleando autoanticuerpos provenientes de un *pool* de plasma de pacientes de CCR en estadios III y IV. Además, las proteínas inmunoprecipitadas se compararon con las obtenidas mediante inmunoprecipitación empleando *pools* de sueros de pacientes sanos para eliminar aquellos falsos positivos que aparecían en ambos casos. De esta forma, se identificaron aquellas dianas de autoanticuerpos más significativas y consistentes entre individuos.

Los ensayos de inmunoprecipitación realizados identificaron un total de 31 posibles dianas de autoanticuerpos presentes en menos del 10% de todos los ensayos de inmunoprecipitación descritos utilizando resina de agarosa. Dentro de estas 31 proteínas, 22 de ellas mostraron alteraciones genéticas, a nivel de mRNA o a nivel de proteína en CCR. Además, mediante inmunohistoquímica, se observó que la abundancia de TALDO1 y ERP44 en tejido de CCR podía discriminar entre pacientes metastásicos y no metastásicos, y entre pacientes con y sin recurrencia durante el seguimiento de los pacientes. Estas alteraciones se han descrito como las desencadenantes de la respuesta inmune humoral que tiene como consecuencia la sobreproducción de autoanticuerpos frente a ellas [268]. Hay que destacar, además, que varias de las proteínas identificadas pueden jugar un papel importante en cáncer o han sido anteriormente identificadas como biomarcadores de esta patología.

CHCHD3, CTTNBP2NL y ERP44 son 3 de las proteínas identificadas con un posible papel en la patología. CHCHD3 es una proteína del complejo MICOS, presente en la membrana mitocondrial interna, y juega un papel importante en su estabilidad y en la estabilidad morfológica de la mitocondria [315]. Su desregulación se ha visto implicada en el diagnóstico temprano del cáncer de páncreas [316]. Por otra parte, CTTNBP2NL aparece desregulada en un estudio genético de cáncer de boca [317]. ERP44, proteína que regula la liberación de calcio al retículo endoplasmático, parece verse implicada en la modulación de la migración celular en cáncer de pulmón [318] y, además, su silenciamiento inhibe el crecimiento de células tumorales en cáncer de mama [319].

En cuanto a proteínas que se han identificado anteriormente como marcadores en cáncer a través de la evaluación de su expresión y que se encuentren entre las proteínas de nuestro estudio, se encuentran MGST3, TALDO1, TRIM29 y THSD7A. Sin embargo, no existen estudios que se centren en su papel como dianas de autoanticuerpos y su uso potencial como biomarcadores diagnósticos de esta patología. Únicamente se han descrito con anterioridad autoanticuerpos frente a THSD7A, proteína implicada en la invasión vascular, metástasis y angiogénesis con un papel importante en la reorganización del citoesqueleto de actina [320], y ha sido en el contexto de la predicción del pronóstico y respuesta a tratamiento de la nefropatía membranosa [321]. MGST3 es una proteína antioxidante que reduce glutatión, y se ha definido como biomarcador en cáncer oral [322]. Además, se encuentra altamente sobreexpresada en células tumorales basales de cáncer de mama, lo que la convierte en posible biomarcador del cáncer de mama triple negativo [323]. TALDO1 es una proteína implicada en la regulación de los metabolitos de la vía de las pentosa-fosfato. Esta proteína se identificó previamente mediante estudios de proteómica como potencial biomarcador del cáncer de pulmón de células pequeñas [324]. Además, se ha visto sobreexpresada en cáncer de páncreas, aunque no existe información sobre su posible papel en CCR [325]. Otra de las proteínas asociada a numerosos tipos de cáncer

es TRIM29, encargada de la regulación de la activación de macrófagos frente a infecciones virales y bacterianas en el tracto respiratorio [326, 327]. En el contexto del CCR, se ha visto que su sobreexpresión promueve la proliferación celular, agresividad tumoral y un mal pronóstico de la enfermedad [328]. Por último, de entre las proteínas identificadas en este estudio, únicamente la inmunofilina FKBP4 se ha descrito con anterioridad como antígeno plasmático en CCR [329].

Otro de los objetivos principales del estudio, además de la identificación de proteínas desreguladas en CCR susceptibles de inducir una respuesta inmune humoral, fue el determinar que los autoanticuerpos producidos pudiesen servir como herramienta diagnóstica basada en biopsias líquidas. En este contexto, se buscó que la detección de los autoanticuerpos frente a las proteínas identificadas pudiera servir para la detección de CCR mediante biopsias líquidas (muestra de sangre) con una elevada efectividad y eficiencia empleando pruebas de cribado poblacionales en individuos con un riesgo considerable de desarrollo de CCR (> 50 años). Por tanto, para evaluar el poder diagnóstico de la presencia de los autoanticuerpos en plasma, los autoanticuerpos diana se inmovilizaron covalentemente en esferas magnéticas manteniendo la estructura 3D y los epítomos discontinuos conformacionales; al contrario de lo que ocurre en los ensayos en membrana (*western blot*). La detección de autoanticuerpos frente a las proteínas diana de autoanticuerpos identificadas y seleccionadas dio lugar a una AUC de 99.7% y 88.9% para la detección de pacientes de CCR e individuos premalignos en comparación con los sujetos control, respectivamente. Frente a estos valores, la detección clínica actual de CCR mediante FOBT seguida de colonoscopia produce una AUC del 70% para la detección de pacientes con CCR y 60% para la detección de individuos premalignos. Además, un estudio reciente mostró que la realización de la FOBT junto con la detección simultánea de dos miRNAs producía valores del AUC de 93% y 64% para pacientes de CCR e individuos premalignos [330], muy por encima de los valores obtenidos mediante FOBT y colonoscopia, pero por debajo de los valores obtenidos en este trabajo.

Los resultados de este trabajo indican que para la detección selectiva de CCR sería interesante la inclusión de la detección de estos autoanticuerpos en paneles diagnósticos específicos de la patología. Así, se conseguiría incrementar la sensibilidad y especificidad de la prueba, atendiendo en especial a los individuos premalignos. Además, el desarrollo de paneles diagnósticos basados en pruebas sanguíneas mejoraría mucho la situación actual del diagnóstico de CCR. Si bien es cierto que la colonoscopia permite la detección del cáncer y lesiones premalignas, las FOBT identifican principalmente el cáncer y habitualmente en estadios avanzados. Además, dada su limitada sensibilidad para la detección de adenomas de bajo y alto grado, su utilidad como herramienta diagnóstica temprana es reducida. Además, la FOBT son muy poco específicas, lo que produce un elevado número de falsos positivos y colonoscopias innecesarias. Pese a los resultados prometedores de este estudio, cabe señalar que habría que ampliar la validación de los resultados empleando una muestra más grande de plasmas provenientes de distintas cohortes, incluyendo muestras ciegas y de pacientes con otros tipos de cáncer para reafirmar la especificidad de los resultados al CCR y establecer su utilidad en clínica para el diagnóstico de la patología.

2. Estudio de la respuesta inmune humoral en cáncer como elemento diagnóstico y desarrollo de posibles plataformas diagnósticas trasladables a la clínica

A pesar de que se ha demostrado en el bloque anterior el potencial diagnóstico que presentan los autoanticuerpos en cáncer, es necesario ahondar más en el estudio de la respuesta inmune humoral para asegurar que todos los pacientes susceptibles a desarrollar la patología se

diagnostiquen correctamente y desarrollar herramientas diagnósticas para su uso en clínica que sean atractivas tanto para los pacientes como para los médicos. Una de las formas de profundizar en el conocimiento de la respuesta inmune humoral en individuos es el análisis de la seroreactividad a distintas isoformas de una proteína. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de autoanticuerpos es muy variable entre individuos y los autoantígenos en cáncer suelen tener papeles relevantes en el desarrollo y progreso de la patología. Por tanto, suelen encontrarse bastante reguladas a nivel transcripcional, codificándose múltiples isoformas. En este sentido, podría darse el caso de poseer autoanticuerpos frente a las formas más convencionales de las proteínas, pero no a sus isoformas, y viceversa. Tal y como están enfocados los estudios actuales, si se emplease esta medida como elemento diagnóstico se detectaría únicamente al paciente que posee anticuerpos frente a la forma más común (canónica) de la proteína. Todos estos datos ponen de manifiesto la necesidad de la detección múltiple de autoanticuerpos con el fin de identificar a todos los posibles pacientes y el desarrollo de metodologías que permitan su multiplexado para que sean rentables y trasladables al entorno sanitario.

Estudio de la seroreactividad diferencial a isoformas de p73

La familia de proteínas de p53, involucrada en la diferenciación celular, proliferación y muerte celular, se encuentra extensamente regulada a nivel transcripcional [90, 332-334]. Sin embargo, hasta la fecha, el único estudio centrado en la evaluación de las isoformas como elemento diagnóstico se basa en el análisis de los epítomos lineales de diversas isoformas de p53, p63 y p73 en la enfermedad de liquen plano oral [335, 336]. En este estudio, se vio que dos de los pacientes eran reactivos a las isoformas de p63, siendo uno de ellos reactivo también a p73. Además, esta reactividad se correlacionó con peores lesiones. Sin embargo, el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral es el primero en evaluar la seroreactividad a diferentes isoformas de p73 en el contexto del CCR o cáncer en general. Para ello, se evaluó la seroreactividad diferencial de las isoformas $\Delta Np73\alpha$ y $\Delta Np73\beta$ en muestras de pacientes de CCR, individuos premalignos y pacientes sanos, cuya sobreexpresión se ha observado en CCR [90, 102], y se comparó con la seroreactividad frente a la forma canónica de p73.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la respuesta inmune humoral frente al cáncer es una respuesta policlonal que reconoce epítomos lineales y/o conformacionales (continuos o discontinuos, respectivamente) dentro de una misma proteína [218, 310-312, 337], siendo la mayoría de estos epítomos discontinuos y dependientes de la conformación de la proteína y su estructura secundaria y terciaria [216]. Por tanto, como las isoformas evaluadas en este trabajo y p73 poseen una secuencia distinta de aminoácidos (estructura primaria) en su N- y C-terminal, ésta daría lugar a diferencias en las estructuras secundaria y terciaria de la proteína. Este hecho se evidenció mediante el modelado 3D de las proteínas que, además, produjo una superficie de potencial electrostático distinto entre las isoformas y la proteína canónica. Por otra parte, el N-terminal y C-terminal de las isoformas se encuentran expuestos en la superficie de la proteína, produciendo cambios importantes en el plegamiento proteico y potencial electrostático. Este dato es relevante dado que estos extremos suelen ser las regiones más inmunogénicas que, en el caso de $\Delta Np73\alpha$ y $\Delta Np73\beta$ pueden implicar un mayor reconocimiento inmune. Para p73, sin embargo, se ha descrito mediante ensayos de *western blot* que los pacientes con cáncer no inducen una respuesta inmune frente al N-terminal de la molécula [338].

