



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Programa de Doctorat: Medicina Interna

Títol de tesi:

***Estudi del paper de la isoforma M2 de Piruvat
Quinasa (PKM2) en la resposta i resistència a
oxaliplatí en línies cel·lulars i en pacients amb
càncer colorectal avançat***

Tesi doctoral presentada per:

ALBA GINÉS MOLINA

DIRECTORS: DRA. EVA MARTINEZ BALIBREA

DR. ALBERT ABAD ESTEVE

TUTOR: DR. AGUSTÍ BARNADAS MOLINS

ANY 2012

Eva Martinez Balibrea, coordinadora de l'àrea de tumors digestius del Laboratori de Biologia Molecular del Càncer del Servei d'Oncologia Mèdica de L'Institut Català d'Oncologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Albert Abad Esteve, Cap de Secció del Servei d'Oncologia Mèdica de L'Institut Català d'Oncologia de l'Hospital Universitari Germans Trias, i Agustí Barnadas Molins, professor del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i director del Servei d'Oncologia Mèdica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, certifiquen que la tesi titulada:

Estudi del paper de la Isoforma M2 de Piruvat Quinasa (PKM2) en la resposta i resistència a oxaliplatí en línies cel·lulars i en pacients amb càncer colorectal avançat

Ha estat realitzada per Alba Ginés Molina sota la seva direcció i és apta per a ser defensada davant d'un tribunal per a optar al grau de doctora

Alba Ginés Molina
(doctoranda)

Eva Martinez Balibrea
(directora)

Albert Abad Esteve
(director)

Agustí Barnadas Molins
(tutor)

Badalona, Octubre de 2012

A MIS PADRES,

A MIS ABUELOS,

A JUANMA

“EL QUE SABEM ÉS UNA GOTA D’AIGUA, EL QUE IGNOREM, UN OCEÀ”

(ISAAC NEWTON)

“INSISTIR, PERSISTIR, RESISTIR...PERO MAI DESISTIR”

(ANÒNIM)

AGRAÏMENTS

Després de tant de temps dedicat a aquesta tesi doctoral, et pares a mirar cap enrere i te'n adones de que has tingut la gran sort de poder comptar amb el suport i la col·laboració, la majoria de vegades incondicional, de moltes persones. Crec, per tant, que és un deure agrair-ho a totes elles.

En primer lloc vull agrair als meus directors de tesi, la Dra. Eva Martinez-Balibrea i el Dr. Albert Abad Esteve, per donar-me la oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral, per permetre'm conèixer el món de la ciència i la recerca. Per confiar en mi i perquè gràcies a ells he pogut aprendre tot el que he après fins ara.

També vull agrair al Dr. Agustí Barnadas per acceptar ser el meu tutor i per ajudar-me amb el tema administratiu amb la seva disponibilitat en tot moment.

Vull agrair a la Fundació Olga Torres per haver finançat aquest projecte.

Al Marco i al Gerard, de la unitat de citometria de l'IGTP, per donar-me a conèixer el fascinant món de la citometria i estar sempre disposats a ajudar, sense importar la hora o el moment del dia.

També vull agrair l'acolliment que vaig tenir a la unitat de proteòmica, al Francesc Canals, a la Marta Monge i a la Núria Colomé. Gràcies per tot el que vaig aprendre!

A la Carme Casal, de la unitat de microscòpia de Sant Pau, per transmetre'm la seva passió per aquesta disciplina i fer que les hores que vàrem estar juntes es fessin tan curtes.

A la Eva Musulén, de la unitat d'anatomia patològica. Gràcies per estar sempre disposada a col·laborar amb nosaltres.

A tota la unitat d'oncologia digestiva: la Laura, la Cristina, la Olga, el Jose Luis Manzano...per les bones estones passades dins i fora de l'hospital i per tot el que he pogut aprendre amb tots ells.

Al meu grup del laboratori, tants els que hi són encara, Vicenç i Anna, com els que han marxat: la Meritxell, la Clara i la Mònica. Sobretot al Vicenç i l'Anna, sense la seva ajuda en els moments més crítics no hagués sigut el mateix. Els hi agraeixo la comprensió i l'ajuda experimental en aquests darrers dies.

A la gent del "lab" que cada dia ha conviscut amb mi matí i tarda, i les "grans" converses que han fet que anar a treballar cada dia sigui un plaer: la Sònia, la Vanessa, la Maribel, la Marian, la Sara, el Carles, la Cristina Queral, la Itziar, el Pepe, el Pedro, la Violeta, la Gemma, la Isa Serra....Gràcies per fer-me sentir com a casa. A la Maribel, perquè encara que estigués passant moments personals molt durs, m'ha rebut amb un somriure cada matí. I també agrair els bons moments que he passat amb el Joan i l'Elena, els veterinaris de la UAB que de tant ens visiten.

Als "sèniors" de l'edifici, l'Antoni, la Iveliss, la Teresa, el Jordi i la Rosa Maria, pels seus savis consells, per fer-me gaudir de bones xerrades científiques, per la seva ajuda en tot moment i per fer-me veure que encara que difícil i sacrificat, el món de la ciència és apassionant.

Als bons amics que he tingut la sort de fer: el Marc , la Lucía, la Jovita, la Núria, la Vero, el Vicenç, el Raül, el "*chiquitin*" Bernard, el Santi i el Josep Maria (Ai, JM, com tu diries: i no és maco això!!!!). Moltíssimes gràcies a tots de tot cor per tot el que he pogut compartir amb vosaltres entre pipetes i cultius o entre canyes i tapes! No canvieu mai!

Al Marc, per dir sempre les veritats i ser tan sincer, per la santa paciència que ha tingut sobretot en aquests últims dies, i per totes les bones estones al laboratori i els bons camins de tornada a casa.

En especial vull agrair a la Jovi, que després de quasi 7 anys juntes, cada dia aprenc coses noves amb ella. Per la seva comprensió, per la seva disposició a ajudar, per les llargues estones de xerrera, i per animar-me sempre!! Espero que tinguem molts anys més com aquests o millors!!

Al Juanma. A ell li agraeixo tot, la seva amabilitat, la seva PACIÈNCIA, el seu respecte i sinceritat (encara que de vegades ha sigut difícil d'escoltar). També per fer-me veure que hi ha mil maneres de veure la vida, i sobretot per fer-me sentir tan bé al seu costat i fer realitat més somnis dels que mai hauria pensat complir. També a la seva família que, encara que estiguin a molta distància, sempre s'han preocupat per mi i m'han donat suport.

Finalment, a la meva família. A ells els hi dec tot. Al meu tiet Javier, a Consuelo i als meus avis, Dolores, Irene i Paco. Encara que no estiguen físicament aquí esteu sempre amb mi i al meu cor. Sobretot al meu avi José Maria, per estimar-me tant, preocupar-se tant per mi, ajudar-me, guiar-me i aconsellar-me d'una manera tan intel·ligent.

Però a qui més he de donar les gràcies és als meus pares. Gracias papás por confiar en mí en todo momento. Por hacerme ver la realidad y hacer que tenga siempre los pies sobre la tierra. Por enseñarme a luchar por lo que realmente deseo y por animarme en los malos momentos y compartir las alegrías en los mejores momentos. ¡A vosotros os dedico esta tesis doctoral!

Gràcies a tots per haver estat al meu costat!!!

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	5
1.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DEL CÀNCER COLORECTAL.....	7
1.1.1. Epidemiologia.....	7
1.1.2. Carcinogènesi.....	9
1.1.3. Tractament del CCR en la malaltia avançada i metastàtica.....	13
1.1.4. Resistència a quimioteràpia.....	15
1.1.5. Factors predictius.....	17
1.2. QUIMIOTERÀPIA DEL CÀNCER COLORECTAL: OXALIPLATÍ.....	19
1.2.1. Farmacodinàmica i biotransformació de l'oxaliplatí.....	20
1.2.2. Mecanisme d'acció.....	21
1.2.2.1. Reconeixement d'adductes platinats i aturada del cicle cel·lular.....	24
1.2.2.2. Reparació de les lesions.....	26
1.2.2.3. Activació de mort cel·lular.....	29
1.2.3. Resistència a oxaliplatí.....	32
1.2.3.1. Alteracions en la captació, acumulació i eliminació.....	32
1.2.3.2. Defectes en la reparació del dany a l'ADN.....	35
1.2.3.3. Alteracions en l'activació de mort cel·lular.....	38
1.2.3.4. Microentorn i capacitat invasiva.....	40
1.3. L'ENZIM PIRUVAT QUINASA M2 (PKM2).....	41
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	47
3. MATERIALS I MÈTODES.....	53
3.1. LÍNIES CEL·LULARS.....	55
3.1.1. Manteniment de les línies cel·lulars.....	60
3.2. FÀRMACS ANTINEOPLÀSICS.....	60
3.3. TESTS DE VIABILITAT CEL·LULAR.....	61
3.3.1. Assaig de viabilitat cel·lular per blau tripà.....	61
3.3.2. Test MTT.....	62

3.4. SILENCIAMENT GÈNIC AMB siRNAs	65
3.5. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ GÈNICA	68
3.5.1. Extracció d'ARN de línies cel·lulars	68
3.5.2. Extracció d'ARN parafinat de tumors de còlon.....	69
3.5.3. Retrotranscripció	70
3.5.4. Expressió d' ARNm a temps real (qPCR).....	71
3.6. ESTUDI DE MORT CEL·LULAR	76
3.6.1. Anàlisi de distribució de cicle cel·lular per iodur de Propidi.....	76
3.6.2. Estudi d'activació d'apoptosi per test d'Anexina V/IP	77
3.7. ESTUDIS PROTEÒMICS.....	79
3.7.1. Proteòmica comparativa convencional	80
3.7.1.1. Primera dimensió: isoelectroenfoc	80
3.7.1.2. Segona dimensió: electroforesi	81
3.7.1.3. Identificació dels punts proteics	82
3.7.2. 2D-DIGE	84
3.7.2.1. Extracció proteica.....	85
3.7.2.2. Rehidratació de les tires d'isoelectroenfoc.....	85
3.7.2.3. Marcatge de les mostres.....	86
3.7.2.4. Primera dimensió: isoelectroenfoc	87
3.7.2.5. Segona dimensió: SDS electroforesi	87
3.7.2.6. Identificació proteica.....	89
3.7.3. Western Blot.....	90
3.7.3.1 Extracció i quantificació proteica	90
3.7.3.2. SDS-PAGE	91
3.7.3.3. Transferència a membrana de PVDF.....	92
3.7.3.4. Immunodetecció.....	93
3.8. IMMUNOCITOQUÍMICA.....	94
3.9. ESTUDI EN PACIENTS	96
3.9.1. Pacients	96

3.9.2. Estudi de PKM2 i altres marcadors en tumors de pacients amb CCR	97
3.9.2.1 Estudi d'expressió d'ARNm de PKM2 en teixit tumoral	97
3.9.2.1.1. Preparació de talls, desparafinització, extracció d'ARN	97
3.9.2.1.2. qPCR	98
3.9.2.2. Estudi de Ki-67, bcl-2 i p53 per immunohistoquímica	98
3.9.2.2.1. Obtenció d'un Tissue Microarray a partir de blocs parafinats de tumor	98
3.9.2.2.2. Immunohistoquímica	99
3.10. ESTADÍSTICA	100
4. RESULTATS	105
4.1. RESULTATS OBJECTIU 1	107
4.1.1. Perfil proteòmic de resistència adquirida a oxaliplatí	107
4.1.2. Validació de proteïnes relacionades amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí	109
4.1.3 Expressió de PKM2 en altres línies cel·lulars de carcinoma colorectal humà	110
4.2. RESULTATS OBJECTIU 2	113
4.2.1. Silenciament de PKM2 en les línies HT29 i HCT116	113
4.2.2. Efecte del silenciament de PKM2 en la sensibilitat a oxaliplatí	115
4.2.2.1. Determinació de l'alteració de la viabilitat cel·lular causada per oxaliplatí	115
4.2.2.2. Anàlisi de la proliferació cel·lular en resposta a oxaliplatí i silenciament de PKM2	117
4.2.3. Estudi de la influència de PKM2 en la pertorbació del patró del cycle cel·lular induïda per oxaliplatí	119
4.2.4. Estudi de l'efecte de la inhibició de l'expressió de PKM2 sobre l'activació d'apoptosi en resposta a oxaliplatí per test d'Anexina V/Iodur de Propidi	123
4.3. RESULTATS OBJECTIU 3	126
4.4. RESULTATS OBJECTIU 4	137
4.4.1. Obtenció dels patrons proteics diferencials entre HT29siCNT i HT29siPKM2 per tècnica 2D-DIGE	137
4.4.2. Estudi funcional de les proteïnes amb expressió depenent de PKM2	143

4.4.3. Validació de les proteïnes alterades com a conseqüència del silenciament de PKM2	148
4.5. RESULTATS OBJECTIU 5	152
5. DISCUSSIÓ	157
6. CONCLUSIONS	177
7. BIBLIOGRAFIA.....	183
ANNEX.....	205