Para evaluar la correcta seroreactividad a las isoformas de las proteínas p73, se siguió un esquema de trabajo basado en la expresión de las proteínas utilizando sistemas de expresión *in vitro* fusionadas a GST para obtener el correcto plegamiento y funcionalidad de la proteína. La producción se hizo *in situ* para evitar problemas de degradación y almacenamiento. Las proteínas se inmovilizaron en placas a través del GST, de forma que mantenían su correcta orientación y estructura para el reconocimiento de las IgGs. Mediante esta metodología, se pudo observar una seroreactividad específica de CCR hacia las proteoformas de Δ Np73 en comparación con la observada para la proteína canónica. Además, dado que algunos pacientes mostraban únicamente seroreactividad frente a Δ Np73 α , se pudo valorar la importancia del extremo N-terminal en este reconocimiento antigénico, ya que es la región estructuralmente diferente entre ambas proteínas. Por último, a la hora de evaluar el potencial diagnóstico de las isoformas y p73, se observó que la seroreactividad a Δ Np73 α era mayor que la seroreactividad frente a p73 o Δ Np73 β . Esta seroreactividad específica mejoró la capacidad diagnóstica de p73 a la hora de discriminar entre pacientes con CCR e individuos premalignos de los individuos control. Además, la presencia de los autoanticuerpos era mayor en los individuos premalignos que en los pacientes de CCR, lo que sugiere que la seroreactividad específica a Δ Np73 α se podría utilizar para el diagnóstico temprano del CCR. Al medir los niveles de CEA en las muestras, se vio que la seroreactividad frente a Δ Np73 era más sensible y específica a la hora de predecir las lesiones premalignas. Por tanto, este trabajo recalca la importancia de evaluar la inclusión de las isoformas de las proteínas de la familia p53 como biomarcadores de la patología y sería interesante profundizar en el estudio de las isoformas no evaluadas en este trabajo. Además, sería necesario validar los datos empleando muestras de pacientes más amplias y con otras patologías, para evaluar si los autoanticuerpos frente a p73 y sus isoformas son específicos de CCR o (como es el caso de p53) son específicos de la presencia de un proceso tumoral en estadios tempranos.

Relación entre la posible seroreactividad inducida por PTPRN y su efecto en las propiedades tumorogénicas de células de cáncer colorrectal

La identificación de proteínas desreguladas en CCR mediante técnicas proteómicas y la validación de sus resultados puso de manifiesto una posible relación entre la inducción de la seroreactividad por los autoantígenos en pacientes y el papel de dichas moléculas en el proceso tumoral. Por ello, decidimos evaluar el efecto de PTPRN (proteína perteneciente a las fosfotirosín-fosfatasa) en la seroreactividad de pacientes con cáncer colorrectal y en las propiedades tumorogénicas de células de CCR. En cáncer, existe una importante desregulación en la activación e inactivación de diferentes vías de señalización. Las proteínas tirosín-quinasa son una de las familias de proteínas que más se han estudiado en el contexto del cáncer, existiendo numerosos estudios centrados en su posible papel como diana terapéutica. Sin embargo, el papel que juegan las proteínas fosfotirosín-fosfatasa, entre las que se encuentra PTPRN, en el desarrollo y evolución de la patología no está del todo claro pese a que son inactivadores de la señalización celular [331]. Los receptores PTPR se encargan de fosforilar los residuos de tirosina, regulando así distintos procesos fisiológicos relevantes en el desarrollo del cáncer como puede ser la proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular. Por tanto, para mantener esta homeostasis celular y no dar lugar al desarrollo patológico tienen que encontrarse altamente reguladas. Alguno de los receptores fosfotirosín-fosfatasa se encuentran desregulados en cáncer [104] y se han descrito numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas para los PTPR. En el caso de PTPRN, se han descrito amplificaciones, deleciones y mutaciones

[331]. Además, se han descrito autoanticuerpos frente a PTPRN en pacientes con diabetes tipo 1, sirviendo como marcador de la patología. Por último, cabe destacar que, en esta Tesis Doctoral, uno de estos receptores (PTPRF) se encontró desregulado debido a la sobreexpresión de $\Delta Np73$.

En este trabajo, se ha evaluado la implicación de PTPRN en CCR mediante estudios de seroreactividad y mediante ensayos funcionales de silenciamiento transitorio en células de CCR. Mediante los estudios de seroreactividad, se vio que la presencia de autoanticuerpos frente a PTPRN y su dominio extracelular en pacientes con CCR y CCR y diabetes tipo 2 podía diferenciar con elevada sensibilidad y especificidad a este grupo de los sujetos control. Además, la detección de autoanticuerpos frente a PTPRN también permitió identificar a pacientes con diabetes tipo 2 y CCR de paciente únicamente con diabetes. Estos datos sugieren que la presencia de estos autoanticuerpos se podría utilizar para identificar pacientes con CCR o pacientes con diabetes tipo 2 susceptibles a desarrollar CCR, si bien es cierto que habría que ampliar las muestras para poder afirmar con rotundidad que la presencia de autoanticuerpos frente a ella (o sus dominios) tiene utilidad diagnóstica. Los estudios *in vitro* mostraron que PTPRN influye sobre las propiedades tumorigénicas de las líneas celulares KM12C y KM12SM de CCR. En el caso de las líneas celulares de CCR, se observó que su silenciamiento producía una disminución en la proliferación, invasión y migración de las células, siendo más evidente en las células metastásicas KM12SM, que poseen mayores niveles de PTPRN.

En conjunto, los datos indican que PTPRN juega un papel importante en el desarrollo de las propiedades tumorigénicas de las células de CCR y que la detección de sus autoanticuerpos podría ser especialmente útil a la hora de distinguir a los pacientes diabéticos que tienen riesgo de padecer (o que padezcan) CCR. Por último, hay que mencionar que para ampliar los resultados y obtener una mejor comprensión del papel de PTPRN en cáncer, se debería llevar a cabo un silenciamiento estable. De esta forma, se podría evaluar si PTPRN tiene efecto en las líneas analizadas a tiempos mayores. Además, permitiría realizar estudios *in vitro* e *in vivo* que requieren un mayor tiempo como el estudio de la formación de colonias o crecimiento de tumores *in vivo* en ratones.

Desarrollo de un sensor electroquímico para la determinación de autoanticuerpos

El uso de distintas técnicas (ELISA, SEREX, SERPA y otras técnicas proteómicas) ha permitido la identificación de numerosos autoantígenos en cáncer [153, 174, 256, 311, 339, 340]. Sin embargo, las características de estas metodologías no son las ideales para la validación de los datos o para su uso en la clínica ya que se requieren volúmenes grandes de muestras biológicas (normalmente difíciles de conseguir), son costosas y de larga duración cuando se trata de detectar numerosas moléculas de manera simultánea o requieren una maquinaria y equipo de trabajo muy especializado. Por tanto, uno de los principales retos del uso de autoanticuerpos como elemento diagnóstico es su implementación en la clínica. Así, para poder establecer nuevas técnicas de diagnóstico, es necesario que dichas pruebas mejoren en sensibilidad y especificidad o, al menos, aporten comodidad al paciente y al clínico frente a las técnicas ya establecidas. En este sentido, y en el contexto del CCR, los biosensores electroquímicos permitirían implementar la detección de autoanticuerpos en la clínica aportando diferentes ventajas frente a las ya establecidas para FOBT y colonoscopia.

Con este objetivo, y dado que p53 es considerado el autoantígeno en cáncer por excelencia, se desarrolló como prueba de concepto de la validez de esta aproximación un inmunosensor capaz de detectar la presencia de autoanticuerpos frente a la proteína y se comparó su rendimiento al de un ELISA comercial. Para el desarrollo del inmunosensor se empleó la tecnología HaloTag, que permitió el anclaje covalente de los antígenos expresados *in vitro* mediante extractos de células de mamífero como proteínas de fusión a esferas magnéticas que posteriormente se sitúan sobre electrodos desechables. En comparación con los datos obtenidos mediante el ELISA comercial, el biosensor aportó una determinación más sensible y mejor discriminación de pacientes seroreactivos a p53 y no seroreactivos a p53 a un menor coste y en menor tiempo. Además, se eliminó el uso de proteínas purificadas, y se sustituyó por el uso de sistemas de expresión libre de células que permiten su inmovilización en el momento de su expresión para llevar a cabo el inmunoensayo.

Determinación de autoanticuerpos frente a autoantígenos difíciles de expresar específicos de CCR empleando sistemas de expresión in vitro y sensores electroquímicos multiplexados

En base a los resultados que se obtuvieron para el sensor electroquímico desarrollado en el apartado anterior, en este trabajo se optimizó un protocolo para la expresión *in vitro* múltiple de proteínas diana de autoanticuerpos acopladas a HaloTag que permiten su inmovilización en esferas magnéticas y el desarrollo de una plataforma electroquímica con capacidad de multiplexado que podría servir como herramienta diagnóstica en clínica hospitalaria.

Como se ha comentado en el apartado anterior, la expresión proteica *in vitro* empleando extractos de células de mamífero confiere numerosas ventajas frente a los sistemas de expresión más comunes como las bacterias y levaduras. Estudios previos han demostrado que algunos autoantígenos de CCR presentan problemas en su expresión y purificación por lo que no se ha podido desarrollar una metodología propicia para el diagnóstico de la patología [153-155, 218, 219]. Sin embargo, el uso de la metodología descrita para el desarrollo del sensor capaz de detectar autoanticuerpos frente a p53 se empleó para la obtención de autoantígenos previamente descritos y algunos de ellos descartados por su dificultad de expresión o por degradación extensiva con un correcto plegamiento y sin degradación empleando menos tiempo que las técnicas convencionales. A través de la unión de las proteínas a las esferas magnéticas mediante el HaloTag, éstas se unieron covalentemente *in situ* de forma que no hubiese problemas de degradación asociada a su almacenaje, evitándose así que el reconocimiento antigénico se viese afectado por la degradación o por la pérdida de epítomos consecuencia de la degradación. Por último, el protocolo descrito es mucho más simple y corto que los protocolos convencionales para la obtención y purificación de autoantígenos en bacteria, insecto o células de mamífero. Estos protocolos suelen requerir semanas o meses y, en ocasiones, es imposible producir proteínas difíciles de expresar o purificar; además, se suelen obtener una mayor cantidad de falsos positivos debido a la presencia de contaminantes bacterianos.