ABREVIATURES

2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial en gel
2D-PAGE	Electroforesi amb gels d'acrilamida en 2 dimensions
5FU	5-fluorouracil
ADN	àcid desoxiribonucleic
ADNc	àcid desoxiribonucleic complementari
ARN	àcid ribonucleic
ARNm	àcid ribonucleic missatger
CAPE	capecitabina
CCHNP	Càncer Colorectal Hereditari No Polipòsic
CCR	càncer colorectal
CCRa	càncer colorectal avançat
CCRm	càncer colorectal metastàtic
CDDP	cisplatí
CIN	fenotip d'instabilitats cromosòmiques
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
FBS	sèrum fetal boví
H₂O₂	aigua oxigenada
IEP	isoelectroenfoc
IP	iodur de propidi
IRI	irinotecan
LOH	pèrdua d'heterozigositat (<i>Loss of heterozygosity</i>)
MMR	via de reparació (<i>Mismatch Repair</i>)
MSI	fenotip tumoral amb inestabilitat de microsatèl·lits
NER	via de reparació de nucleòtids desaparellats (<i>Nucleotide Exchange Repair</i>)
OXA	oxaliplatí
PAF	Poliposi Adenomatosa Familiar
PBS	sèrum salí tamponat en fosfats (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PKM2	Piruvat quinasa isoforma M2
PVDF	polifluorur de vinilidè

qPCR	reacció en cadena de polimerasa quantitativa
SDS	dodecilsulfat sòdic
SG	supervivència global
siRNA	petit ARN d'interferència (<i>small interference RNA</i>)
SLM	supervivència lliure de malaltia
TBS	sèrum salí tamponat en Tris (<i>Tris Buffer Saline</i>)
TLM	temps lliure de malaltia
TNM	sistema d'estadiatge tumor-nòdul-metàstasi
WB	Western Blot

1. INTRODUCCIÓ

1.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DEL CÀNCER COLORECTAL

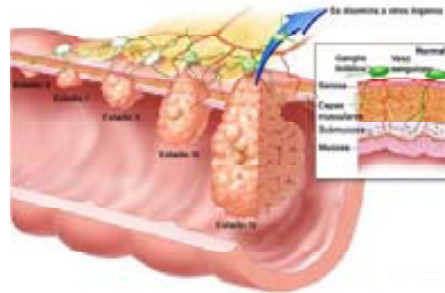
1.1.1. Epidemiologia

El càncer colorectal (CCR) és el responsable de més de 600.000 morts anuals convertint-se en la quarta causa més freqüent de mort per càncer al món. La OMS estima que és el tercer càncer de major incidència en homes (663.000 nous casos anuals) i el segon en dones (571.000 nous casos anuals), arribant a diagnosticar-se fins a 1,234 milions de casos nous cada any al món si s'engloben ambdós sexes. Gairebé el 60% d'aquests casos es dona en països desenvolupats amb el que es converteix en un problema de salut pública de gran importància (Font: IARC www.iarc.fr). A l'Estat Espanyol el càncer colorectal representa la 7ª causa de mort amb 10.602 defuncions cada any i el tumor més freqüent englobant ambdós sexes (25.600 casos nous/any). Amb un increment anual de la incidència del 2,6%, la tendència d'aparició s'ha duplicat en els darrers 10 anys (Font: INE-ISCIII www.isciii.es).

Després de l'extirpació del tumor primari, la supervivència global a 5 anys varia segons l'estadi de detecció, essent superior al 90% en els estadis I, del 85-72% en estadis II i arribant-se a reduir fins al 27% si no s'administra tractament adjuvant en estadis II d'alt risc i estadi III. S'estima que dels càncers localitzats inicialment, entre el 30 i el 60% desenvoluparà metàstasis. La supervivència en la malaltia metastàtica a 5 anys no acostuma a ser superior al 10% (1-3). La recaiguda després de cirurgia en la malaltia localitzada es dona al voltant dels 3 anys. El temps fins a la progressió del tumor en els malalts metastàtics es troba al voltant dels 10 mesos. Amb l'administració dels nous fàrmacs anti-diana més

quimioteràpia és possible assolir medianes de supervivència global que poden arribar fins als 24,5 mesos.

Estadi	Tumor	Nòdul	Metàstasi	Classificació Duke
E0	Tis	N0	M0	
EI	T1-T2	N0	M0	A
EII	T3-T4	N0	M0	B
EIII	T	N1-N2	M0	C
EIV	T	N	M1	D



SISTEMA TNM

TUMOR

- Tx** El tumor primari no pot ser valorat
- T₀** No hi ha evidència de tumor primari
- Tis** Carcinoma *in situ*
- T1** El tumor només envaeix la submucosa
- T2** El tumor envaeix fins la muscular
- T3** El tumor arriba fins la subserosa o als teixits perirrectals
- T4** El tumor arriba a serosa, perfora el peritoneu visceral o envaeix altres òrgans i estructures (intestí prim, bufeta, sacre)

NÒDULS

- Nx** Els ganglis limfàtics regionals no poden ser valorats. Hi ha menys de 12 ganglis estudiats
- N0** No hi ha ganglis afectats en al menys 12 dels estudiats
- N1** Metàstasi en 1-3 ganglis pericòlics
- N2** Metàstasi en 4 o més ganglis pericòlics

METÀSTASI

- Mx** No es pot valorar la presència de metàstasi a distància
- M0** No hi ha metàstasi a distància
- M1** Metàstasi a distància
-

Figura 1. Imatge i taules classificatòries dels graus i estadis tumorals en funció del sistema TNM. (Protocolos en Oncología, Abad A. et al 2009 i www.cancer.gov).

1.1.2. Carcinogènesi

El CCR progressa des de simples lesions de les criptes colòniques en el teixit epitelial, passant per petits tumors benignes (pòlips adenomatosos), fins a generar carcinomes malignes amb la capacitat d'envair altres teixits. Els estadis del CCR es defineixen per la classificació tumor-nòdul-metàstasi (TNM), sistema basat en l'extensió del tumor (**T**), el grau de disseminació als nòduls limfàtics regionals (**N**) i la presència de llocs distants de la malaltia (**M**) (figura 1).

El càncer colorectal es desenvolupa com a una progressió guiada de múltiples etapes en que la cèl·lula normal es transformarà en neoplàsica i, encara que existeixi una seqüència de patogènesi preferent, serà l'acumulació de mutacions gèniques (entre 5 i 9) i alteracions cromosòmiques les que finalment donaran el fenotip de cèl·lula tumoral (2, 4) (figura 2). La idea inicial de carcinogènesi la van aportar Fearon i Vogelstein proposant una via mutacional com a única causant del desenvolupament tumoral (5). L'any 1997 es van descriure dues classes de gens de susceptibilitat al càncer anomenats *gatekeeper* i *caretaker* (6). El 2004 Michor, F. i col·laboradors varen definir un nou grup de gens de predisposició al càncer anomenats *landscaper* (7).

En un tumor poden trobar-se al voltant de 80 mutacions. La majoria d'aquestes són inofensives i no més de 15 es creu que són responsables de dirigir la iniciació, progressió o manteniment del tumor. El coneixement de la distribució de dites mutacions en els diferents càncers ha portat a una nova visió dels paisatges del genoma cancerós (8). En un treball realitzat per Wood, L.D. i cols. estudiaren els genomes i transcriptomes de càncers de mama i còlon arribant a la conclusió de que els tumors contenen una petita fracció de gens comuns freqüentment mutats (p. ex. KRAS, APC o TP53) i un nombre molt més elevat de

gens amb baixa freqüència de mutació i que són aquestes, i no les mutacions freqüents, les que dominen el paisatge del genoma tumoral al estar associades amb algun tipus d'avantatge per la progressió del tumor (9).

Els gens *gatekeeper* son gens involucrats en el creixement i divisió cel·lular. El 85% dels càncers esporàdics i de poliposi adenomatosa familiar (PAF) presenten mutacions en aquests gens. Aquests tumors resulten ser molt heterogenis i amb un elevat nombre d'inestabilitats cromosòmiques (fenotip tumoral CIN) com les aneuploidies i poliploidies entre d'altres. Els tumors CIN també mostren amplifícacions de regions genòmiques que comporten la sobreexpressió de proto-oncogens (p.ex. gen KRAS) o bé, translocacions i pèrdues de fragments cromosòmics (LOH) que contenen gens supressors tumorals com les dels cromosomes 5q (gen APC), 17p (gen TP53) i 18q (gens DCC i SMAD4, relacionats amb la via de senyalització TGF β). Més del 90% dels pacients tenen alguna alteració en el gen APC, gen clau durant els primers estadis del desenvolupament del càncer colorectal (10).

Els gens *caretaker* tenen la funció principal de controlar i mantenir la integritat del genoma de la cèl·lula (11). Un 15% dels tumors colorectals esporàdics i les formes hereditàries no polipòsiques (CCHNP) mostren un fenotip tumoral amb alteracions en aquests gens. Els tumors acostumen a ser pobrament diferenciats, mucinosos, amb infiltració limfocitària i de progressió ràpida (2). Genèticament, són tumors amb una elevada freqüència d'inestabilitats de microsatèl·lits (MSI) i amb alteracions epigenètiques en gens de vies de reparació de l'ADN. En especial en els gens MSH2 i MLH1 de la via de reparació d'aparellaments incorrectes de bases o MMR (de l'anglès, *Mismatch Repair*) (2, 10, 12, 13).

El grup de gens *landscaper* es troba format per molècules de control de matriu extracel·lular i d'adhesió a superfície (p.ex. MMP7), marcadors i receptors de superfície i factors de creixement amb funcions importants en el control del microambient de la cèl·lula (7, 14). Com s'ha proposat des de fa uns anys, el desenvolupament i creixement del tumor no únicament depèn d'alteracions genètiques i epigenètiques si no també de les connexions intercel·lulars i de les condicions selectives del microambient tumoral (12, 15-17).

En els darrers anys s'ha descrit la via serrada com un camí alternatiu a les vies existents ja que no sembla seguir les seqüències de carcinogènesi clàssiques descrites. Són tumors que sorgeixen d'una lesió serrada, són pobrament diferenciats i apareixen com un event tardà però de progressió tumoral molt ràpida. Són molt freqüents les mutacions en el gen BRAF i poc habituals les de p53. En aquests tumors, a més, s'observen sovint silenciaments gènics per metil·lació de gens reparadors com MLH1 o proliferatius com BRAF (12). En el càncer colorectal les modificacions epigenètiques de l'ADN tenen un rol crucial en cada pas de la carcinogènesis i generen una complexa interacció amb altres alteracions genètiques (18). Les modificacions epigenètiques més freqüents i conegudes són les hipermetil·lacions en illes CpG en regions promotores de gens, les acetil·lacions d'histones i el silenciament gènic per miARNs (petits fragments de ARNs no codificants). Recentment Esteller M. i Lopez-Serra P. han demostrat que la repressió transcripcional mitjançant la hipermetil·lació de determinats miARNs amb funció supressora tumoral (característica comú de moltes cèl·lules tumorals) podria considerar-se un dels punts d'inici del desenvolupament del càncer en els estadis primerencs (19).

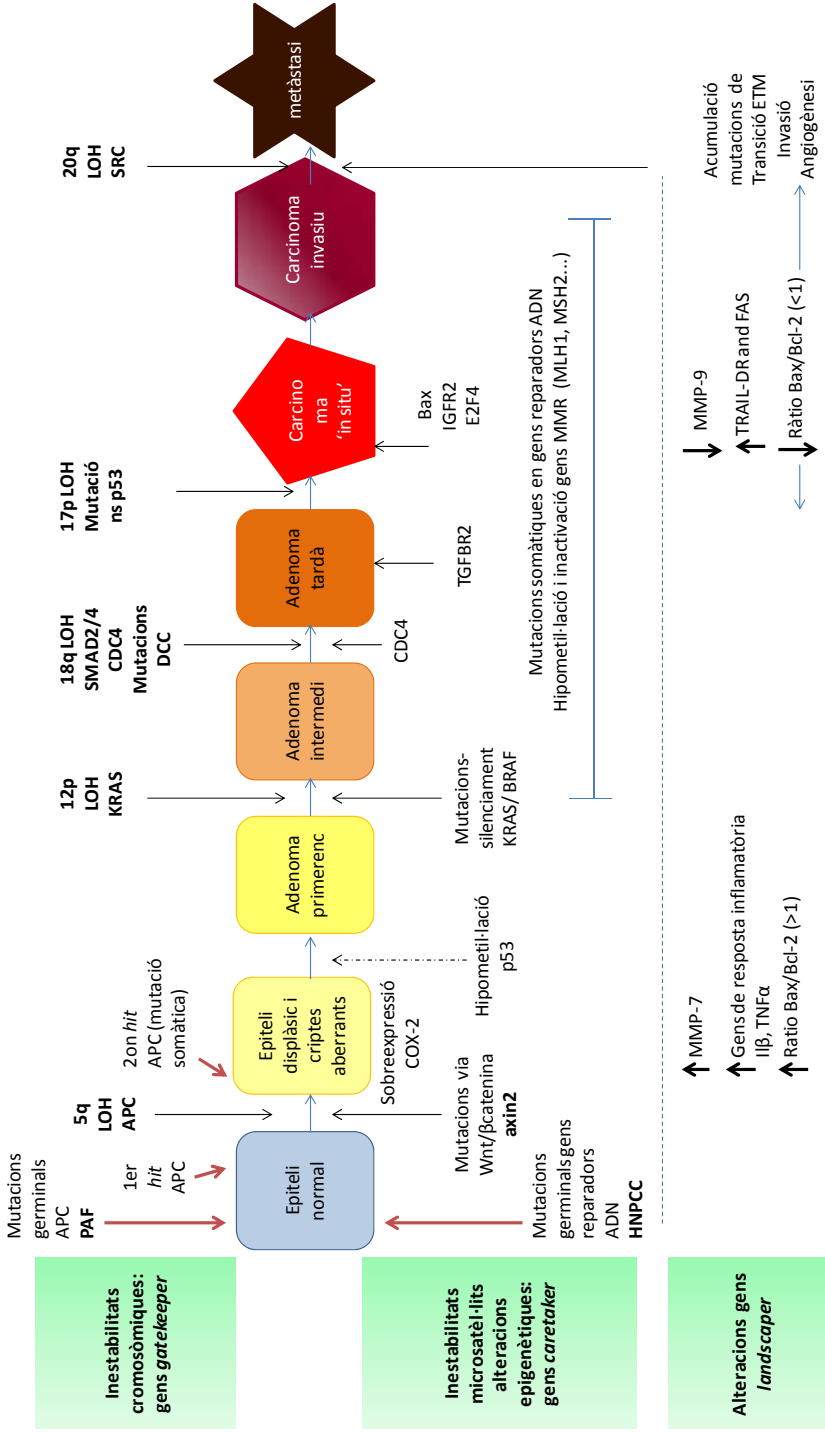


Figura 2. Procés de desenvolupament del càncer colorrectal i les alteracions genètiques, cromosòmiques i moleculars associades. ETM: transició epiteli-mesènquima