En este trabajo, se ha demostrado que la detección simultánea de los autoanticuerpos frente a GTF2B, MAPKAPK3, p53, PIM1, PKN1, SRC, STK4 y SULF1 podía discriminar entre individuos control y pacientes de CCR y premalignos con un AUC muy superior a la establecida para el CEA (90% frente a 80%), diferencia aún más notable a la hora de comparar los individuos control con los individuos premalignos (91% frente a 57%). Además, se demostró que este panel era específico de CCR ya que no era capaz de identificar a pacientes con cáncer de mama y pulmón.

Estas características convierten a esta firma diagnóstica en ideal para su uso en clínica. Por tanto, en el trabajo se utilizó para trasladar la firma diagnóstica al sensor electroquímico descrito para la detección de autoanticuerpos frente a p53 debido a su capacidad de multiplexado que permite la detección simultánea de numerosas moléculas [220]. En el caso del CCR, sería ideal para su diagnóstico ya que se podría detectar la presencia (en este caso) de 8 autoanticuerpos empleando un volumen mínimo de plasma. La detección múltiple de los autoanticuerpos es necesaria frente a la detección individual de ellos ya que aumenta la especificidad y sensibilidad del diagnóstico de la enfermedad y, además, permite discriminar pacientes de CCR de otros tipos de pacientes con cáncer. Empleando esta metodología, la detección de los autoanticuerpos tras su inmovilización en las esferas tarda 3.5 horas, reduciéndose ampliamente el tiempo de ensayo de las técnicas más convencionales como ELISA y Luminex. Además, es una técnica mucho menos costosa y más simple.

Finalmente, hay que destacar que esta firma diagnóstica podría mejorarse y es en lo que se quiere seguir trabajando mediante la inclusión de los distintos autoantígenos identificados en esta Tesis Doctoral, con el fin de lograr una plataforma diagnóstica para el CCR basada en la respuesta humoral.

En conjunto, en esta Tesis Doctoral, el uso de diversas técnicas proteómicas ha permitido la identificación de posibles efectores mediados por $\Delta Np73$ que podrían jugar un papel importante en el desarrollo de CCR. En este contexto, se ha relacionado EMAP-II y BDNF con la vasculogénesis y linfangiogénesis. Además, se ha visto que la detección de BDNF permite discriminar entre individuos premalignos y pacientes de CCR de individuos sanos con un gran potencial, por lo que podría evaluarse su inclusión en paneles diagnósticos. Por otra parte, mediante inmunoprecipitación acoplada a LC-MS/MS se han identificado proteínas diana de autoanticuerpos con elevada relevancia en el proceso tumoral, ampliándose así el inmunoma asociado al CCR. Se ha visto también que la detección de parte de estos autoanticuerpos mejora considerablemente la discriminación entre pacientes de CCR e individuos premalignos frente a individuos sanos, tal y como pasa con BDNF, por lo que su inclusión en paneles diagnósticos también sería de gran interés. Por último, para ahondar en el diagnóstico de CCR, se ha estudiado la respuesta inmune humoral a distintas isoformas de la proteína canónica de p73 y de proteínas relacionadas con cáncer menos estudiadas (receptores fosfotirosín-fosfatasa). Por último, se ha desarrollado un sensor electroquímico con capacidad de multiplexado para la detección de una firma de autoanticuerpos frente a autoantígenos fáciles y difíciles de expresar y que podría trasladarse a rutina clínica hospitalaria.

CONCLUSIONES

Bloque 1. Identificación y validación funcional de biomarcadores en cáncer colorrectal mediante técnicas proteómicas.

Artículo 1

In-depth Proteomics Characterization of Δ Np73 Effectors Identifies Key Proteins with Diagnostic Potential Implicated in Lymphangiogenesis, Vasculogenesis and Metastasis in Colorectal Cancer.

- La combinación de técnicas proteómicas basadas en MS/MS y microarrays de proteínas ha permitido identificar efectores de Δ Np73 en CCR y relacionarlos con procesos de linfangiogénesis y vasculogénesis.
- Uno de los biomarcadores identificados, BDNF, mostró una elevada capacidad de discriminar entre pacientes de CCR e individuos con lesiones premalignas colorrectales de individuos control.

Artículo 2

Identification of tumor-associated antigens with diagnostic ability of colorectal cancer by in-depth immunomic and seroproteomic analysis.

- La inmunoprecipitación de proteínas diana de autoanticuerpos presentes en plasma de pacientes con CCR acoplada a LC-MS/MS permitió identificar antígenos no descritos previamente como dianas de autoanticuerpos en CCR.
- Mediante inmunohistoquímica, ERP44 y TALDO1 permiten distinguir entre pacientes metastásicos y no metastásicos, y entre pacientes de CCR en estadio II en función del tiempo de recurrencia.
- Se ha descrito una firma de autoanticuerpos capaz de distinguir pacientes de CCR e individuos premalignos de sujetos control con una elevada sensibilidad y especificidad.

Bloque 2. Estudio de la respuesta inmune humoral en cáncer colorrectal como elemento diagnóstico y validación de posibles plataformas diagnósticas.

Artículo 3

The specific seroreactivity to Δ Np73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein.

- Se ha descrito la existencia de una seroreactividad diferencial entre las isoformas Δ Np73 α , Δ Np73 β y p73.
- Se ha observado un grupo de pacientes que tienen seroreactividad selectiva a Δ Np73 α .
- La isoforma Δ Np73 α discrimina mejor a pacientes de CCR e individuos premalignos de los sujetos control que la forma canónica de p73.

Artículo 4

The Humoral Immune Response to PTPRN links Type 2 Diabetes Patients with Colorectal Cancer and Identifies a Potential Therapeutic Target of Colorectal Cancer

- Se ha evaluado la seroreactividad a PTPRN y sus dominios utilizando plasma de pacientes de CCR, pacientes de CCR y diabetes, e individuos sanos. Se observaron diferencias significativas en los pacientes de CCR y pacientes con CCR y diabetes.
- Los autoanticuerpos frente a PTPRN permiten identificar individuos con diabetes tipo 2 susceptibles a desarrollar o padecer CCR.
- Los ensayos de silenciamiento *in vitro* mostraron la importancia de PTPRN en las propiedades tumorigénicas de las líneas celulares de cáncer de colon.

Artículo 5

Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatforms.

- Se ha desarrollado un sensor electroquímico basado en la modificación covalente de esferas magnéticas para su unión a proteínas expresadas *in situ* e *in vitro* fusionadas a HaloTag que permite la identificación de autoanticuerpos frente a p53 en plasma de pacientes.
- La detección de autoanticuerpos frente a p53 mediante el sensor desarrollado es más sensible y de menor coste que las medidas mediante ELISA comercial, requiriéndose además un menor tiempo de ensayo y volumen de muestra.

Artículo 6

Multiplexed monitoring of a novel autoantibody diagnostic signature of colorectal cancer using HaloTag technology-based electrochemical immunosensing platform.

- La expresión *in vitro* utilizando extractos de líneas celulares de mamíferos ha permitido la obtención de autoantígenos previamente descartados para su análisis por su dificultad de expresión y purificación.
- En el contexto del cáncer colorrectal, los ensayos de luminiscencia han puesto de manifiesto el alto poder diagnóstico que posee la detección de autoanticuerpos frente a dichos autoantígenos (PIM1, PKN1, SRC y SULF1) en combinación con autoanticuerpos frente a autoantígenos fáciles de expresar y previamente descritos (GTF2B, MAPKAPK3, p53 y STK4).
- La detección de los autoanticuerpos mediante el sensor electroquímico multiplexado para los 8 autoantígenos fue capaz de distinguir con precisión entre los individuos con cáncer de colon de aquellos individuos sanos o con otros tipos de cáncer.
- Ambas metodologías podrían ser utilizadas para su traslado a rutina clínica hospitalaria.

REFERENCIAS

1. Mortality, G.B.D. and C. Causes of Death, *Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2015. **385**(9963): p. 117-71.
2. Bradley, C.J., C.W. Given, and C. Roberts, *Disparities in cancer diagnosis and survival*. Cancer, 2001. **91**(1): p. 178-88.
3. Dekker, E., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2019. **394**(10207): p. 1467-1480.
4. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
5. Arnold, M., et al., *Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality*. Gut, 2017. **66**(4): p. 683-691.
6. Society, A.C. *Survival Rates for Colorectal Cancer*. 2020 [cited 2020 February 18, 2020]; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
7. Sonnenschein, C. and A.M. Soto, *The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique*. J Biosci, 2013. **38**(3): p. 651-63.
8. Medema, J.P., *Cancer stem cells: the challenges ahead*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(4): p. 338-44.
9. Nassar, D. and C. Blanpain, *Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 47-76.
10. Health, N.I.O. *Advances in Colorectal Cancer Research*. 2015; Available from: <https://www.nih.gov/research-training/advances-colorectal-cancer-research>.
11. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
12. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
13. Syngal, S., et al., *ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes*. Am J Gastroenterol, 2015. **110**(2): p. 223-62; quiz 263.
14. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(4): p. 261-8.
15. Lynch, P.M., et al., *A follow-up study of colonic epithelial proliferation as a biomarker in a Native-American family with hereditary nonpolyposis colon cancer*. J Natl Cancer Inst, 1991. **83**(13): p. 951-4.
16. Vasen, H.F., et al., *The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)*. Dis Colon Rectum, 1991. **34**(5): p. 424-5.
17. Woerner, S.M., et al., *Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas*. Oncogene, 2005. **24**(15): p. 2525-35.
18. Schoen, R.E., et al., *Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer*. Gastroenterology, 2015. **149**(6): p. 1438-1445 e1.
19. Cottet, V., et al., *Colonoscopic screening of first-degree relatives of patients with large adenomas: increased risk of colorectal tumors*. Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1086-92.
20. Rex, D.K., et al., *American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(3): p. 739-50.
21. Burt, R.W., et al., *NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening*. J Natl Compr Canc Netw, 2010. **8**(1): p. 8-61.
22. Bingham, S.A., 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): p. 1496-501.