1.1.3. Tractament del CCR en la malaltia avançada i metastàtica

El principal tractament del CCR avançat o metastàtic és la quimioteràpia, habitualment poliquimioteràpia, per ampliar les possibilitats de resposta. Quan és indicat, la quimioteràpia es combina amb cirurgia de les metàstasis o amb radioteràpia, el que es coneix com a tractament multidisciplinar (2). Pel que pertany a la tesi que es presenta, el focus d'interès estarà centrat en el tractament del càncer colorectal metastàtic (CCRm).

Pel que fa a la malaltia metastàtica podem definir 3 grups de pacients segons l'aproximació terapèutica que plantejem: 1) pacient en que la malaltia metastàtica pot ser operable inicialment (sempre que es suposi que s'assolirà cirurgia amb eliminació complerta de la malaltia (R0)). 2) pacients que per extensió o factors de risc no es consideren resecables d'inici però que poden ser convertits en resecables amb tractament previ amb quimioteràpia. En aquests casos, en el cas de les lesions hepàtiques és criteri absolut per a la indicació de que el romanent hepàtic després de la cirurgia sigui suficient. 3) pacients que no seran mai operables per l'extensió o localització de la malaltia (1). Pel segon grup de pacients és necessari doncs, tenir i utilitzar esquemes de quimioteràpia que indueixin elevats índex de resposta, quedant en segon terme la supervivència que vindrà donada per la possibilitat de resecció de les metàstasis. En el tercer grup el màxim interès és la qualitat de vida i la prolongació, amb qualitat, de la supervivència.

La introducció als anys 90 de nous fàrmacs com oxaliplatí i irinotecan va possibilitar que la monoteràpia amb 5-fluorouracil (5FU), únic tractament fins al moment, es convertís amb poliquimioteràpia i possibilités segones línies de tractament inexistents fins aleshores (www.nci.gov) (2). Així mateix, també va

suposar una millora en la qualitat de vida d'aquests. Amb l'aplicació de la poliquimioteràpia amb capecitabina (CAPE), irinotecan (IRI), oxaliplatí (OXA) i les noves dianes terapèutiques, la mediana de supervivència s'ha prolongat dels 12 mesos -aconseguits inicialment amb 5FU- a gairebé 2 anys de vida (2). L'irinotecan ha demostrat eficàcia en el tractament en primera línia del càncer colorectal metastàtic (20). El fluorouracil pot ser substituït per capecitabina sense pèrdua d'eficàcia quan es combina amb oxaliplatí com demostraren els estudis del grup alemany d'estudi del càncer colorectal (AIO) i el grup cooperatiu espanyol de tractament de tumors digestius (TTD)(21, 22). Actualment, els dos esquemes quimioteràpics més acceptats i utilitzats per tractar el CCRm en primera línia són el 5FU i leucovorin combinat tant amb oxaliplatí (FOLFOX) com amb irinotecan (FOLFIRI) indistintament (23). Una altra opció a tenir en compte en primera línia del càncer colorectal avançat és la combinació de tots ells en l'esquema FOLFOXIRI, ja que suposa un benefici en resposta i supervivència lliure de malaltia (SLM) i supervivència global (SG) respecte al FOLFIRI (24).

En els darrers 6 anys totes les mirades han estat posades en les noves teràpies dirigides. Cetuximab, panitumumab i bevacizumab són els principals agent anti-diana aprovats i malgrat tot, els resultats obtinguts fins al moment són molt més discrets del que s'esperava (2). El bevacizumab és un fàrmac antiangiogènic capaç de normalitzar la vasculatura tumoral i permetre una millor alliberació del fàrmac al tumor. La seva associació amb els esquemes FOLFIRI i FOLFOX ha demostrat millora en els resultats del tractament (2, 25, 26).

La introducció del cetuximab ha suposat una alternativa a les opcions de tractament en la malaltia avançada al demostrar eficàcia en monoteràpia en tumors inicialment refractaris a quimioteràpia i ser capaç de revertir la resistència a IRI quan s'administra juntament amb aquest en segona línia de

tractament (27). La combinació de cetuximab amb FOLFIRI suposa un increment del temps lliure de malaltia (TLM) i un augment de la resposta global (estudi CRYSTAL) però no del temps a la progressió ni de la supervivència global quan es combina amb FOLFOX (estudi OPUS). Amb el descobriment de les mutacions en el gen KRAS, es va demostrar que els pacients amb mutacions en aquest gen no només no obtenen benefici del tractament amb cetuximab sinó que poden respondre pitjor. D'aquesta manera les dianes contra EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) només estan indicades actualment contra tumors KRAS *wild type*. Darrerament s'està estudiant el valor prospectiu de les mutacions en BRAF, conjuntament amb les de KRAS per seleccionar millor els pacients davant tractament amb anti-EGFR (28).

El panitumumab, anticòs monoclonal 100% humà contra EGFR, està indicat en primera línia i en segona i tercera línia de tractament de pacients refractaris a OXA i a IRI. En aquest cas, la determinació de l'estat mutacional de KRAS també és essencial per predir la resposta en pacients KRAS mutats (0% resposta; TLM 7,4 setmanes) (29, 30).

1.1.4. Resistència a quimioteràpia

Els tractaments de quimioteràpia es consideren eines essencials per combatre la progressió i disseminació del tumor, allargar la vida del pacient i millorar la seva qualitat de vida. Un dels esculls més importants per aconseguir bons resultats amb els tractaments antineoplàsics és l'aparició de resistència. Només un 10% aproximadament dels tumors del còlon es mostren inicialment resistents a la quimioteràpia mentre que la resta respon inicialment o s'estabilitza amb la quimioteràpia però durant el transcurs del tractament, les cèl·lules tumorals

desenvolupen nous mecanismes per escapar de la teràpia inicial i adquirir resistència (31).

La quimioresistència, ja sigui intrínseca o adquirida, és un procés complex, multifactorial i dinàmic en el que un gran nombre de mecanismes moleculars en son responsables, alguns d'ells ben coneguts i altres encara per descobrir. La cèl·lula cancerosa pot utilitzar estratègies diverses per vèncer o compensar l'acció dels antineoplàsics com alterar l'entrada/sortida, el metabolisme i la detoxificació del fàrmac, desacoblar vies de senyalització intracel·lular, interconnectar diferents receptors de membrana, modificar senyals de mort cel·lular o bé provocar interferències en la replicació de la cèl·lula com es mostra a la figura 3 (32-34).

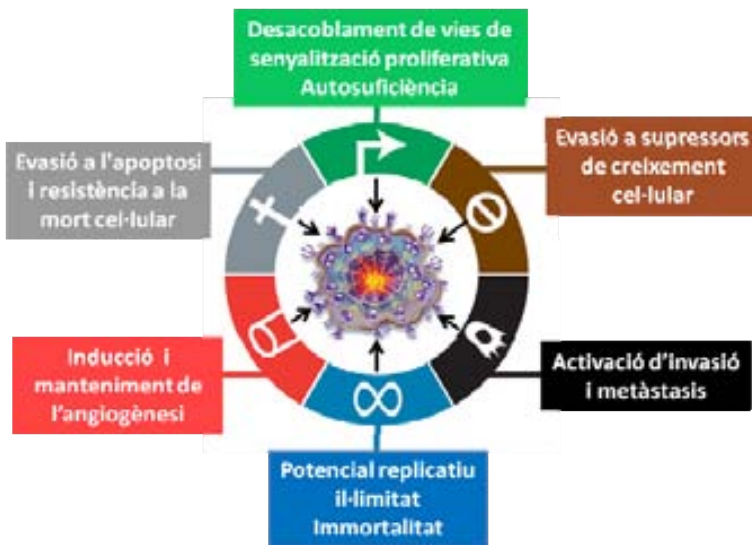


Figura 3. Factors principals involucrats en la resistència a quimioteràpia, en l'evolució del tumor i en la seva metastatització a altres teixits (modificat de Hanahan D. Cell 2011).

Les cèl·lules invencibles al tractament adquireixen noves característiques de supervivència de manera que, si son capaces de dividir-se, acaben formant una massa tumoral més resistent a la quimioteràpia que el tumor inicial. D'altra banda, l'heterogeneïtat del microambient en que es troba el tumor, tant el primari com la metàstasis, pot donar explicació a la gran varietat de respostes que poden desenvolupar tumors d'histologia similar davant un mateix tractament (16, 35, 36). La presència de cèl·lules mare tumorals en l'estroma del tumor també ha estat relacionada amb la resistència a quimioteràpia en diversos tumors (37, 38).

La introducció de la poliquimioteràpia va ajudar a pal·liar la resistència intrínseca i a incrementar les respostes al tractament en primera línia (36) però resulta insuficient en aquells pacients que mostren resistència a múltiples fàrmacs (*Multidrug Resistance*). En la dècada dels 1970s la glicoproteïna-P va ser descoberta com un dels biomarcadors de dita resistència (39) i anys després s'ha demostrat que membres de la família *ATP-binding cassette* relacionades al transport de fàrmacs com les proteïnes MRP1, MRP2 i ABCG2 entre d'altres, contribueixen de manera rellevant a la resistència a múltiples drogues antineoplàsiques (40-42).

1.1.5. Factors predictius

Al marge de la significació que puguin tenir alguns factors pronòstic com la pèrdua d'heterozigositat de gens supressors tumorals com p53 i APC o les inestabilitats genòmiques (CIN, MSI, etc.), la majoria d'ells encara en discussió, el focus d'aquesta tesi que es presenta està en la recerca de factors predictius de resistència i sensibilitat al tractament del càncer colorectal avançat. Avui en dia,

la determinació de la presència de mutacions en el gen KRAS és l'únic factor predictiu de resposta a cetuximab i panitumumab validat prospectivament, que s'utilitza en la pràctica clínica diària per seleccionar el tractament en els pacients de CCR metastàtic (43). Actualment l'anàlisi de mutacions molt menys freqüents en altres gens de la via (BRAF, PI3KCA, PTEN) han demostrat afegir valor a les mutacions de KRAS per seleccionar el tractament adient en pacients que, malgrat no presentar mutacions en KRAS, no responen al tractament amb aquestes molècules anti-diana.

Un altre camp interessant és el de l'estudi de marcadors predictius de l'eficàcia de la quimioteràpia, ja que, alguns d'ells han demostrat tenir un paper molt important en el metabolisme de quimiofàrmacs. Uns dels més estudiats són els del gen que codifica per a l'enzim timidilat sintasa (TYMS), diana terapèutica del 5FU. Com ha demostrat el nostre grup i d'altres en diversos treballs publicats, les variants genètiques en TYMS juntament amb la de gens de reparació de l'ADN com ERCC1 (*Excision Repair Complementary Group 1*), XRCC1 (*X-Ray Repair Complementary Group 1*) o XPD (*Xeroderma Pigmentosum group D*) tenen valor predictiu de resposta a quimioteràpia basada en 5FU i OXA en pacients de CCR avançat (33, 44-47). En el metanàlisi de Yin, M. i col·laboradors es validà el paper dels polimorfismes de ERCC1 i ERCC2 conjuntament en la predicció de resposta clínica a teràpia basada en oxaliplatí en càncers gàstrics i colorectals (48).