23. Chan, A.T. and E.L. Giovannucci, *Primary prevention of colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2029-2043 e10.
24. Botteri, E., et al., *Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis*. *JAMA*, 2008. **300**(23): p. 2765-78.
25. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. *N Engl J Med*, 1988. **319**(9): p. 525-32.
26. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. *Nature*, 1998. **396**(6712): p. 643-9.
27. Grady, W.M., *Genomic instability and colon cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2004. **23**(1-2): p. 11-27.
28. Grady, W.M. and J.M. Carethers, *Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(4): p. 1079-99.
29. Gollin, S.M., *Mechanisms leading to chromosomal instability*. *Semin Cancer Biol*, 2005. **15**(1): p. 33-42.
30. Staton, C.A., et al., *The angiogenic switch occurs at the adenoma stage of the adenoma carcinoma sequence in colorectal cancer*. *Gut*, 2007. **56**(10): p. 1426-32.
31. Worthley, D.L., et al., *Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(28): p. 3784-91.
32. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. *Cell*, 1991. **66**(3): p. 589-600.
33. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(7): p. 489-501.
34. Esteller, M., et al., *Cancer epigenetics and methylation*. *Science*, 2002. **297**(5588): p. 1807-8; discussion 1807-8.
35. Ferracin, M., et al., *The methylator phenotype in microsatellite stable colorectal cancers is characterized by a distinct gene expression profile*. *J Pathol*, 2008. **214**(5): p. 594-602.
36. van Rijnsoever, M., et al., *Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands*. *Gut*, 2002. **51**(6): p. 797-802.
37. Weisenberger, D.J., et al., *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. *Nat Genet*, 2006. **38**(7): p. 787-93.
38. Fijten, G.H., et al., *Predictive value of signs and symptoms for colorectal cancer in patients with rectal bleeding in general practice*. *Fam Pract*, 1995. **12**(3): p. 279-86.
39. Hubbard, R.A., et al., *The cumulative risk of false-positive fecal occult blood test after 10 years of colorectal cancer screening*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(9): p. 1612-9.
40. Whitlock, E.P., et al., *Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force*. *Ann Intern Med*, 2008. **149**(9): p. 638-58.
41. Corley, D.A., T.R. Levin, and C.A. Doubeni, *Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(26): p. 2541.
42. Shaukat, A., et al., *Longer Withdrawal Time Is Associated With a Reduced Incidence of Interval Cancer After Screening Colonoscopy*. *Gastroenterology*, 2015. **149**(4): p. 952-7.
43. Kaminski, M.F., et al., *Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(19): p. 1795-803.
44. Labianca, R., et al., *Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2013. **24 Suppl 6**: p. vi64-72.
45. Macdonald, J.S., *Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons*. *Semin Oncol*, 1999. **26**(5): p. 556-60.
46. Duffy, M.J., et al., *Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use*. *Eur J Cancer*, 2007. **43**(9): p. 1348-60.

47. Wolpin, B.M. and R.J. Mayer, *Systemic treatment of colorectal cancer*. Gastroenterology, 2008. **134**(5): p. 1296-310.
48. Shaw, A., et al., *Tumour biomarkers: diagnostic, prognostic, and predictive*. BMJ, 2015. **351**: p. h3449.
49. Sideris, M. and S. Papagrigoriadis, *Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer*. Anticancer Res, 2014. **34**(5): p. 2061-8.
50. Stamey, T.A., et al., *Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate*. N Engl J Med, 1987. **317**(15): p. 909-16.
51. Bast, R.C., Jr., et al., *Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma*. J Clin Invest, 1981. **68**(5): p. 1331-7.
52. Bruix, J. and M. Sherman, *Management of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1208-36.
53. Sturgeon, C.M., et al., *National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers*. Clin Chem, 2008. **54**(12): p. e11-79.
54. Locker, G.Y., et al., *ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(33): p. 5313-27.
55. Watanabe, T., et al., *Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer*. N Engl J Med, 2001. **344**(16): p. 1196-206.
56. Aoki, K. and M.M. Taketo, *Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 19): p. 3327-35.
57. Kroboth, K., et al., *Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(3): p. 910-8.
58. Kita, K., et al., *Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(5): p. 2331-45.
59. Sotillo, R., et al., *Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice*. Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 9-23.
60. Weaver, B.A., et al., *Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor*. Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 25-36.
61. Dikovskaya, D., et al., *Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 183-95.
62. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 761, 763.
63. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
64. Hadjihannas, M.V., et al., *Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10747-52.
65. Mercer, W.E., et al., *Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6166-70.
66. Michalovitz, D., O. Halevy, and M. Oren, *Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53*. Cell, 1990. **62**(4): p. 671-80.
67. Baker, S.J., et al., *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53*. Science, 1990. **249**(4971): p. 912-5.
68. Diller, L., et al., *p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(11): p. 5772-81.
69. Yonish-Rouach, E., et al., *Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6*. Nature, 1991. **352**(6333): p. 345-7.
70. Shaw, P., et al., *Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4495-9.

71. Wang, Y., et al., *Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs*. *Oncogene*, 1998. **17**(15): p. 1923-30.
72. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. *Cell*, 1997. **88**(5): p. 593-602.
73. Ventura, A., et al., *Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo*. *Nature*, 2007. **445**(7128): p. 661-5.
74. Leslie, A., et al., *The colorectal adenoma-carcinoma sequence*. *Br J Surg*, 2002. **89**(7): p. 845-60.
75. Iacopetta, B., et al., *Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study*. *Ann Oncol*, 2006. **17**(5): p. 842-7.
76. Lima, J.M., et al., *[Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer]*. *Arq Gastroenterol*, 2006. **43**(1): p. 8-13.
77. Mammano, E., et al., *Association of p53 polymorphisms and colorectal cancer: modulation of risk and progression*. *Eur J Surg Oncol*, 2009. **35**(4): p. 415-9.
78. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. *Nature*, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
79. Yang, A. and F. McKeon, *P63 and P73: P53 mimics, menaces and more*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(3): p. 199-207.
80. De Laurenzi, V. and G. Melino, *Evolution of functions within the p53/p63/p73 family*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **926**: p. 90-100.
81. Marcel, V. and P. Hainaut, *p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity?* *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(3): p. 391-406.
82. Murray-Zmijewski, F., D.P. Lane, and J.C. Bourdon, *p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(6): p. 962-72.
83. Collavin, L., A. Lunardi, and G. Del Sal, *p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression*. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(6): p. 901-11.
84. Hainaut, P., et al., *Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(1): p. 151-7.
85. Donehower, L.A. and G. Lozano, *20 years studying p53 functions in genetically engineered mice*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(11): p. 831-41.
86. Deyoung, M.P. and L.W. Ellisen, *p63 and p73 in human cancer: defining the network*. *Oncogene*, 2007. **26**(36): p. 5169-83.
87. Gressner, O., et al., *TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria*. *EMBO J*, 2005. **24**(13): p. 2458-71.
88. Guo, X., et al., *TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(12): p. 1451-7.
89. Lin, Y.L., et al., *p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair*. *PLoS Genet*, 2009. **5**(10): p. e1000680.
90. Rodriguez, N., et al., *Clinical implications of the deregulated TP73 isoforms expression in cancer*. *Clin Transl Oncol*, 2018. **20**(7): p. 827-836.
91. Jost, C.A., M.C. Marin, and W.G. Kaelin, Jr., *p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis*. *Nature*, 1997. **389**(6647): p. 191-4.
92. Pozniak, C.D., et al., *An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death*. *Science*, 2000. **289**(5477): p. 304-6.
93. Petrenko, O., A. Zaika, and U.M. Moll, *deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(16): p. 5540-55.
94. Castellino, R.C., et al., *Overexpressed TP73 induces apoptosis in medulloblastoma*. *BMC Cancer*, 2007. **7**: p. 127.

95. Amelio, I., et al., *TAp73 opposes tumor angiogenesis by promoting hypoxia-inducible factor 1alpha degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(1): p. 226-31.
96. Soldevilla, B., et al., *Prognostic impact of DeltaTAp73 isoform levels and their target genes in colon cancer patients*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(18): p. 6029-39.
97. Casciano, I., et al., *Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients*. Cell Death Differ, 2002. **9**(3): p. 246-51.
98. Schuster, A., et al., *DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria*. Cell Cycle, 2010. **9**(13): p. 2629-39.
99. Uramoto, H., et al., *Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6905-11.
100. Vilgelm, A.E., et al., *Characterization of DeltaNp73 expression and regulation in gastric and esophageal tumors*. Oncogene, 2010. **29**(43): p. 5861-8.
101. Dominguez, G., et al., *DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1*. J Clin Oncol, 2006. **24**(5): p. 805-15.
102. Rodriguez-Salas, N., et al., *Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **109**: p. 9-19.
103. Nikolaenko, R.M., B. Agyekum, and S. Bouyain, *Receptor protein tyrosine phosphatases and cancer: new insights from structural biology*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(4): p. 356-64.
104. Julien, S.G., et al., *Inside the human cancer tyrosine phosphatome*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 35-49.
105. Alonso, A., et al., *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. Cell, 2004. **117**(6): p. 699-711.
106. Johnson, K.G. and D. Van Vactor, *Receptor protein tyrosine phosphatases in nervous system development*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 1-24.
107. Hendriks, W.J., et al., *Protein tyrosine phosphatases: functional inferences from mouse models and human diseases*. FEBS J, 2008. **275**(5): p. 816-30.
108. Stoker, A., *Methods for identifying extracellular ligands of RPTPs*. Methods, 2005. **35**(1): p. 80-9.
109. Acevedo-Calado, M.J., et al., *Autoantibodies Directed Toward a Novel IA-2 Variant Protein Enhance Prediction of Type 1 Diabetes*. Diabetes, 2019. **68**(9): p. 1819-1829.
110. Mulukutla, S.N., et al., *Autoantibodies to the IA-2 Extracellular Domain Refine the Definition of "A+" Subtypes of Ketosis-Prone Diabetes*. Diabetes Care, 2018. **41**(12): p. 2637-2640.
111. Zhangyuan, G., et al., *Prognostic Value of Phosphotyrosine Phosphatases in Hepatocellular Carcinoma*. Cell Physiol Biochem, 2018. **46**(6): p. 2335-2346.
112. Shergalis, A., et al., *Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma*. Pharmacol Rev, 2018. **70**(3): p. 412-445.
113. Bauerschlag, D.O., et al., *Progression-free survival in ovarian cancer is reflected in epigenetic DNA methylation profiles*. Oncology, 2011. **80**(1-2): p. 12-20.
114. Yin, W., et al., *Expression Profile Analysis Identifies a Novel Five-Gene Signature to Improve Prognosis Prediction of Glioblastoma*. Front Genet, 2019. **10**: p. 419.
115. Notkins, A.L., M.S. Lan, and R.D. Leslie, *IA-2 and IA-2beta: the immune response in IDDM*. Diabetes Metab Rev, 1998. **14**(1): p. 85-93.
116. Xu, H., et al., *Small cell lung cancer growth is inhibited by miR-342 through its effect of the target gene IA-2*. J Transl Med, 2016. **14**(1): p. 278.
117. Jacobsen, L.M., M.J. Haller, and D.A. Schatz, *Understanding Pre-Type 1 Diabetes: The Key to Prevention*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 70.
118. Lan, M.S., et al., *Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma*. DNA Cell Biol, 1994. **13**(5): p. 505-14.