L'estudi d'altres polimorfismes genètics relacionats amb el metabolisme de les fluoropirimidines com la MTHFR (*5,10-metilentetrahidrofolat reductasa*) o la DPD (*Dihydropyrimidine dehydrogenase*) han intentat demostrar amb resultats força controvertits el seu valor predictiu de resposta al tractament basat en 5FU (49). L'oxaliplatí i l'irinotecan també han sigut fonts importants d'estudi per trobar marcadors moleculars que en puguin determinar la resposta i toxicitat a

aquests. L'estudi d'alteracions genètiques en enzims de detoxificació com la GSTP1 (*Glutathion S-Transferase P1*) per als agents platinats o de la UGT1A1 (*Uridin-diphosphat glucuronosil transferase*) en el cas de l'irinotecan, han demostrat tenir valor predictiu de toxicitat a ambdós fàrmacs (50).

FACTORS BIOLÒGICS
Oncogens: KRAS, EGFR, IGFR, TGFβ, BRAF, c-myc
Gens supressors tumorals /LOH: p53, p27, p21, APC, 18q LOH (DCC),MCC, SMAD2, SMAD4
Inestabilitats genòmiques: CIN, MSI, CIMP (fenotip metil·lador d'illes CpG)
Apoptosi: Bcl-2, BAX, Fas/CD95, PI3KCA
Gens reparadors: XRCC1, XPD, ERCC1, ERCC2, MLH1, MSH2
Proliferaió, invasió i metàstasi: Ki-67,CD44, VEGF, molècules d'adhesió cel·lular, E-cadherina, densitat microvasos sanguinis, metal·loproteinases de matriu, Upa, inhibidor de plasminogen, IL-8
Dianes terapèutiques: TS, Topoisomerasa-I, DPD, DHFR, UGT1A1, ATP7A, ATP7B

Taula 1. Biomarcadors moleculars proposats com a factors predictius de resposta a quimioteràpia per al tractament del càncer colorectal.

Les noves tendències utilitzades per a determinar marcadors predictius es basen en els estudis de perfils genètics i proteics mitjançant els rastreigs d'alt rendiment amb l'aplicació de tècniques com els *microarrays* o l'espectrometria de masses.

1. 2. QUIMIOTERÀPIA DEL CÀNCER COLORECTAL: OXALIPLATÍ

Els compostos platinats són àmpliament utilitzats com a agents quimioterapèutics per al tractament d'una gran varietat de càncers, sent gairebé els agents antitumorals més actius que s'administren en l'actualitat. Carboplatí i cisplatí (CDDP) han sigut utilitzats durant més de 30 anys per ser particularment

efectius contra tumors sòlids com el de testicle, ovari, el càncer de cap i coll i el càncer de pulmó de cèl·lula no petita (NSCLC). L'oxaliplatí ha demostrat tenir activitat citotòxica tant *in vitro* com *in vivo* en una àmplia varietat de models tumorals com el colorectal, de mama, el NSCLC i limfomes no-Hodgkin, a més de ser especialment efectiu contra tumors resistents a l'acció del cisplatí (51-56).

Descobert i patentat al Japó l'any 1979 pel professor Yoshinori Kidani, va ser inicialment desenvolupat com a tractament dirigit al càncer colorectal avançat. El 1994 Sanofi-Aventis va adquirir la seva llicència i es va comercialitzar amb el nom d'Eloxatin®, el qual s'aprovà inicialment a Europa (1999) i posteriorment als Estats Units l'any 2004 per la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (www.fda.gov/Drugs/DrugSafety). Diversos estudis clínics han demostrat la seva acció sinèrgica amb fluoropirimidines i àcid folínic quan s'administra en adjuvència en estadis de CCR avançat, al reduir significativament el temps de recaiguda i perllongar el temps fins a la progressió tumoral en comparació amb els esquemes inicials de monoteràpia amb 5FU (57, 58).

1.2.1. Farmacodinàmica i biotransformació de l'oxaliplatí

La molècula d'oxaliplatí [oxalat-(*trans*-1,2-diaminociclohexà)-platí] està composta per un àtom de platí que s'enllaça amb un lligand d'oxalat mitjançant un anell 1,2-diaminociclohexà (DACH) com es mostra a la figura 4. El seu pes molecular és de 397,3 g/mol. És lleugerament soluble en aigua, menys en metanol i pràcticament insoluble en etanol i acetona.

La seva administració es realitza per via intravenosa mitjançant infusió continua de 2-6 hores en tres fases: dues fases curtes de distribució i una fase llarga d'eliminació. Al finalitzar les 2 hores d'infusió el 15% del platinat es troba

present a la circulació i el 85% restant és ràpidament distribuït als teixits o eliminat per la orina. La unió irreversible dels platins a proteïnes plasmàtiques com l'albumina o les gammaglobulines pot arribar a representar més del 90% del total administrat.

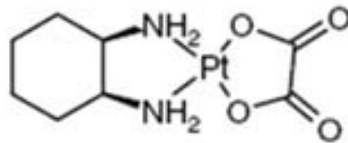


Figura 4. Estructura química de l'oxaliplatí.

El platí també es pot unir i acumular als eritròcits a on no sembla tenir una activitat rellevant. En el plasma, l'oxaliplatí es transforma ràpidament en diversos complexes podent arribar a formar més de 17 derivats intermedis de l'oxaliplatí, la majoria dels quals son farmacològicament inactius. L'OXA desenvolupa complexes biotransformacions per les quals el pro-fàrmac és activat per conversió de compostos mono-, dicloro i *diaqua* mitjançant hidròlisis no enzimàtiques i sense implicació del citocrom P450. Un cop desplaçat el grup oxalat, la nova molècula Cl_2 -DACH-Pt exercirà el seu efecte citotòxic dins de la cèl·lula (18, 59). L'eliminació de l'oxaliplatí es dona per via renal amb aclariment màxim a les 48 hores post-administració. Als 5 dies aproximadament s'ha eliminat el 54% de l'organisme per orina depenent del ritme de filtrat glomerular de cada pacient. Menys d'un 3% és eliminat per les femtes (60).

1.2.2. Mecanisme d'acció

Quan l'oxaliplatí entra al torrent sanguini perd el grup oxalat i incorpora dues molècules de clor a l'anell DACH formant l'estructura DACH-Pt-Cl₂. Aquesta

estructura entra a la cèl·lula per difusió passiva, encara que en determinades ocasions pot fer-ho per transport actiu a través de proteïnes transportadores.

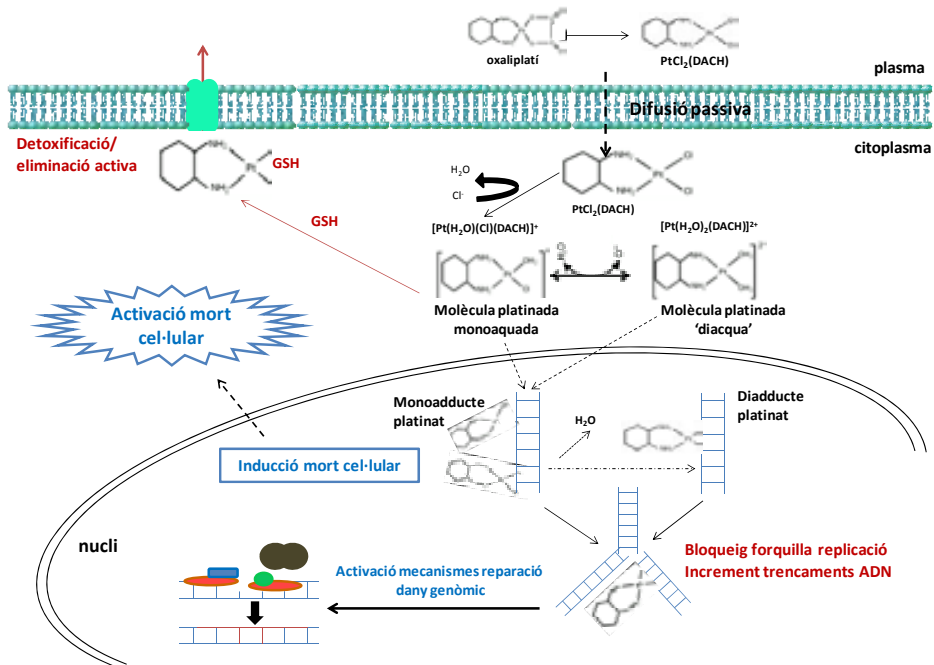


Figura 5. Procés de biotransformació i mecanisme d'acció de l'oxaliplatí.

Degut a la baixa concentració de clor dins de la cèl·lula, la molècula d'oxaliplatí substitueix els ions clor per dues molècules d'aigua convertint-se en una molècula "diaqua". Aquesta nova molècula carregada positivament és capaç d'interactuar amb molècules nucleofíliques com l'ADN, l'ARN i proteïnes, sent l'ADN la molècula diana de preferència (figura 5). La unió a l'ADN és dóna per l'àtom N7 dels anells imidazol de les bases puríniques adenosina (A) i guanina (G) arribant a ocasionar fins a 4 tipus diferents de lesió com es mostra a la figura 5 (61).

La majoria dels monoadductes d'ADN acaben reaccionant per a formar les unions entrecruades o *crosslinks*. Els entrecreuaments intracatenaris, una de les lesions més freqüents, es donen majoritàriament entre dues bases de guanina seguides (1,2d-GpG), una guanina i una adenina (1,2d-ApG) o entre guanina, base, guanina (1,3d-GpXpG), mentre que els entrecreuaments intercatenaris es generen entre bases de guanina de les dues cadenes d'ADN. Els adductes ADN-platí formats també poden unir-se a proteïnes. Hi ha més de 25 proteïnes amb certa afinitat per aquests adductes. Aquestes proteïnes poden actuar com a sensors del dany genòmic, segrestar factors de transcripció, aturar el cicle cel·lular o activar diverses cascades de senyalització entre d'altres funcions (59, 61).

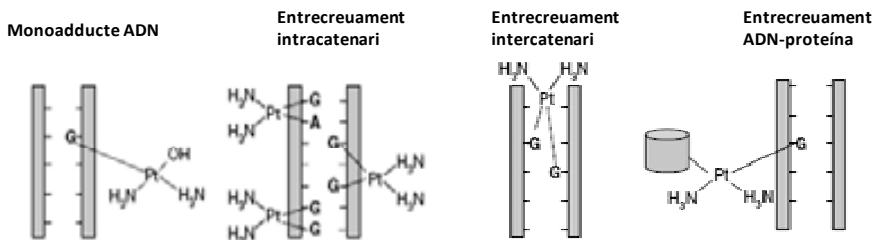


Figura 6. Tipus d'adductes generats entre l'ADN i l'oxaliplatí. Els agents platinats com l'oxaliplatí són capaços de reaccionar amb l'ADN per formar monoadductes, entrecreuaments intra- i intercatenaris i creuaments entre l'ADN i diverses proteïnes (Modificat de Rabik CA, Cancer Treat Rev 2007).

L'oxaliplatí pot actuar de tres maneres diferents per bloquejar la transcripció i replicació de l'ADN: 1) la formació dels adductes platinats poden atraure factors de transcripció al lloc del dany i evitar que aquests s'uneixin a regions promotores evitant la formació dels complexos de transcripció, 2) bloquejant l'accés a l'enzim polimerasa quan la lesió es troba a la cadena transcriptora ó 3) els adductes poden alterar la estructura i mobilitat de la cromatina i dels nucleosomes. Conseqüentment, l'oxaliplatí altera la capacitat reparadora de la

cèl·lula i activa diverses vies de traducció de senyals que, en funció del dany generat, provocaran la seva mort (62).

A concentracions equimolars entre agents platinats, els adductes ADN-platí generats per l'OXA són menys nombrosos però es formen molt més ràpid que en el cas del cisplatí i amb efectes citotòxics similars. La formació d'un angle de lligadura diferent entre el platí i els nucleòtids i uns adductes més voluminosos i hidrofòbics són característiques que poden contribuir a una major eficàcia de l'oxaliplatí. D'altra banda la unió de l'anell DACH impedeix que es puguin unir proteïnes de la via de reparació d'aparellaments erronis MMR, sistema elemental en la resposta al dany per cisplatí. Aquest fet podria donar explicació a l'absència de resistència creuada entre aquests dos agents platinats i a la resposta de l'oxaliplatí en tumors refractaris a cisplatí (63).

1.2.2.1. Reconeixement d'adductes platinats i aturada del cicle cel·lular

El dany a l'ADN resultant de l'exposició a oxaliplatí indueix l'arrest del cicle cel·lular principalment en les transicions G1-S i/o G2-M. Les proteïnes HMGB (*High-Mobility Group Protein B1*), ATM/ATR (*Ataxia-telangiectasia mutated/ATM-Rad3-related*) i γ -H2AX (gamma-histona 2AX) poden actuar com a sensors del dany genòmic provocat per oxaliplatí. D'una banda ,HMGB1 és un factor nuclear que genera torsions a l'ADN permetent l'accés de proteïnes transcripcionals. És capaç de reconèixer adductes platinats, unir-se a les lesions intracatenàries i bloquejar l'arribada de factors de transcripció a la lesió i, conseqüentment, evitar la reparació del dany per la via NER (reparació per escissió de nucleòtids) (51, 61). D'altra banda, γ -H2AX és un sensor de trencaments de doble cadena capaç d'incrementar els seus nivells d'expressió i

la seva activitat nuclear en resposta a oxaliplatí, afavorint d'aquesta manera el reclutament de proteïnes de reparació al lloc de la lesió (64).

El dany en l'ADN provoca l'activació de quinases *upstream* com ATM/ATR i DNA-PK (*ADN-dependent kinase*), les quals poden, directa o indirectament, activar la proteïna p53, el supressor tumoral més important de la cèl·lula. La fosforilació de p53 per aquestes quinases incrementa l'estabilitat de la proteïna al inhibir la seva interacció amb Mdm2 (regulador negatiu de p53). El paper de p53 determinant el destí de la cèl·lula s'atribueix a la seva funció com a factor de transcripció de gens que poden induir l'aturada del cicle cel·lular com són p21, GADD45 o 14.3.3 σ i concedir temps a la cèl·lula per reparar el dany generat per l'oxaliplatí (65). La proteïna p21 inhibeix el complex ciclina D/CDK4 aturant sistemàticament el cicle cel·lular en fase G1/S, mentre que 14.3.3 σ inactiva ciclina B1/CDK1 aconseguint retenir les cèl·lules en la fase G2/M prèvia a mitosi.

D'altra banda, el dany genòmic a la vegada que regula positivament p53, també activa "controladors" de cicle cel·lular com són les proteïnes Chk1 i Chk2. El punt prioritari de l'oxaliplatí per aturar les cèl·lules és la transició G2/M, la qual serà reversible o irreversible depenent de la dosi, l'estat mutacional de p53 i el temps d'exposició a aquest (66, 67). Aquestes proteïnes de control, i en especial Chk1, tenen un paper important en aquest punt. Volland, C. i col·laboradors demostraren *in vitro* que l'oxaliplatí provoca una disminució significativament marcada de l'expressió de ciclins A i B, CDK1, cdc25 i cdc2 (factors específics de fase G2) aconseguint aturar el cicle en fase G2 per evitar possibles segregacions cromosòmiques aberrants durant la mitosi (68). Tots aquests mecanismes activats són estratègies per a concedir a la cèl·lula temps per poder reparar el dany o bé activar programes de mort cel·lular.

1.2.2.2. Reparació de les lesions

Un cop detectat el dany, les diferents vies de reparació de l'ADN s'activen en funció del tipus de lesió i de la fase del cicle cel·lular en que es trobi la cèl·lula (69). Els sistemes de reparació de l'ADN són uns dels mecanismes de defensa més antics i conservats al llarg de l'evolució. Quan la lesió afecta únicament a una de les cadenes (*Single Strand Break*), s'activen sistemes de reparació de dany simple com les vies NER, BER (*Base Excision Repair*) i MMR. Si per contra, el dany involucra les dues cadenes d'ADN (*Double Strand Break*) entren en joc les vies de reparació de Recombinació Homòloga (HR) i NHEJ (*non homologous end joining*). Malgrat que les lesions de trencament de doble cadena suposen una gran amenaça per a l'estabilitat del genoma (69), aquests sistemes no acostumen a ser les principals vies de reparació de lesions generades per oxaliplatí (59, 61).

El sistema de reparació BER detecta i repara petites lesions de cadena simple provocades per alteracions químiques que no suposen una distorsió de la doble hèlix (raigs X, radicals d'oxigen, agents alquilants, etc.). Generalment són lesions endògenes que poden impedir la transcripció i reparació de l'ADN. S'ha relacionat poc aquesta via amb la resposta al dany per oxaliplatí ja que, encara que estudis recents han demostrat que l'oxaliplatí genera radicals lliures en les cèl·lules tumorals provocant un dany oxidatiu que, consegüentment, podria activar aquest sistema de reparació (70-72), altres autors com Preston, T.J. i cols. han demostrat que la activació de la via BER per dany oxidatiu només sembla estar vinculada a al cisplatí (73). D'altra banda, PARP (*Poli-(ADP-ribose) polimerase*), proteïna nuclear capaç de detectar i senyalitzar trencaments de cadena simple, pot unir-se tant a adductes formats per cisplatí com per oxaliplatí i participar en la reparació del dany reclutant proteïnes de resposta al dany

genòmic d'aquesta via BER com són XRCC1, ADN polimerasa β o ADN ligasa III (74).

El principal mecanisme de detecció d'errors produïts durant la replicació de l'ADN és el sistema MMR (75). Aquest també és capaç de reconèixer aquells errors que no hagi reparat el sistema NER i és la principal via de reparació de lesions provocades per carboplatí i cisplatí. En canvi, no resulta eficient davant l'oxaliplatí al no ser capaç de reconèixer els adductes generats per l'anell DACH. La utilització de vies de reparació diferents entre ambdós platins podria justificar perquè l'oxaliplatí pot provocar una resposta citotòxica en tumors refractaris a l'acció del cisplatí (59, 61).

La via NER és el sistema de reparació més universal i activat amb més freqüència si es té en compte la diversitat de lesions sobre les que actua. És responsable d'eliminar adductes voluminosos causats per agents carcinògens així com per radiació ultraviolada (76) i fins i tot algunes formes de dany oxidatiu. Està formada per un complex multiproteic de més de 25 proteïnes i es pot categoritzar en dues classes: 1) GG-NER (*global genome-NER*) que repara específicament danys que es donen en regions no-transcrites de l'ADN i 2) TC-NER (*Transcription Coupled-NER*), encarregada de remoure aquells adductes formats en gens transcrits, és a dir, adductes formats únicament en la cadena transcriptorària (77). Com es mostra a la figura 7, quan l'ADN distorsionat per les lesions és reconegut, la via NER s'encarrega d'obrir la doble hèlix amb l'ajut de les helicases XPB i XPD (*Xeroderma Pigmentosum B i D*) per permetre arribar al punt de lesió a les endonucleases XPF/ERCC1 que trencaran un fragment de uns 30-35 nucleòtids en el que està inclòs l'ADN danyat. Finalment, la maquinària de replicació omplirà el forat generat i es restaurarà la continuïtat de l'ADN (76).

ERCC1 i les proteïnes de la família XP, i més concretament XPA i XPD són les proteïnes més importants implicades en aquest mecanisme de reparació (51).

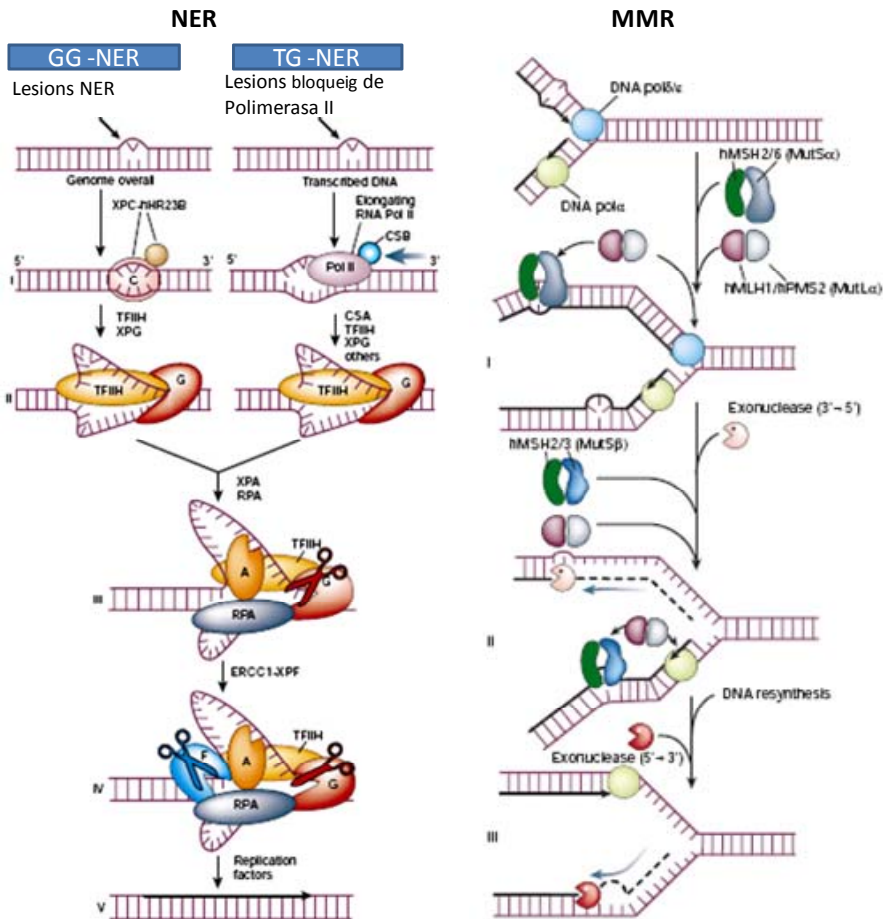


Figura 7. Representació esquemàtica de les dues vies principals de reparació del dany de simple cadena involucrades en la resposta a oxaliplatí i cisplatí (Hoeijmakers JH et al. Nature 2001).

La via NER és el principal sistema de reconeixement i reparació del dany provocat per oxaliplatí, i és capaç de reconèixer amb la mateixa eficiència els adductes generats per cisplatí (59).

1.2.2.3. Activació de mort cel·lular

La incapacitat de la cèl·lula per reparar tot el dany ocasionat per l'agent platinat la condueix a la mort. Mentre que el cisplatí depèn d'un sistema MMR intacte per assolir la seva toxicitat màxima, l'acció citotòxica de l'oxaliplatí depèn d'altres mecanismes, la majoria d'aquests encara per descobrir. Aquestes diferències entre cisplatí i oxaliplatí per activar diferents vies de transducció de senyals contribueixen a les diferències en la seva capacitat per induir la mort cel·lular (61).

L'exposició de les cèl·lules de càncer colorectal a concentracions rellevants d'oxaliplatí redueix significativament el seu ràtio de creixement. L'activació de la mort cel·lular per part de l'oxaliplatí pot ser a través de diversos mecanismes com l'apoptosi, la necrosi i/o la catàstrofe mitòtica. Les cascades de senyalització que porten a l'apoptosi es poden dividir en 2 grups: via intrínseca i via extrínseca. En la via intrínseca membres pro i anti-apoptòtics de la família Bcl-2 incloent Bax, Bak i Bcl-xL, tenen una funció important. En aquesta via, a més, la mitocondria té un paper clau al desencadenar la cascada d'activació. Després de rebre l'estímul, Bax, proteïna pro-apoptòtica d'aquesta família, i sota control de la proteïna p53, transloca a la membrana mitocondrial externa per permetre l'alliberament del citocrom c. Una vegada es troba el citocrom c al citosol, promourà la formació de l'apoptosoma i l'activació de caspasa-9 i finalment caspasa-3. Tant p53 com Bax han demostrat ser clau en la resposta a oxaliplatí en aquest procés (66).

En la via extrínseca d'apoptosi, l'activació de les caspases ve iniciada per receptors de mort (DR) localitzats a la superfície cel·lular. L'associació del

receptor Fas amb el seu lligand FasL, permet la formació del complex de senyalització inductor de mort (DISC) i l'activació autocatalítica de caspasa-8.

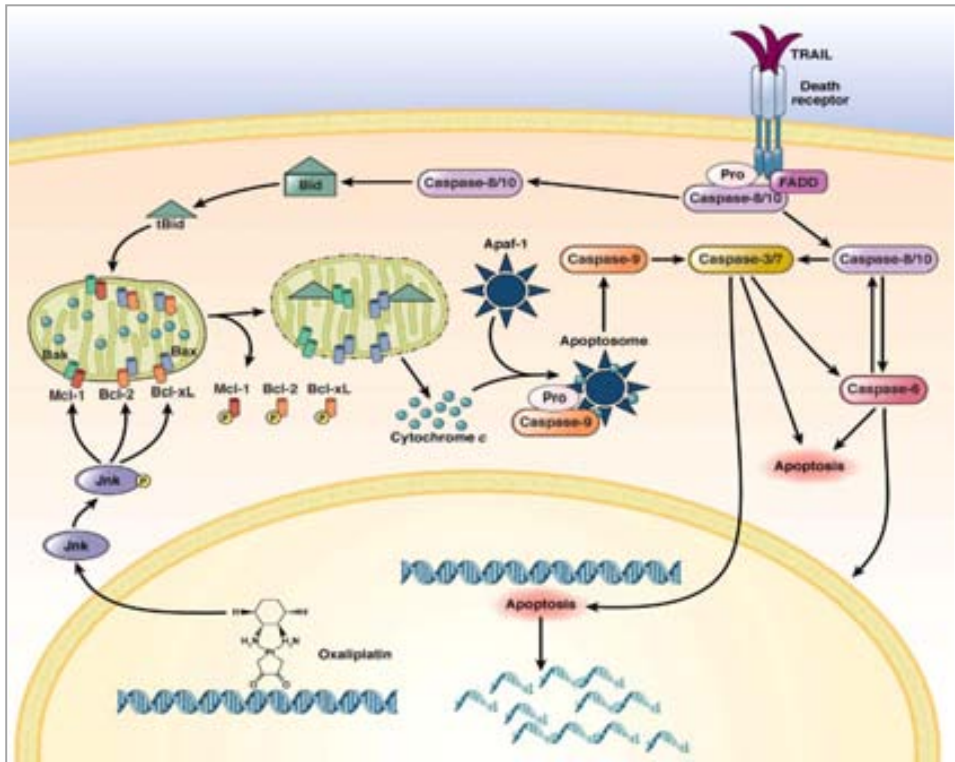


Figura 8. Esquema simplificat de les vies apoptòtiques activades com a resposta al dany provocat en l'ADN per l'oxaliplatí. Del dany generat per oxaliplatí, dependent del tipus cel·lular, s'activen les vies intrínseca i extrínseca de programació de la mort de la cèl·lula.