119. Arvan, P., et al., *Islet autoantigens: structure, function, localization, and regulation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
120. Achenbach, P., et al., *Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics*. Diabetes, 2004. **53**(2): p. 384-92.
121. Steck, A.K., et al., *Predictors of Progression From the Appearance of Islet Autoantibodies to Early Childhood Diabetes: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY)*. Diabetes Care, 2015. **38**(5): p. 808-13.
122. Acevedo-Calado, M., et al., *Identification of Unique Antigenic Determinants in the Amino Terminus of IA-2 (ICA512) in Childhood and Adult Autoimmune Diabetes: New Biomarker Development*. Diabetes Care, 2017. **40**(4): p. 561-568.
123. Kawasaki, E., et al., *Evaluation of islet cell antigen (ICA) 512/IA-2 autoantibody radioassays using overlapping ICA512/IA-2 constructs*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 375-80.
124. Soltani, G., et al., *Obesity, diabetes and the risk of colorectal adenoma and cancer*. BMC Endocr Disord, 2019. **19**(1): p. 113.
125. Chubak, J., et al., *Risk of colon cancer recurrence in relation to diabetes*. Cancer Causes Control, 2018. **29**(11): p. 1093-1103.
126. Morikawa, T., et al., *Association of CTNNB1 (beta-catenin) alterations, body mass index, and physical activity with survival in patients with colorectal cancer*. JAMA, 2011. **305**(16): p. 1685-94.
127. Karlin, N.J., et al., *Survival and glycemic control in patients with colorectal cancer and diabetes mellitus*. Future Sci OA, 2018. **4**(9): p. FSO335.
128. He, J., et al., *The association of diabetes with colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort*. Br J Cancer, 2010. **103**(1): p. 120-6.
129. Restifo, D., et al., *Differential relationship between colorectal cancer and diabetes in a nationally representative sample of adults*. J Diabetes Complications, 2018. **32**(9): p. 819-823.
130. Overbeek, J.A., et al., *Sex- and site-specific differences in colorectal cancer risk among people with type 2 diabetes*. Int J Colorectal Dis, 2019. **34**(2): p. 269-276.
131. Chapman, C., et al., *Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis*. Ann Oncol, 2007. **18**(5): p. 868-73.
132. Chapman, C.J., et al., *Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure*. Thorax, 2008. **63**(3): p. 228-33.
133. Soussi, T., *p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1777-88.
134. Chen, Y., et al., *Autoantibodies to Ca²⁺ binding protein Calnuc is a potential marker in colon cancer detection*. Int J Oncol, 2007. **30**(5): p. 1137-44.
135. Chen, Y.T., et al., *A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1914-8.
136. Schubert, U., et al., *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 770-4.
137. Ulanet, D.B., et al., *Unique conformation of cancer autoantigen B23 in hepatoma: a mechanism for specificity in the autoimmune response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12361-6.
138. von Mensdorff-Pouilly, S., et al., *Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides*. Int J Cancer, 2000. **86**(5): p. 702-12.
139. Reipert, B.M., et al., *Increase in autoantibodies against Fas (CD95) during carcinogenesis in the human colon: a hope for the immunoprevention of cancer?* Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(10): p. 1038-42.

140. Scanlan, M.J., et al., *Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets*. *Cancer Res*, 2002. **62**(14): p. 4041-7.
141. Katayama, H., et al., *An Autoimmune Response Signature Associated with the Development of Triple-Negative Breast Cancer Reflects Disease Pathogenesis*. *Cancer Res*, 2015. **75**(16): p. 3246-54.
142. Ladd, J.J., et al., *Autoantibody signatures involving glycolysis and spliceosome proteins precede a diagnosis of breast cancer among postmenopausal women*. *Cancer Res*, 2013. **73**(5): p. 1502-13.
143. Macdonald, I.K., C.B. Parsy-Kowalska, and C.J. Chapman, *Autoantibodies: Opportunities for Early Cancer Detection*. *Trends Cancer*, 2017. **3**(3): p. 198-213.
144. Katchman, B.A., et al., *Proteomic mapping of p53 immunogenicity in pancreatic, ovarian, and breast cancers*. *Proteomics Clin Appl*, 2016. **10**(7): p. 720-31.
145. Garranzo-Asensio, M., et al., *Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatfoms*. *Anal Chem*, 2016. **88**(24): p. 12339-12345.
146. Pedersen, J.W., et al., *Seromic profiling of colorectal cancer patients with novel glycopeptide microarray*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(8): p. 1860-71.
147. Pedersen, J.W., et al., *Early detection of cancer in the general population: a blinded case-control study of p53 autoantibodies in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2013. **108**(1): p. 107-14.
148. Chen, H., et al., *Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer*. *Cancer Lett*, 2014. **346**(2): p. 178-87.
149. Chen, H., et al., *Prospective evaluation of 64 serum autoantibodies as biomarkers for early detection of colorectal cancer in a true screening setting*. *Oncotarget*, 2016. **7**(13): p. 16420-32.
150. Wang, H., et al., *Autoantibodies as biomarkers for colorectal cancer: A systematic review, meta-analysis, and bioinformatics analysis*. *Int J Biol Markers*, 2019: p. 1724600819880906.
151. Hudson, M.E., et al., *Identification of differentially expressed proteins in ovarian cancer using high-density protein microarrays*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(44): p. 17494-9.
152. Orenes-Pinero, E., et al., *Serum and tissue profiling in bladder cancer combining protein and tissue arrays*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(1): p. 164-73.
153. Babel, I., et al., *Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays*. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(10): p. 2382-95.
154. Barderas, R., et al., *An optimized predictor panel for colorectal cancer diagnosis based on the combination of tumor-associated antigens obtained from protein and phage microarrays*. *J Proteomics*, 2012. **75**(15): p. 4647-55.
155. Babel, I., et al., *Identification of MST1/STK4 and SULF1 proteins as autoantibody targets for the diagnosis of colorectal cancer by using phage microarrays*. *Mol Cell Proteomics*, 2011. **10**(3): p. M110 001784.
156. Chen, J.S., et al., *Detection of annexin A autoantibodies in sera from colorectal cancer patients*. *J Clin Gastroenterol*, 2011. **45**(2): p. 125-32.
157. Fan, C.W., et al., *Identification of SEC61beta and its autoantibody as biomarkers for colorectal cancer*. *Clin Chim Acta*, 2011. **412**(11-12): p. 887-93.
158. Chen, J.S., et al., *Detection of autoantibodies against Rabphilin-3A-like protein as a potential biomarker in patient's sera of colorectal cancer*. *Clin Chim Acta*, 2011. **412**(15-16): p. 1417-22.
159. Ran, Y., et al., *Profiling tumor-associated autoantibodies for the detection of colon cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(9): p. 2696-700.

160. Chang, W., et al., *Development of autoantibody signatures as biomarkers for early detection of colorectal carcinoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(17): p. 5715-24.
161. Hunt, I., *From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression*. Protein Expr Purif, 2005. **40**(1): p. 1-22.
162. Brondyk, W.H., *Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein*. Methods Enzymol, 2009. **463**: p. 131-47.
163. Gopal, G.J. and A. Kumar, *Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli*. Protein J, 2013. **32**(6): p. 419-25.
164. Hurst, G.B., et al., *Proteomics-Based Tools for Evaluation of Cell-Free Protein Synthesis*. Anal Chem, 2017. **89**(21): p. 11443-11451.
165. He, M., *Cell-free protein synthesis: applications in proteomics and biotechnology*. N Biotechnol, 2008. **25**(2-3): p. 126-32.
166. Jackson, A.M., et al., *Cell-free protein synthesis for proteomics*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2004. **2**(4): p. 308-19.
167. Sawasaki, T., et al., *A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14652-7.
168. Mattanovich, D., et al., *Recombinant protein production in yeasts*. Methods Mol Biol, 2012. **824**: p. 329-58.
169. Celik, E. and P. Calik, *Production of recombinant proteins by yeast cells*. Biotechnol Adv, 2012. **30**(5): p. 1108-18.
170. Bill, R.M., *Playing catch-up with Escherichia coli: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 85.
171. Vieira Gomes, A.M., et al., *Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production*. Microorganisms, 2018. **6**(2).
172. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words*. Electrophoresis, 1998. **19**(11): p. 1853-61.
173. Kobayashi, M., et al., *Development of autoantibody signatures for common cancers*. Semin Immunol, 2020: p. 101388.
174. Barderas, R., I. Babel, and J.I. Casal, *Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery*. Proteomics Clin Appl, 2010. **4**(2): p. 159-78.
175. Sagynaliev, E., et al., *Web-based data warehouse on gene expression in human colorectal cancer*. Proteomics, 2005. **5**(12): p. 3066-78.
176. Alban, A., et al., *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*. Proteomics, 2003. **3**(1): p. 36-44.
177. Petrak, J., et al., *Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins*. Proteomics, 2008. **8**(9): p. 1744-9.
178. Desmetz, C., et al., *Identification of a new panel of serum autoantibodies associated with the presence of in situ carcinoma of the breast in younger women*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(14): p. 4733-41.
179. Goodell, V. and M.L. Disis, *Human tumor cell lysates as a protein source for the detection of cancer antigen-specific humoral immunity*. J Immunol Methods, 2005. **299**(1-2): p. 129-38.
180. Bouwman, K., et al., *Microarrays of tumor cell derived proteins uncover a distinct pattern of prostate cancer serum immunoreactivity*. Proteomics, 2003. **3**(11): p. 2200-7.
181. Hong, S.H., et al., *An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5504-10.
182. Lu, H., V. Goodell, and M.L. Disis, *Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer*. J Proteome Res, 2008. **7**(4): p. 1388-94.