A la figura superior es mostren esquematitzades les dues vies principals de mort cel·lular activades per l'acció de l'oxaliplatí. L'activació de la via extrínseca en resposta a aquest platínat podria ser tumor-dependenta ja que, mentre Arango, D. i cols. no troben una implicació important en els lligands Fas/FasL en activar aquesta via en la línia d'adenocarcinoma de còlon HCT116 (66), Marchetti i cols. demostraren que està involucrada en la inducció d'apoptosi en la línia HCT15,

també procedent de còlon, (78). D'altra banda, TRAIL és un lligand que s'uneix als receptors de mort DR4 i DR5 per desencadenar la via apoptòtica extrínseca. Fins fa poc es coneixia que la via c-JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) només s'estimulava amb cisplatí però recentment s'ha demostrat que l'oxaliplatí juntament amb TRAIL tenen un efecte sinèrgic sobre l'activació d'apoptosi per via extrínseca a través de l'activació de c-JNK i de fosforilació del factor anti-apoptòtic Bcl-xL (79).

L'oxaliplatí també ha demostrat ser capaç d'incrementar la fosforilació de p38-MAPK, amb la posterior activació de les caspases 3 i 9, activant la mort cel·lular per via intrínseca. A part, la sobreactivació de p38 també porta a disminuir l'expressió de survivina (80, 81). En estudis realitzats amb línies cel·lulars d'adenocarcinoma gàstric i esofàgic es va demostrar que com a conseqüència del tractament amb aquest platí, els nivells de survivina disminueixen significativament i conseqüentment s'activen altres vies de mort cel·lular com la catàstrofe mitòtica. Aquest fet demostra que per una banda la survivina està regulada per oxaliplatí i d'altra banda, que la capacitat de l'oxaliplatí per induir les diferents formes de mort cel·lular contribueixen a la seva eficàcia com a agent citotòxic i antineoplàsic (82).

L'autofàgia està entesa com a un sistema de reciclatge cel·lular en que components del citoplasma son segrestats i transportats dins lisosomes o vacuoles a on es trenquen en els seus components bàsics i retornen al citosol per a ser reutilitzats. L'autofàgia té l'habilitat de mantenir l'homeòstasi intracel·lular i juga un paper important en la protecció davant el dany genòmic. Una total inhibició d'autofàgia pot provocar un dany genòmic molt més seriós que pot arribar a ser letal per la cèl·lula (83). En els darrers anys s'ha suggerit que existeix una connexió estreta entre apoptosi i autofàgia i l'activació o inhibició d'una o

altra per tractaments anti-tumorals, pot suposar un impacte important en l'eficàcia d'aquests fàrmacs (84, 85). A més, recents estudis han demostrat que la regulació de l'autofàgia es troba associada amb la distribució subcel·lular de p53, ja que quan aquesta es troba al nucli cel·lular activa autofàgia però quan la seva localització és mitocondrial aquesta es troba inhibida (86). En els darrers anys també s'ha pogut demostrar que la inhibició de l'autofàgia mitjançant el silenciament de gens involucrats com ATG7, incrementa la sensibilitat a oxaliplatí en línies cel·lulars i pacients amb hepatocarcinoma (87, 88). Es necessiten més estudis per definir el paper de l'autofàgia en la resposta als agents anti-tumorals.

1.2.3. Resistència a oxaliplatí

L'habilitat dels complexos platinats per inhibir el creixement tumoral es deu a la capacitat de difusió de l'oxaliplatí a través de la membrana plasmàtica, la seva acumulació intracel·lular i la seva capacitat per reaccionar amb l'ADN nuclear (51). Però la cèl·lula té mecanismes propis de defensa i evasió de l'efecte citotòxic d'aquest agent. És capaç de prevenir la formació d'adductes platinats, d'eliminar-los o fins i tot 'd'ignorar' la lesió i seguir replicant l'ADN o bé pot evadir la mort cel·lular per diversos mecanismes que es detallen a continuació.

1.2.3.1 Alteracions en la captació, acumulació i eliminació

Un dels principals mecanismes de resistència als agents platinats ve del balanç net entre l'entrada, segrest i alliberament del fàrmac dins la cèl·lula. Prèviament es va considerar la difusió passiva com el procés dominant involucrat en la captació i distribució de l'oxaliplatí, però en els darrers anys el concepte de transportadors i captació activa dels agents platinats està essent acceptat (89).

Transportadors de membrana com els OCTs (*Organic Cation Transporters*) o els CTRs (de l'anglès *Cooper Transporters*, transportadors del coure) han sigut relacionats amb l'entrada dels platins a la cèl·lula mentre que proteïnes ATP7A i ATP7B (*cooper transporting P-Type ATP-ases A and B*) s'han involucrat en l'acumulació i eliminació d'aquests. Els OCTs, poden limitar l'entrada als agents platinats i determinar la sensibilitat i resistència del tumor, afectant a la cinètica i toxicitat generada per aquests (90).

L'oxaliplatí ha demostrat ser un excel·lent substrat d'OCT2 i s'ha hipotetitzat que la seva expressió pot modular la sensibilitat a oxaliplatí en el CCR i determinar la resistència dels pacients tractats amb aquests règims (91). CTR1 és una proteïna que regula els nivells intracel·lulars de coure i és mediador de l'influx de cisplatí, carboplatí i oxaliplatí. El coure i el platí tenen similars característiques d'unió a sulfurs i per aquest motiu es suggereix que CTR1 podria tenir un mecanisme similar pel transport dels agents platinats. Malgrat tot, avui en dia els resultats publicats sobre la relació de CTR1 i els compostos platinats són controvertits. Mentre Larson, C.A. i col·laboradors afirmen que aquest transportador pot determinar la sensibilitat a cisplatí, carboplatí i oxaliplatí platinats tant *in vitro* com *in vivo* (92), altres autors afirmen que CTR1 no mostra cap control sobre l'acumulació i efecte citotòxic d'aquests compostos (90, 93).

De la mateixa forma que CTR1, les proteïnes ATP7A i ATP7B estan implicades en la homeòstasi del coure. Aquests enzims ATPases segresten i transporten el coure des de la xarxa *trans-Golgi* fins a la membrana plasmàtica i de la mateixa manera es creu que ho poden fer amb els platins. ATP7A ha estat involucrada amb el segrest d'oxaliplatí i els seus anàlegs en els diversos compartiments cel·lulars, alterant a la capacitat citotòxica de tots ells (94).

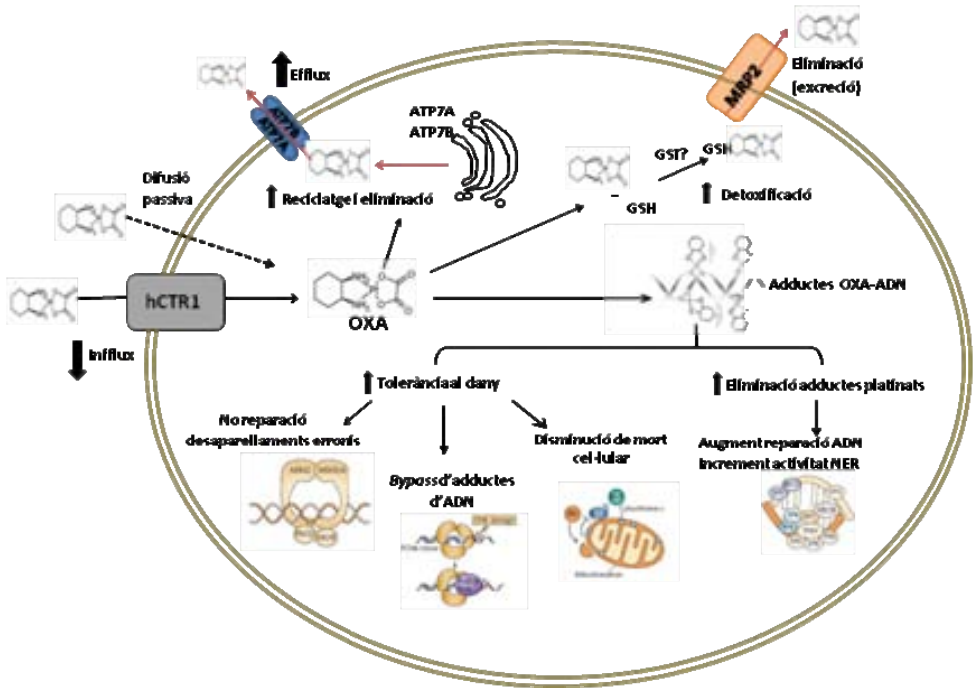


Figura 9. Principals mecanismes que la cèl·lula tumoral pot adoptar per ser resistent a l'acció de l'oxaliplatí. L'entrada i sortida del fàrmac, la metabolització i detoxificació, les proteïnes relacionades amb el reconeixement i reparació dels adductes generats així com les vies involucrades en la mort cel·lular estan representats.

Diversos estudis *in vitro* han relacionat nivells elevats d'ATP7A i ATP7B en línies tumorals amb una disminució en l'acumulació de cisplatí intracel·lular i de la seva activitat. En un estudi previ del nostre grup es relacionaren els nivells de ATP7A i ATP7B amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí en línies cel·lulars de càncer colorectal humà (95) i en un treball posterior es demostrà que nivells elevats d'ATP7B s'associen amb mal pronòstic en pacients de CCR avançat que reben quimioteràpia basada en oxaliplatí, proposant-se aquesta proteïna com a possible marcador de resistència a aquest platinat (34).

D'altra banda, els complexos platinats poden unir-se a molècules que contenen sulfur com el glutatió o aquelles riques en grups -tiol com les metal·lotioneïnes i tioneïnes. Els nivells de metal·lotioneïna i tioredoxina han sigut relacionats amb la resistència a CDDP però no a oxaliplatí (61). Les Glutatió-S-Transferases (GSTs) són una família d'enzims metabòlics fase II encarregats de l'eliminació de compostos "nocius" per la seva conjugació amb glutatió. Aquestes molècules tenen elevada afinitat per l'àtom de platí de la molècula d'OXA i poden unir-se a aquest ràpidament exercint un efecte "segrestador" que limita el seu efecte citotòxic. La inactivació prèvia de grups -tiol intracel·lulars podria reduir aquest efecte segrestador (51).

Diversos polimorfismes genètics d'aquest enzim s'han relacionat amb la capacitat citotòxica i la sensibilitat de l'oxaliplatí. Gnoni, A et. al. proposen GST π com a principal marcador de toxicitat per oxaliplatí (96) i Noda, E. i cols. han demostrat recentment per tècniques immunocitoquímiques que la disminució -o no expressió- d'aquest gen es correlaciona amb un increment de la resposta a L-OHP (97). D'altra banda, la variant Val/Val en l'exó 5 del gen GST π té una menor activitat enzimàtica i pot incrementar l'acció del fàrmac i disminuir el risc de desenvolupar neuropatia severa relacionada al oxaliplatí, traduint-se en un millor pronòstic en aquells pacients amb càncer colorectal avançat tractats amb quimioteràpia basada en oxaliplatí (98, 99).

1.2.3.2. Defectes en la reparació del dany a l'ADN

La capacitat de les cèl·lules per reparar les lesions induïdes per l'oxaliplatí és un factor important que determina la seva toxicitat. La presència de certs

polimorfismes i mutacions en gens de les vies reparadores poden incrementar la capacitat d'eliminar el dany generat per l'OXA.

Els polimorfismes trobats en gens de la via de reparació BER estan associats principalment amb susceptibilitat a patir certs càncers i a la no resposta a platins. L'increment d'activitat del sistema BER només s'havia relacionat a resistència a cisplatí (73) fins que en 2001 Stoehlmaker J. i col·laboradors van demostrar en pacients de càncer colorectal avançat, que la substitució Arg399Gln en el gen XRCC1 correlacionava amb la resposta a teràpia basada en oxaliplatí, mostrant un risc 5 vegades superior de no respondre al tractament en comparació als portadors de l'al·lel *wild type* (Arg) (100). Posteriorment, Martínez-Balibrea i cols. provaren que el genotip desfavorable suposa un pitjor temps a la progressió i per tant un pitjor pronòstic al tractament amb oxaliplatí en malalts de CCR tractats en primera línia amb 5FU i OXA (33).

Les cèl·lules amb un sistema MMR deficient adopten un fenotip "mutador" en el que el nombre de mutacions és major i la inestabilitat de microsatèl·lits és freqüent. La resistència a agents de dany a l'ADN s'ha associat a deficiències en el sistema MMR però únicament s'ha pogut demostrar en relació a cisplatí i carboplatí i no a oxaliplatí (101-103).

ERCC1 és un enzim clau en la via de reparació de nucleòtids NER, responsable de reparar els adductes induïts per compostos platinats com s'ha mencionat anteriorment. Té un paper important en la resistència a platins, tant a CCDP com a OXA (104). Estudis tant *in vitro* com *in vivo* amb diversos tumors com ovari, pulmó i còlon han demostrat que existeix una relació entre aquest gen i la resposta al tractament amb platins. Certs treballs han demostrat que l'expressió de ARNm d'ERCC1 és elevada en línies de CCR i d'ovari resistents a oxaliplatí (105, 106). A més, la inhibició de ERCC1 en línies de carcinoma ovàric va suposar

un increment de la sensibilitat a cisplatí en comparació amb les línies sensibles i en també en ratolins xenoimplantats (107). De manera inesperada, la inhibició del gen ERCC1 amb l'ús de siRNAs en línies de CCR no és capaç d'alterar la sensibilitat a aquest (108). Els tumors resistents a platins mostren nivells molt superiors d'ERCC1 en comparació als dels tumors responedors a aquests però no s'ha pogut relacionar fins al moment amb un increment de la capacitat reparadora dels adductes formats per oxaliplatí (109). En clínica, el polimorfisme genètic C118T ha estat associat amb una menor supervivència en pacients amb càncer colorectal avançat tractats amb 5FU/OXA (44) i altres estudis com el de Shirota i cols. han mostrat una correlació inversa entre els nivells d'expressió (tant ARNm com proteïna) d'aquest gen i la resposta a oxaliplatí en pacients amb CCR avançat resistents a 5FU (106).

XPD és una helicasa que forma part del complex TFIIH de la via de reparació NER. El polimorfisme descobert en el codó 751 va portar a observar que els pacients amb CCR metastàtic tractats amb teràpia basada en 5FU i oxaliplatí portadors del genotip Lys/lys responen millor al tractament i tenen una supervivència superior que els que tenen al menys un al·lel desfavorable o cap favorable (17,4 mesos vs 12,8 mesos vs 3,3 mesos) (110).

Bypass Replicatiu

En algunes línies cel·lulars tumorals la tolerància als platins pot aparèixer sense la necessitat de reparar l'ADN i per això existeixen diverses polimerases aptes per "sobrepasar" la lesió i continuar replicant l'ADN. Un increment en l'activitat d'aquests enzims permetria sobreviure sota condicions en les que la càrrega d'adductes resultaria letal per a una cèl·lula normal. Mentre que les clàssiques ADN polimerases α , δ i ϵ no són capaces de fer-ho, les ADNpol β , γ , ζ i η poden

saltar els adductes (principalment intracatenaris) de cisplatí i oxaliplatí per síntesi translesió. Diversos treballs han demostrat que la inhibició de ADN polimerasa β incrementa significativament la sensibilitat a cisplatí, carboplatí i a oxaliplatí. Les polimerases γ , ζ i β a baixes concentracions tenen preferència pels adductes d'oxaliplatí abans que pels seus anàlegs, demostrant una vegada més les diferències en els mecanismes d'acció entre aquests tres platins. Una característica comú trobada en cèl·lules tumorals amb resistència adquirida a L-OHP és el desenvolupament d'una major tolerància als adductes platinats. Tant p53 com les proteïnes dels sistemes de reparació MMR i NER juguen un paper important modulant l'extensió pel que el *bypass* té lloc (59, 61, 111).

1.2.3.3. Alteracions en l'activació de mort cel·lular

La proteïna p53 té un paper fonamental en determinar la sensibilitat dels tumors a l'oxaliplatí. Aproximadament el 50% de tots els tumors humans presenta mutacions en p53 (112). Les cèl·lules de CCR en que aquesta mutació representi un guany de funció han mostrat ser més resistents a l'acció citotòxica de l'oxaliplatí però no del cisplatí (113). D'altra banda s'ha demostrat que la inactivació de p53 pot conduir a un increment de la resistència a oxaliplatí, però d'altres demostren el contrari (114, 115) arribant a la conclusió de que l'estat mutacional de p53, és una condició essencial, però no exclusiva, de les cèl·lules colorectals en la determinació de la sensibilitat a OXA. Indirectament, la inhibició o down-regulació de p21 (dependent de p53), també s'ha associat a un increment de la IC_{50} a oxaliplatí en les cèl·lules tumorals (113).

Com s'ha mencionat anteriorment, la integritat de la membrana mitocondrial i consegüentment, la capacitat d'activar apoptosi, està governada pels diferents membres pro- i anti-apoptòtics de la família Bcl-2. L'increment i decrement de

Bax i Bcl-2/Bcl-xL respectivament té com a conseqüència l'activació de mort cel·lular en resposta a oxaliplatí (116). Però, en diferents tipus de línies tumorals, independentment del tractament, Bcl-2 i Bcl-xL es sobreexpressen, a la vegada que Bax i Bak poden estar significativament menor expressats, afavorint a la tolerància als platins. Mutacions de canvi en la pauta de lectura (*frameshift mutations*) i de pèrdua de funció (LOH) en el gen Bax també poden contribuir a l'adquisició de resistència a oxaliplatí (117, 118).

En quant a la participació de la via extrínseca en la resistència a oxaliplatí hi ha força controvèrsia. No tots els treballs han pogut demostrar un efecte directe entre oxaliplatí i mort cel·lular mediada per via extrínseca (119, 120). Sí en canvi Almendro, V. i cols. mostraren com els nivells de la metal·loproteasa MMP7 en línies d'adenocarcinoma de còlon augmenten durant l'adquisició de resistència a L-OHP i protegeixen la cèl·lula de la mort induïda per Fas al reduir el nombre de receptors en membrana i trencar i inactivar el seu lligand FasL (121).

També la sobreexpressió de c-FLIP_L inhibeix l'apoptosi de les línies de CCR en resposta a oxaliplatí així com a 5FU i CPT11. Aquest fet és d'elevada importància donada l'elevada freqüència de sobreexpressió de c-FLIP_L en tumors gàstrics i colorectals (122, 123). S'ha hipotetitzat que l'augment de quimioresistència en les línies cel·lulars que sobreexpressen aquesta proteïna podria donar-se per activació, directa o indirecta, de vies intrínseques de supervivència a través de mediadors com NF- κ B i PI3K (124). NF- κ B és una proteïna de supervivència hiperactivada en tumors resistents a oxaliplatí. En un estudi genòmic comparatiu del nostre grup en el que s'estudiaven les diferències entre quatre línies de CCR sensibles a oxaliplatí i les seves derivades resistents es van identificar 3 gens, AKT1, CDK5 i TRIP, relacionats als processos d'adquisició de resistència. Els baixos nivells de TRIP i els elevats nivells d'AKT1 i CDK5 podrien contribuir a

l'activació de la via NF- κ B en les línies resistents i conseqüentment de la seva activitat anti-apoptòtica (125). A més, experiments posteriors en el nostre laboratori han demostrat com la inhibició de CDK5 amb siRNAs específics, pot revertir dita resistència en aproximadament un 50% i com la via NfKB es troba altament activada en aquestes cèl·lules resistents (126, 127).

D'altra banda, en un ampli rang de tumors humans s'ha observat un increment significatiu d'expressió de survivina (128) en relació amb un increment en la inhibició de la mort cel·lular induïda per agents antineoplàsics com el taxol o l'oxaliplatí (81, 82, 129).

1.2.3.4. Microentorn i capacitat invasiva

L'heterogeni microambient en el que es troben els tumors sòlids pot condicionar la resposta als agents citotòxics. El tipus d'interacció amb la matriu extracel·lular, el nivell d'hipòxia, les alteracions de pH o la vasculatura generada que envolta el tumor poden ser determinants de la quantitat de fàrmac que arriba al tumor i de la seva distribució i per tant, de la seva eficàcia antineoplàsica (17). En un treball recent s'ha demostrat com processos cel·lulars com l'autofàgia de les cèl·lules de l'estroma tumoral participen en la promoció del creixement tumoral i posterior invasió a altres teixits (130).

El canvi cel·lular epiteli-mesènquima (E-M) és un procés en el que les cèl·lules perden les seves característiques epitelials i guanyen propietats mesenquimals que faciliten la motilitat i la invasió. En diversos estudis s'ha evidenciat que les cèl·lules resistents a oxaliplatí mostren un fenotip alterat en el que semblen modificar els patrons proteics i adoptar, conseqüentment, propietats típiques d'aquest fenotip E-M i, per tant, més properes a migrar a altres parts de l'organisme i evadir l'acció del fàrmac (131).

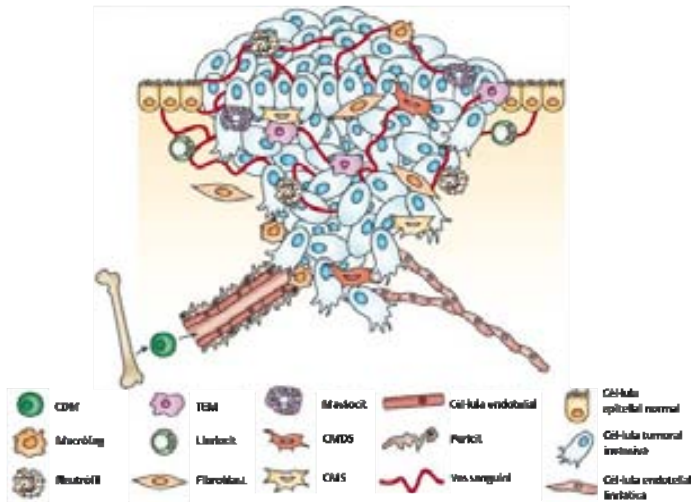


Figura 10. El microentorn heterogeni i plàstic del tumor faciliten la invasió i l'adaptació a altres teixits però també la arribada dels agents citotòxics i de la seva efectivitat (Nat. Rev. Cancer 2009).

1.3. L'ENZIM PIRUVAT QUINASA M2 (PKM2)

La proteïna piruvat quinasa (PK) és un enzim glicolític que catalitza la transferència del grup fosfat del fosfoenolpiruvat (PEP) per a la obtenció de piruvat i energia en forma d'ATP. El seu patró d'expressió i regulació reflecteix la funció específica i els requeriments metabòlics i energètics dels diferents tipus cel·lulars en els que es troba present.

Hi ha quatre isoformes descrites codificades per dos gens (PKL i PKM) i que estan controlades per promotors específics de cada teixit i per reguladors de *splicing* alternatiu. Així, el gen PKL codifica per les isoformes PKL expressades en teixits com en fetge, ronyó, intestí i PKR en eritròcits, amb un metabolisme principalment destinat a la gluconeogènesi (132). En canvi, el gen PKM codifica per les isoformes PKM1 o PKM2 com a resultat d'un *splicing* alternatiu entre els

exons 9 i 10, donant lloc a dues proteïnes de 58 kDa que difereixen en 23 aminoàcids responsables de les diferències de funció entre elles. S'ha demostrat que factors com c-Myc, a través de ribonucleoproteïnes nuclears com hnRNPA1, hnRNPA2 i PTB, poden induir l'expressió de PKM2, però no la de PKM1, en diferents tipus de línies cel·lulars (figura 11) (133). Mentre la isoforma M1 es troba present en teixits que necessiten una gran aportació d'energia i de forma ràpida com són els músculs i el cervell, PKM2 s'expressa principalment en cèl·lules amb elevats ritmes de proliferació com les cèl·lules proliferants normals, les cèl·lules embrionàries, les cèl·lules mare adultes i en especial les cèl·lules tumorals (134, 135). En els anys 1920s es va proposar que els tumors utilitzen glicòlisi per a la producció d'energia en lloc de la més eficient forma d'obtenció com es la fosforilació oxidativa.

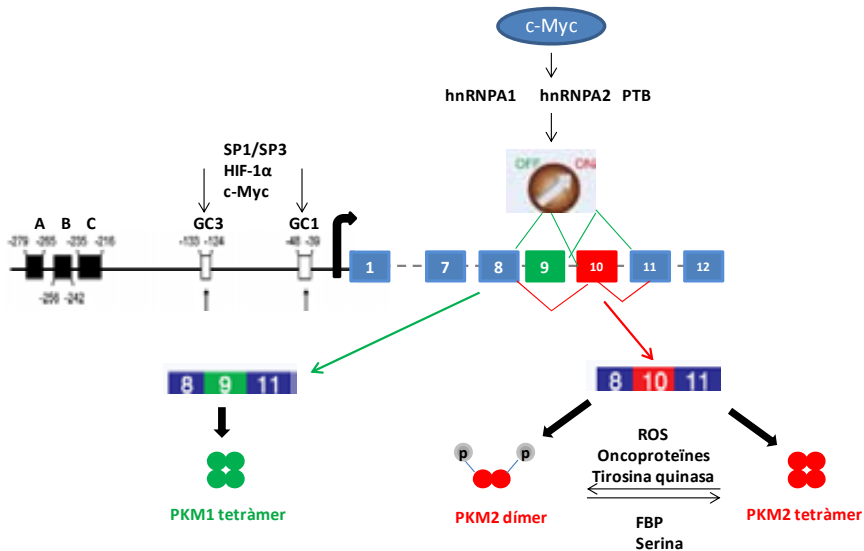


Figura 11. Regulació del gen PKM, expressió i activitat de les isoformes PKM1 i PKM2 en les cèl·lules diferenciades i les cèl·lules tumorals (modificat de Chen, M. Cancer Res. 2011 i Tamada, M. Clin. Cancer Res. 2012).