183. Madoz-Gurpide, J., et al., *Integral protein microarrays for the identification of lung cancer antigens in sera that induce a humoral immune response*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(2): p. 268-81.
184. Nam, M.J., et al., *Identification of defensin alpha6 as a potential biomarker in colon adenocarcinoma*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8260-5.
185. Nam, M.J., et al., *Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of autoantibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3*. Proteomics, 2003. **3**(11): p. 2108-15.
186. Qiu, J., et al., *Occurrence of autoantibodies to annexin I, 14-3-3 theta and LAMR1 in prediagnostic lung cancer sera*. J Clin Oncol, 2008. **26**(31): p. 5060-6.
187. Anderson, K.S., et al., *Protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer*. J Proteome Res, 2011. **10**(1): p. 85-96.
188. Massoner, P., et al., *Serum-autoantibodies for discovery of prostate cancer specific biomarkers*. Prostate, 2012. **72**(4): p. 427-36.
189. Tamesa, M.S., et al., *Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis*. Electrophoresis, 2009. **30**(12): p. 2168-81.
190. Boncheva, V., et al., *New targets for the immunotherapy of colon cancer-does reactive disease hold the answer?* Cancer Gene Ther, 2013. **20**(3): p. 157-68.
191. Forgber, M., et al., *Proteome-based analysis of serologically defined tumor-associated antigens in cutaneous lymphoma*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8376.
192. Klade, C.S., et al., *Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis*. Proteomics, 2001. **1**(7): p. 890-8.
193. Gagnon, A., et al., *Use of a combination of approaches to identify and validate relevant tumor-associated antigens and their corresponding autoantibodies in ovarian cancer patients*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(3): p. 764-71.
194. He, Y., et al., *Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in colorectal cancer*. Proteomics Clin Appl, 2007. **1**(3): p. 336-42.
195. Mischo, A., et al., *Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients*. Cancer Immun, 2003. **3**: p. 5.
196. Jager, E., et al., *Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes*. J Exp Med, 1998. **187**(2): p. 265-70.
197. Hartmann, T.B., et al., *SEREX identification of new tumor antigens linked to melanoma-associated retinopathy*. Int J Cancer, 2005. **114**(1): p. 88-93.
198. Qiu, J. and S. Hanash, *Autoantibody profiling for cancer detection*. Clin Lab Med, 2009. **29**(1): p. 31-46.
199. Wang, X., et al., *Autoantibody signatures in prostate cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1224-35.
200. Chatterjee, M., et al., *Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1181-90.
201. Zhong, L., et al., *Identification of circulating antibodies to tumor-associated proteins for combined use as markers of non-small cell lung cancer*. Proteomics, 2004. **4**(4): p. 1216-25.
202. Diez, P., et al., *NAPPA as a Real New Method for Protein Microarray Generation*. Microarrays (Basel), 2015. **4**(2): p. 214-27.
203. Yazaki, J., et al., *Profiling Interactome Networks with the HaloTag-NAPPA In Situ Protein Array*. Curr Protoc Plant Biol, 2018. **3**(3): p. e20071.
204. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.

205. Ong, S.E. and M. Mann, *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics*. Methods Mol Biol, 2007. **359**: p. 37-52.
206. Dayon, L., et al., *Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags*. Anal Chem, 2008. **80**(8): p. 2921-31.
207. Ross, P.L., et al., *Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(12): p. 1154-69.
208. Liu, X., et al., *THBS1 facilitates colorectal liver metastasis through enhancing epithelial-mesenchymal transition*. Clin Transl Oncol, 2020.
209. Xu, L., et al., *Quantitative proteomics reveals that distant recurrence-associated protein R-Ras and Transgelin predict post-surgical survival in patients with Stage III colorectal cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(28): p. 43868-43893.
210. Bai, Y., et al., *Identification and Verification of Two Novel Differentially Expressed Proteins from Non-neoplastic Mucosa and Colorectal Carcinoma Via iTRAQ Combined with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Pathol Oncol Res, 2019.
211. Ma, Y., et al., *iTRAQ-based quantitative analysis of cancer-derived secretory proteome reveals TPM2 as a potential diagnostic biomarker of colorectal cancer*. Front Med, 2016. **10**(3): p. 278-85.
212. Wang, G., et al., *Quantitative proteomic profiling of tumor-associated vascular endothelial cells in colorectal cancer*. Biol Open, 2019. **8**(5).
213. Thompson, A., et al., *TMTpro: Design, Synthesis, and Initial Evaluation of a Proline-Based Isobaric 16-Plex Tandem Mass Tag Reagent Set*. Anal Chem, 2019. **91**(24): p. 15941-15950.
214. Liu, H., R.G. Sadygov, and J.R. Yates, 3rd, *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*. Anal Chem, 2004. **76**(14): p. 4193-201.
215. Jhaveri, D.T., et al., *Using Quantitative Seroproteomics to Identify Antibody Biomarkers in Pancreatic Cancer*. Cancer Immunol Res, 2016. **4**(3): p. 225-33.
216. Yagami, H., et al., *Monoclonal antibodies based on hybridoma technology*. Pharm Pat Anal, 2013. **2**(2): p. 249-63.
217. Noaki, R., et al., *Serum p53 antibody is a useful tumor marker of early colorectal cancer*. Int Surg, 2010. **95**(4): p. 287-92.
218. Barderas, R., et al., *Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2938.
219. Villar-Vazquez, R., et al., *Development of a novel multiplex beads-based assay for autoantibody detection for colorectal cancer diagnosis*. Proteomics, 2016. **16**(8): p. 1280-90.
220. Yanez-Sedeno, P., S. Campuzano, and J.M. Pingarron, *Pushing the limits of electrochemistry toward challenging applications in clinical diagnosis, prognosis, and therapeutic action*. Chem Commun (Camb), 2019. **55**(18): p. 2563-2592.
221. Eletxigerra, U., et al., *Amperometric magnetoimmunoassay for the direct detection of tumor necrosis factor alpha biomarker in human serum*. Anal Chim Acta, 2014. **838**: p. 37-44.
222. Eletxigerra, U., et al., *Amperometric magnetoimmunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum, cell lysates and intact breast cancer cells*. Biosens Bioelectron, 2015. **70**: p. 34-41.
223. Eletxigerra, U., et al., *Surface plasmon resonance immunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum and raw cancer cell lysates*. Anal Chim Acta, 2016. **905**: p. 156-62.
224. Rhodes, D.R., et al., *ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform*. Neoplasia, 2004. **6**(1): p. 1-6.
225. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 401-4.

226. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. Sci Signal, 2013. **6**(269): p. pl1.
227. Uhlen, M., et al., *Proteomics. Tissue-based map of the human proteome*. Science, 2015. **347**(6220): p. 1260419.
228. Thul, P.J., et al., *A subcellular map of the human proteome*. Science, 2017. **356**(6340).
229. Uhlen, M., et al., *A pathology atlas of the human cancer transcriptome*. Science, 2017. **357**(6352).
230. Chandrashekar, D.S., et al., *UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses*. Neoplasia, 2017. **19**(8): p. 649-658.
231. Hewitt, R.E., et al., *Validation of a model of colon cancer progression*. J Pathol, 2000. **192**(4): p. 446-54.
232. Ahmed, D., et al., *Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines*. Oncogenesis, 2013. **2**: p. e71.
233. Leibovitz, A., et al., *Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines*. Cancer Res, 1976. **36**(12): p. 4562-9.
234. Morikawa, K., et al., *Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice*. Cancer Res, 1988. **48**(23): p. 6863-71.
235. Pena, C., et al., *SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue*. Oncogene, 2009. **28**(49): p. 4375-85.
236. Barderas, R., et al., *High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis*. Cancer Res, 2012. **72**(11): p. 2780-90.
237. Pelaez-Garcia, A., et al., *A proteomic analysis reveals that Snail regulates the expression of the nuclear orphan receptor Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) and interleukin 17 (IL-17) to inhibit adipocyte differentiation*. Mol Cell Proteomics, 2015. **14**(2): p. 303-15.
238. Gasteiger, E., et al., *ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3784-8.
239. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
240. Williams, D.E. and R.A. Reisfeld, *Disc Electrophoresis in Polyacrylamide Gels: Extension to New Conditions of Ph and Buffer*. Ann N Y Acad Sci, 1964. **121**: p. 373-81.
241. Kurien, B.T. and R.H. Scofield, *Western blotting*. Methods, 2006. **38**(4): p. 283-93.
242. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
243. Wisniewski, J.R., et al., *Universal sample preparation method for proteome analysis*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 359-62.
244. Madoz-Gurpide, J., et al., *A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(12): p. 2150-64.
245. Geiger, T., et al., *Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics*. Nat Protoc, 2011. **6**(2): p. 147-57.
246. Barderas, R., et al., *In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(6): p. 1602-20.
247. Mendes, M., et al., *Mapping the Spatial Proteome of Metastatic Cells in Colorectal Cancer*. Proteomics, 2017. **17**(19).
248. Pelaez-Garcia, A., et al., *Data from proteomic characterization of the role of Snail1 in murine mesenchymal stem cells and 3T3-L1 fibroblasts differentiation*. Data Brief, 2015. **4**: p. 606-13.

249. San Segundo-Acosta, P., et al., *Identification of Alzheimer's Disease Autoantibodies and Their Target Biomarkers by Phage Microarrays*. J Proteome Res, 2019.
250. Nguyen, H., I. Wood, and M. Hill, *A robust permutation test for quantitative SILAC proteomics experiments*. JOURNAL OF INTEGRATED OMICS, 2012. **2**(2): p. 80-93.
251. Kall, L., et al., *Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets*. Nat Methods, 2007. **4**(11): p. 923-5.
252. Mellacheruvu, D., et al., *The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data*. Nat Methods, 2013. **10**(8): p. 730-6.
253. Uhlen, M., et al., *Towards a knowledge-based Human Protein Atlas*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(12): p. 1248-50.
254. Seiler, C.Y., et al., *DNASU plasmid and PSI: Biology-Materials repositories: resources to accelerate biological research*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D1253-60.
255. Ramachandran, N., et al., *Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays*. Nat Methods, 2008. **5**(6): p. 535-8.
256. San Segundo-Acosta, P., et al., *Identification of Alzheimer's Disease Autoantibodies and Their Target Biomarkers by Phage Microarrays*. J Proteome Res, 2019. **18**(7): p. 2940-2953.
257. Team, R.C., *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., 2015.
258. Dresang, L.R., D.T. Vereide, and B. Sugden, *Identifying sites bound by Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) in the human genome: defining a position-weighted matrix to predict sites bound by EBNA1 in viral genomes*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 2930-40.
259. Garranzo-Asensio, M., et al., *Identification of prefrontal cortex protein alterations in Alzheimer's disease*. Oncotarget, 2018. **9**(13): p. 10847-10867.
260. Lampasona, V., et al., *Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen*. J Immunol, 1996. **157**(6): p. 2707-11.
261. Xie, H., A.L. Notkins, and M.S. Lan, *IA-2, a transmembrane protein tyrosine phosphatase, is expressed in human lung cancer cell lines with neuroendocrine phenotype*. Cancer Res, 1996. **56**(12): p. 2742-4.
262. Suh, S. and K.W. Kim, *Diabetes and cancer: is diabetes causally related to cancer?* Diabetes Metab J, 2011. **35**(3): p. 193-8.
263. Kuipers, E.J., T. Rosch, and M. Bretthauer, *Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions*. Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10**(3): p. 130-42.
264. Yu, X., et al., *Advances in cell-free protein array methods*. Expert Rev Proteomics, 2018. **15**(1): p. 1-11.
265. Cretich, M., F. Damin, and M. Chiari, *Protein microarray technology: how far off is routine diagnostics?* Analyst, 2014. **139**(3): p. 528-42.
266. Atak, A., et al., *Protein microarray applications: Autoantibody detection and posttranslational modification*. Proteomics, 2016. **16**(19): p. 2557-2569.
267. Duarte, J.G. and J.M. Blackburn, *Advances in the development of human protein microarrays*. Expert Rev Proteomics, 2017. **14**(7): p. 627-641.
268. Anderson, K.S. and J. LaBaer, *The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers*. J Proteome Res, 2005. **4**(4): p. 1123-33.
269. Gupta, S., et al., *Evaluation of autoantibody signatures in meningioma patients using human proteome arrays*. Oncotarget, 2017. **8**(35): p. 58443-58456.
270. Syed, P., et al., *Autoantibody Profiling of Glioma Serum Samples to Identify Biomarkers Using Human Proteome Arrays*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13895.
271. Sjoberg, R., et al., *Exploration of high-density protein microarrays for antibody validation and autoimmunity profiling*. N Biotechnol, 2016. **33**(5 Pt A): p. 582-92.

272. Lindskog, M., et al., *Selection of protein epitopes for antibody production*. Biotechniques, 2005. **38**(5): p. 723-7.
273. Lin, L., et al., *High throughput and accurate serum proteome profiling by integrated sample preparation technology and single-run data independent mass spectrometry analysis*. J Proteomics, 2018. **174**: p. 9-16.
274. Liu, X.X., et al., *Identification of 1433zeta as a potential biomarker in gastric cancer by proteomicsbased analysis*. Mol Med Rep, 2017. **16**(5): p. 7759-7765.
275. Rezaei, M., et al., *Identification of antibody reactive proteins in pancreatic cancer using 2D immunoblotting and mass spectrometry*. Oncol Rep, 2018. **39**(5): p. 2413-2421.
276. Grob, T.J., et al., *Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53*. Cell Death Differ, 2001. **8**(12): p. 1213-23.
277. Stiewe, T., C.C. Theseling, and B.M. Putzer, *Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 14177-85.
278. Wilhelm, M.T., et al., *Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway*. Genes Dev, 2010. **24**(6): p. 549-60.
279. Soldevilla, B., et al., *The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer?* Genes Chromosomes Cancer, 2013. **52**(11): p. 989-1006.
280. Soldevilla, B., et al., *Tumor-derived exosomes are enriched in DeltaNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(2): p. 467-78.
281. Peinado, H., et al., *Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(5): p. 302-317.
282. Psaila, B. and D. Lyden, *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 285-93.
283. Costa-Silva, B., et al., *Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(6): p. 816-26.
284. Grange, C., et al., *Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche*. Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5346-56.
285. Peinado, H., et al., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET*. Nat Med, 2012. **18**(6): p. 883-91.
286. Vlassov, A.V., et al., *Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(7): p. 940-8.
287. Awasthi, N., et al., *Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling*. Lab Invest, 2009. **89**(1): p. 38-46.
288. Dulloo, I., P.B. Hooi, and K. Sabapathy, *Hypoxia-induced DNp73 stabilization regulates Vegf-A expression and tumor angiogenesis similar to TAp73*. Cell Cycle, 2015. **14**(22): p. 3533-9.
289. Fernandez-Alonso, R., et al., *p73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGFbeta signaling*. Cell Death Differ, 2015. **22**(8): p. 1287-99.
290. Schwarz, R.E., et al., *EMAP II-based antiangiogenic-antiendothelial in vivo combination therapy of pancreatic cancer*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(5): p. 1442-52.
291. Schwarz, R.E., et al., *Antitumor effects of EMAP II against pancreatic cancer through inhibition of fibronectin-dependent proliferation*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(8): p. 632-9.
292. Crippa, L., et al., *Synergistic damage of tumor vessels with ultra low-dose endothelial-monocyte activating polypeptide-II and neovasculature-targeted tumor necrosis factor-alpha*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 1154-61.
293. Awasthi, N., et al., *Enhancing sorafenib-mediated sensitization to gemcitabine in experimental pancreatic cancer through EMAP II*. J Exp Clin Cancer Res, 2013. **32**: p. 12.

294. Lin, C.Y., et al., *Brain-derived neurotrophic factor increases vascular endothelial growth factor expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells*. *Biochem Pharmacol*, 2014. **91**(4): p. 522-33.
295. Usui, T., et al., *Brain-derived neurotrophic factor promotes angiogenic tube formation through generation of oxidative stress in human vascular endothelial cells*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014. **211**(2): p. 385-94.
296. Huang, S.M., et al., *Brain-derived neurotrophic factor regulates cell motility in human colon cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2015. **22**(3): p. 455-64.
297. Garranzo-Asensio, M., et al., *Multiplexed monitoring of a novel autoantibody diagnostic signature of colorectal cancer using HaloTag technology-based electrochemical immunosensing platform*. *Theranostics*, 2020. **10**(7): p. 3022-3034.
298. Wang, B., et al., *SDF-1/CXCR4 axis promotes directional migration of colorectal cancer cells through upregulation of integrin alphavbeta6*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(2): p. 282-91.
299. Watters, R.J., et al., *Targeting sphingosine-1-phosphate receptors in cancer*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011. **11**(9): p. 810-7.
300. Ilani, T., et al., *A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function*. *Science*, 2013. **341**(6141): p. 74-6.
301. Puzio-Kuter, A.M., *The Role of p53 in Metabolic Regulation*. *Genes Cancer*, 2011. **2**(4): p. 385-91.
302. Vousden, K.H. and K.M. Ryan, *p53 and metabolism*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(10): p. 691-700.
303. Cutruzzola, F., L. Avigliano, and E. Candi, *p73 keeps metabolic control in balance*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(2): p. 179-80.
304. Agostini, M., et al., *Metabolic pathways regulated by TAp73 in response to oxidative stress*. *Oncotarget*, 2016. **7**(21): p. 29881-900.
305. Nemajerova, A., et al., *Non-oncogenic roles of TAp73: from multiciliogenesis to metabolism*. *Cell Death Differ*, 2018. **25**(1): p. 144-153.
306. Napoli, M. and E.R. Flores, *The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy*. *Br J Cancer*, 2017. **116**(2): p. 149-155.
307. Brisson, L., et al., *Lactate Dehydrogenase B Controls Lysosome Activity and Autophagy in Cancer*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(3): p. 418-431.
308. Zois, C.E. and A.L. Harris, *Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy*. *J Mol Med (Berl)*, 2016. **94**(2): p. 137-54.
309. Murphy, M.A., et al., *Epitope presentation is an important determinant of the utility of antigens identified from protein arrays in the development of autoantibody diagnostic assays*. *J Proteomics*, 2012. **75**(15): p. 4668-75.
310. Barderas, R., R. Villar-Vázquez, and J.I. Casal, *Colorectal Cancer Circulating Biomarkers*. *Biomarkers in Cancer*, 2015: p. 1-21.
311. Casal, J.I. and R. Barderas, *Identification of cancer autoantigens in serum: toward diagnostic/prognostic testing?* *Mol Diagn Ther*, 2010. **14**(3): p. 149-54.
312. Reuschenbach, M., M. von Knebel Doeberitz, and N. Wentzensen, *A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(10): p. 1535-44.
313. Garranzo-Asensio, M., et al., *The specific seroreactivity to Np73 isoforms shows higher diagnostic ability in colorectal cancer patients than the canonical p73 protein*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 13547.
314. Lubin, R., et al., *Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on primary structure and exposure on protein surface*. *Cancer Res*, 1993. **53**(24): p. 5872-6.

315. Ott, C., et al., *Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120213.
316. Ning, L., et al., *[Immuno-proteomic screening of human pancreatic cancer associated membrane antigens for early diagnosis]*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2007. **45**(1): p. 34-8.
317. Cha, J.D., H.J. Kim, and I.H. Cha, *Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma progression detected by combining array-based comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011. **111**(5): p. 594-607.
318. Huang, X., et al., *ERP44 inhibits human lung cancer cell migration mainly via IP3R2*. Aging (Albany NY), 2016. **8**(6): p. 1276-86.
319. Wise, R., et al., *Protein disulfide isomerases in the endoplasmic reticulum promote anchorage-independent growth of breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2016. **157**(2): p. 241-252.
320. Stahl, P.R., et al., *THSD7A expression in human cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2017. **56**(4): p. 314-327.
321. Zaghrini, C., et al., *Novel ELISA for thrombospondin type 1 domain-containing 7A autoantibodies in membranous nephropathy*. Kidney Int, 2019. **95**(3): p. 666-679.
322. Pedro, N.F., et al., *Candidate Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: Differential Expression of Oxidative Stress-Related Genes*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(5): p. 1343-1349.
323. Privat, M., et al., *Antioxydation And Cell Migration Genes Are Identified as Potential Therapeutic Targets in Basal-Like and BRCA1 Mutated Breast Cancer Cell Lines*. Int J Med Sci, 2018. **15**(1): p. 46-58.
324. Kim, Y.J., et al., *Verification of the biomarker candidates for non-small-cell lung cancer using a targeted proteomics approach*. J Proteome Res, 2015. **14**(3): p. 1412-9.
325. Davaliev, K., et al., *Proteomics analysis of malignant and benign prostate tissue by 2D DIGE/MS reveals new insights into proteins involved in prostate cancer*. Prostate, 2015. **75**(14): p. 1586-600.
326. Dukel, M., et al., *The Breast Cancer Tumor Suppressor TRIM29 Is Expressed via ATM-dependent Signaling in Response to Hypoxia*. J Biol Chem, 2016. **291**(41): p. 21541-21552.
327. Yuan, Z., et al., *The ATDC (TRIM29) protein binds p53 and antagonizes p53-mediated functions*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(12): p. 3004-15.
328. Glebov, O.K., et al., *Gene expression patterns distinguish colonoscopically isolated human aberrant crypt foci from normal colonic mucosa*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(11): p. 2253-62.
329. !!! INVALID CITATION !!! [287, 288].
330. Duran-Sanchon, S., et al., *Identification and validation of microRNA profiles in fecal samples for detection of colorectal cancer*. Gastroenterology, 2019.
331. Du, Y. and J.R. Grandis, *Receptor-type protein tyrosine phosphatases in cancer*. Chin J Cancer, 2015. **34**(2): p. 61-9.
332. Wei, J., E. Zaika, and A. Zaika, *p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer*. J Nucleic Acids, 2012. **2012**: p. 687359.
333. Bourdon, J.C., *p53 Family isoforms*. Curr Pharm Biotechnol, 2007. **8**(6): p. 332-6.
334. Khoury, M.P. and J.C. Bourdon, *p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor?* Genes Cancer, 2011. **2**(4): p. 453-65.
335. Ebrahimi, M., K. Nylander, and I. van der Waal, *Oral lichen planus and the p53 family: what do we know?* J Oral Pathol Med, 2011. **40**(4): p. 281-5.
336. Ebrahimi, M., et al., *Detection of antibodies against p63 and p73 isoforms in sera from patients diagnosed with oral lichen planus*. J Oral Pathol Med, 2007. **36**(2): p. 93-8.
337. Murphy, M.A., J.J. O'Leary, and D.J. Cahill, *Assessment of the humoral immune response to cancer*. J Proteomics, 2012. **75**(15): p. 4573-9.

338. Tominaga, O., et al., *Detection of p73 antibodies in patients with various types of cancer: immunological characterization*. Br J Cancer, 2001. **84**(1): p. 57-63.
339. Kostianets, O., et al., *Panel of SEREX-defined antigens for breast cancer autoantibodies profile detection*. Biomarkers, 2017. **22**(2): p. 149-156.
340. Beutgen, V.M., et al., *Autoantibody Biomarker Discovery in Primary Open Angle Glaucoma Using Serological Proteome Analysis (SERPA)*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 381.

ANEXO. LISTA DE PUBLICACIONES

ANEXO. LISTA DE PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han publicado un total de 13 artículos (7 como primera autora y 6 como colaboradora) y 1 capítulo de libro. Además, dos de los artículos se encuentran mandados a publicar (*Artículos 1 y 4* incluidos en esta Tesis Doctoral).

A continuación, se detalla la lista de publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral.

Publicaciones incluidas en esta Tesis Doctoral:

- **Garranzo-Asensio M**, Guzmán-Aránguez A, Povedano E, Ruiz-Valdepeñas Montiel V, Poves C, Fernandez-Aceñero MJ, Montero-Calle A, Solís-Fernández G, Fernandez-Diez S, Camps J, Arenas M, Rodríguez-Tomás E, Joven J, Sanchez-Martinez M, Rodriguez N, Dominguez G, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM, Campuzano S, Barderas R.

Multiplexed Monitoring of a Novel Autoantibody Diagnostic Signature of Colorectal Cancer Using HaloTag Technology-Based Electrochemical Immunosensing Platform. *Theranostics*. 2020 Feb 10;10(7):3022-3034. doi: 10.7150/thno.42507. eCollection 2020.

- **Garranzo-Asensio M**, San Segundo-Acosta P, Povés C, Fernández-Aceñero MJ, Martínez-Useros J, Montero-Calle A, Solís-Fernández G, Sanchez-Martinez M, Rodríguez N, Cerón MÁ, Fernandez-Diez S, Domínguez G, de Los Ríos V, Peláez-García A, Guzmán-Aránguez A, Barderas R.

Identification of Tumor-Associated Antigens with Diagnostic Ability of Colorectal Cancer by In-Depth Immunomic and Seroproteomic Analysis. *J Proteomics*. 2020 Mar 1;214:103635. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103635. Epub 2020 Jan 7.

- **Garranzo-Asensio M**, Guzmán-Aránguez A, Povés C, Fernández-Aceñero MJ, Montero-Calle A, Cerón MÁ, Fernandez-Diez S, Rodríguez N, Gómez de Cedrón M, Ramírez de Molina A, Domínguez G, Barderas R.

The Specific Seroreactivity to Δ Np73 Isoforms Shows Higher Diagnostic Ability in Colorectal Cancer Patients Than the Canonical p73 Protein. *Sci Rep*. 2019 Sep 19;9(1):13547. doi: 10.1038/s41598-019-49960-x.

- **Garranzo-Asensio M**, Guzman-Aranguet A, Povés C, Fernández-Aceñero MJ, Torrente-Rodríguez RM, Ruiz-Valdepeñas Montiel V, Domínguez G, Frutos LS, Rodríguez N, Villalba M, Pingarrón JM, Campuzano S, Barderas R.

Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatfoms. *Anal Chem*. 2016 Dec 20;88(24):12339-12345. doi: 10.1021/acs.analchem.6b03526. Epub 2016 Dec 1.

Otras publicaciones derivadas de colaboraciones:

- Montero-Calle A, San Segundo-Acosta P, **Garranzo-Asensio M**, Rábano A, Barderas R.

The Molecular Misreading of APP and UBB Induces a Humoral Immune Response in Alzheimer's Disease Patients With Diagnostic Ability. *Mol Neurobiol*. 2020 Feb;57(2):1009-1020. doi: 10.1007/s12035-019-01809-0. Epub 2019 Oct 26.

- **Garranzo-Asensio M***, Montero-Calle A*, Solís-Fernández G, Barderas R, Guzman-Arangué A.

Protein Microarrays: Valuable Tools for Ocular Diseases Research. Curr Med Chem. 2019 Jun 27. doi: 10.2174/0929867326666190627131300.

*Both authors contributed equally

- Serafín V, Valverde A, **Garranzo-Asensio M**, Barderas R, Campuzano S, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM.

Simultaneous Amperometric Immunosensing of the Metastasis-Related Biomarkers IL-13R α 2 and CDH-17 by Using Grafted Screen-Printed Electrodes and a Composite Prepared From Quantum Dots and Carbon Nanotubes for Signal Amplification. Mikrochim Acta. 2019 Jun 10;186(7):411. doi: 10.1007/s00604-019-3531-5.

- Valverde A, Povedano E, Ruiz-Valdepeñas Montiel V, Yáñez-Sedeño P, **Garranzo-Asensio M**, Rodríguez N, Domínguez G, Barderas R, Campuzano S, Pingarrón JM.

Determination of Cadherin-17 in Tumor Tissues of Different Metastatic Grade Using a Single Incubation-Step Amperometric Immunosensor. Anal Chem. 2018 Sep 18;90(18):11161-11167. doi: 10.1021/acs.analchem.8b03506. Epub 2018 Sep 6.

- Valverde A, Povedano E, Montiel VR, Yáñez-Sedeño P, **Garranzo-Asensio M**, Barderas R, Campuzano S, Pingarrón JM.

Electrochemical Immunosensor for IL-13 Receptor α 2 Determination and Discrimination of Metastatic Colon Cancer Cells. Biosens Bioelectron. 2018 Oct 15;117:766-772. doi: 10.1016/j.bios.2018.07.017. Epub 2018 Jul 11.

- **Garranzo-Asensio M***, San Segundo-Acosta P*, Martínez-Useros J, Montero-Calle A, Fernández-Aceñero MJ, Häggmark-Månberg A, Pelaez-Garcia A, Villalba M, Rabano A, Nilsson P, Barderas R.

Identification of Prefrontal Cortex Protein Alterations in Alzheimer's Disease. Oncotarget. 2018 Jan 24;9(13):10847-10867. doi: 10.18632/oncotarget.24303. eCollection 2018 Feb 16.

*Both authors contributed equally

- San Segundo-Acosta P*, **Garranzo-Asensio M***, Oeo-Santos C, Montero-Calle A, Quiralte J, Cuesta-Herranz J, Villalba M, Barderas R.

High-throughput Screening of T7 Phage Display and Protein Microarrays as a Methodological Approach for the Identification of IgE-reactive Components. J Immunol Methods. 2018 May;456:44-53. doi: 10.1016/j.jim.2018.02.011. Epub 2018 Feb 20.

*Both authors contributed equally

- Torrente-Rodríguez RM, Ruiz-Valdepeñas Montiel V, Campuzano S, Pedrero M, Farchado M, Vargas E, Manuel de Villena FJ, **Garranzo-Asensio M**, Barderas R, Pingarrón JM.

Electrochemical Sensor for Rapid Determination of Fibroblast Growth Factor Receptor 4 in Raw Cancer Cell Lysates. PLoS One. 2017 Apr 4;12(4):e0175056. doi: 10.1371/journal.pone.0175056. eCollection 2017.

- Pedrero M, de Villena FJM, Muñoz-San Martín C, Campuzano S, **Garranzo-Asensio M**, Barderas R, Pingarrón JM.

Disposable Amperometric Immunosensor for the Determination of Human P53 Protein in Cell Lysates Using Magnetic Micro-Carriers. Biosensors (Basel). 2016 Nov 21;6(4):56. doi: 10.3390/bios6040056.

Capítulo de libro:

- San Segundo-Acosta, P*, **Garranzo-Asensio, M***, Montero-Calle, A, Oeo-Santos, C, Villalba, M, Guzman-Aranguez, A & Barderas, R

Protein Microarrays in Neurodegenerative Diseases in Current Proteomic Approaches Applied to Brain Function. Enrique Santamaría and Joaquín Fernández-Irigoyen (eds.), Current Proteomic Approaches Applied to Brain Function, Neuromethods, vol. 127, DOI 10.1007/978-1-4939-7119-0_4.

*Both authors contributed equally