Les conseqüències d'aquest ajustament metabòlic són una major captació de glucosa i de producció de lactat. Aquest efecte s'ha conegut com glicòlisi aeròbica o efecte *Warburg* (136, 137). PKM2 es troba altament expressada en les cèl·lules tumorals independentment del teixit en el que es trobi i ho fa principalment en la seva forma dimèrica o de baixa activitat. La regulació entre la forma tetramèrica i dimèrica pot ser tant al·lostèrica a partir de la concentració cel·lular de fructosa 1,2, bifosfat com a través de diverses oncoproteïnes i factors de creixement (figura 11). En el citoplasma, les fosforilacions en PKM2 indueixen la ruptura de la forma tetramèrica a les formes dimèriques i la seva inactivitat com a enzim glicolític (138, 139), així com també ho pot fer la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (140). Factors com FGFR1 (Receptor 1 del factor de creixement de fibroblasts) són capaços de fosforilar PKM2 en el residu tirosina Y¹⁰⁵ i inhibir-la (141). La raó principal d'aquesta complexa regulació és que la disminució de l'activitat de PKM2 com a enzim glicolític afavoreix l'acumulació de metabòlits intermedis (lípid, aminoàcid, bases nitrogenades) per a poder ser utilitzats en processos biosintètics, contribuint d'aquesta manera al creixement cel·lular i a la proliferació del tumor (142).

Durant el desenvolupament embrionari PKM2 es troba present de forma ubíqua a tots els teixits i és reemplaçada progressivament per la isoforma respectiva de cada teixit, mentre que durant el procés de tumorigènesi, aquestes isoformes específiques de teixit van desapareixent a mesura que PKM2 torna a ser expressada. Encara que Bluemlein, K. I cols no han trobat cap evidència d'aquest canvi d'expressió ja que demostren que les dues isoformes poden coexistir en un teixit normal, i que només existeix una sobreexpressió de PKM2 en aquells teixits que ja la expressaven i han esdevingut tumorals (143)

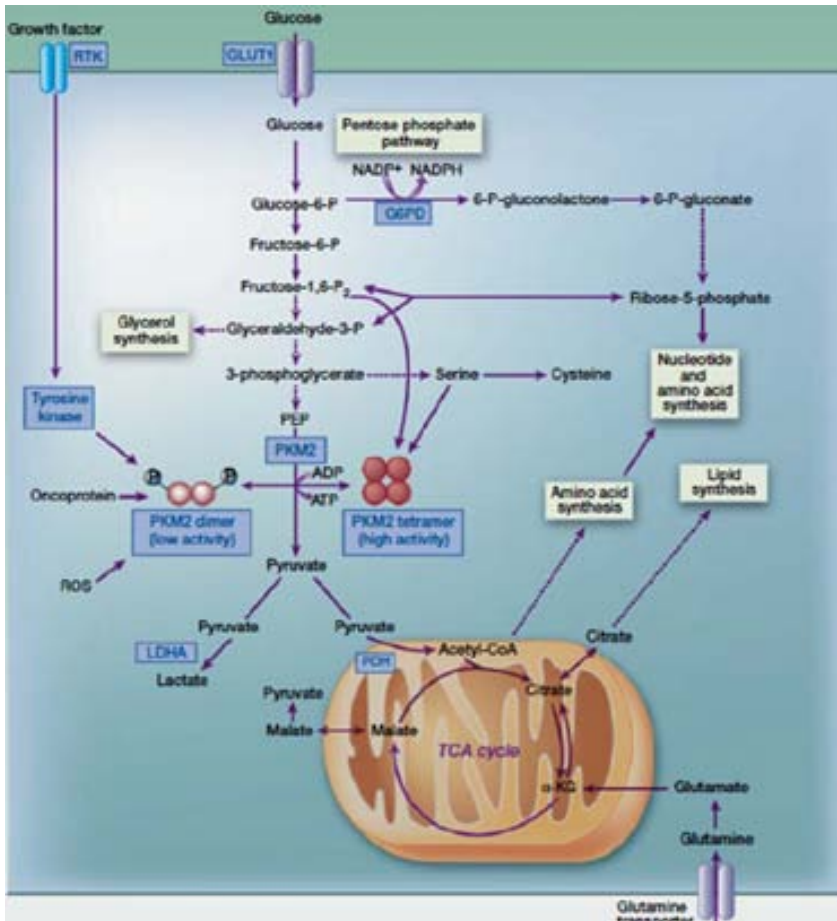


Figura 12. Vies metabòliques regulades per PKM2 a cèl·lules tumorals. La forma dimèrica de menor activitat és fosforilada per tirosina quinases i promou la conversió de piruvat en lactat. Els metabòlits intermediaris entren en altres vies col·laterals per a la síntesi de nucleòtids, glicerol i NADPH. GDP: glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; ROS: espècies reactives d'oxigen; RTK: receptor tirosina quinasa. (Tamada, M. Clin. Cancer Res. 2012).

El paper de piruvat quinasa M2 en el nucli és força complex al comportar-se com a estímul pro-proliferatiu o pro-apoptòtic segons els estímuls que rebí la cèl·lula. Tant quan PKM2 s'uneix a Oct-4 ajudant a la transactivació de diversos gens relacionats amb el creixement cel·lular (144) o bé quan transloca al nucli en resposta a Interleukina-3 a través de JAK2, PKM2 promou la proliferació de la

cèl·lula (145). De la mateixa manera s'ha demostrat recentment que la forma dimèrica de PKM2 és capaç de fosforilar STAT3 al nucli i activar, en conseqüència, l'expressió del gen MEK5, involucrat també en la proliferació cel·lular (146). En canvi, tal com Stêtak, A. i col·laboradors van demostrar, PKM2 també és capaç de translocar al nucli i activar la mort cel·lular per vies independents de caspases en resposta a diversos estímuls hormonaals, a l'estrès oxidatiu provocat per H_2O_2 , i al dany a l'ADN generat per radiació UV (147).

D'altra banda, PKM2 ha demostrat tenir un paper rellevant en la resposta i resistència a la quimioteràpia en diversos tipus tumorals. Alguns autors han pogut associar PKM2 amb la capacitat d'estimular l'angiogènesi quan aquesta s'allibera de la cèl·lula i s'uneix al factor de tumor endotelial TEM8 (148). Mentre que l'ús de ARNs silenciadors de PKM2 juntament amb cisplatí incrementà l'activitat antitumoral i la inhibició de proliferació tumoral en un model humà de tumor xenògraft de pulmó (149), en línies cel·lulars humanes de càncer gàstric, en canvi, els nivells baixos de la proteïna i de la seva activitat correlacionen amb una major resistència a cisplatí (150).

Amb l'ús de tècniques actuals de rastreig d'alt rendiment, en aquest treball s'ha descobert que la proteïna PKM2 es troba diferencialment expressada entre línies colorectals humanes sensibles i resistents a oxaliplatí. Pels recents coneixements de la seva implicació en la resposta a diversos agents antineoplàsics com cisplatí o 5FU en diversos tipus tumorals (gàstric, pulmó,...), hem decidit centrar aquesta tesi doctoral en l'estudi de PKM2 i la seva possible implicació en la resposta i l'adquisició de resistència a oxaliplatí en models cel·lulars d'adenocarcinoma colorectal així com en pacients tractats amb teràpia basada en aquest agent platinat.

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

L'oxaliplatí és un agent platinat utilitzat per al tractament del càncer colorectal avançat així com en d'altres tumors refractaris a cisplatí, al demostrar la seva elevada eficàcia antineoplàsica perllongant el temps lliure de malaltia, disminuint el risc de recidives i generant menys toxicitats que els seus anàlegs platinats. Malgrat tot, gairebé el 50% dels pacients són resistents a aquest tractament d'un inici i els que en principi responen n'adquireixen resistència al llarg d'exposicions continuades a aquest, suposant un gran obstacle en l'èxit del tractament.

La hipòtesi d'aquest treball es basa en que mitjançant l'ús d'un model *in vitro* de resistència adquirida a oxaliplatí desenvolupat al nostre laboratori, juntament amb la utilització de tècniques de proteòmica comparativa, és possible obtenir perfils diferencials de sensibilitat/resistència a OXA en aquest model que ens permetrien conèixer mecanismes, vies i molècules implicats en la resposta i en els processos d'adquisició de resistència a oxaliplatí i poder definir possibles marcadors de predicció de resposta a aquest agent platinat.

Sota aquesta hipòtesi general, les hipòtesis en que es fonamenta aquest treball són:

1. L'adquisició de resistència a oxaliplatí resulta en canvis específics en el proteoma de les cèl·lules resistents. Aquests canvis es poden detectar mitjançant tècniques de proteòmica comparativa i ser validats per tècniques específiques a nivell de proteïna i d'ARNm.
2. La proteïna PKM2, obtinguda a partir dels perfils proteòmics, estaria relacionada amb la resistència a oxaliplatí en el nostre model, i per tant, la

inhibició de la seva expressió en cèl·lules sensibles mitjançant siRNAs específics resultaria en un increment de la IC₅₀ del platí (dosi inhibidora del 50% del creixement cel·lular).

3. S'ha descrit la translocació de PKM2 al nucli cel·lular per resposta a la llum UV i estrés oxidatiu. Donada la natura de l'oxaliplatí, PKM2 també translocaria al nucli en resposta a aquest agent platinat.

4. Les proteïnes relacionades directa o indirectament amb l'expressió de PKM2 podrien intervenir en la resposta i/o resistència a oxaliplatí.

5. Els resultats *in vitro* serien extrapolables *in vivo* i les diferències proteiques i post-transcripcionals atribuïbles a la baixa capacitat de resposta i a l'adquisició de resistència a oxaliplatí en el model cel·lular també es manifestarien en pacients oncològics, relacionant-se directa o indirectament amb l'eficàcia al tractament.

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general d'aquesta tesi és conèixer les alteracions proteiques i mecanismes implicats principalment en l'adquisició de resistència a oxaliplatí en línies cel·lulars d'adenocarcinoma de còlon i poder estudiar si alguna/es d'aquestes proteïnes posseeix valor estadístic suficient per definir-se com a possible marcador predictiu de resposta a oxaliplatí en pacients de càncer colorectal avançat.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

OBJECTIU 1: Caracterització de línies cel·lulars de carcinoma de còlon resistents a oxaliplatí i estudi proteòmic comparatiu entre una línia sensible a oxaliplatí i la seva derivada resistent.

1.1. Obtenir els perfils proteòmics de sensibilitat i resistència adquirida a oxaliplatí mitjançant l'ús de tècniques de proteòmica comparativa entre una línia d'adenocarcinoma de còlon i la seva derivada resistent a oxaliplatí.

1.2. Validar i demostrar que els canvis proteics obtinguts per proteòmica comparativa es mantenen a nivell proteic amb l'ajut de tècniques de Western Blot però també a nivell post-transcripcional a nivell d'ARNm per tècnica de PCR quantitativa a temps real.

OBJECTIU 2: Estudi del paper de PKM2 en la resposta i resistència a oxaliplatí en línies d'adenocarcinoma de còlon.

2.1. Demostrar que la inhibició de l'expressió de PKM2 es tradueix en un increment de la IC₅₀ d'oxaliplatí.

2.2. Comparar la capacitat proliferativa, l'aturada del cicle cel·lular així com els mecanismes de mort cel·lular implicats en la resposta a oxaliplatí entre les cèl·lules control i cèl·lules amb PKM2 silenciada.

OBJECTIU 3: Estudi de localització subcel·lular de PKM2 en resposta a oxaliplatí.

3.1. Estudiar per microscòpia de fluorescència la translocació al nucli de PKM2 en resposta a oxaliplatí en línies de carcinoma colorectal per microscòpia de fluorescència.

OBJECTIU 4: Estudi de les proteïnes relacionades, directa o indirectament, amb l'expressió de PKM2 per tècniques de proteòmica comparativa 2D-DIGE i la seva possible implicació amb resposta/resistència a oxaliplatí.

4.1. Obtenció dels patrons proteics diferencials entre una línia amb PKM2 silenciada i la mateixa línia control per tècnica 2D-DIGE.

4.2. Validació per tècnica de Western Blot de les proteïnes alterades com a conseqüència del silenciament de PKM2.

OBJECTIU 5: Estudi en pacients del valor predictiu de PKM2 com a marcador de resposta a quimioteràpia basada en oxaliplatí en el CCR.

5.1. Estudi dels nivells d'ARNm de PKM2 en tumors metastàtics de pacients tractats amb oxaliplatí/5FU en primera línia.

5.2. Valorar els nivells d'ARNm de PKM2 amb altres marcadors de proliferació i mort cel·lular (Ki-67, p53 i bcl-2 respectivament).

3. MATERIALS i MÈTODES

3.1. LÍNIES CEL·LULARS

En aquesta tesi doctoral es va treballar amb les següents línies cel·lulars:

- Procedents de les col·leccions de la *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA): HCT116, LoVo, LS411N, LS513, SW48
- Cedides pel Dr. Francesc Xavier Real (Institut Municipal d'Investigació Mèdica de Barcelona IMIM): HT29, SW480, LS174T, SW1417, SW1116
- Desenvolupada en el laboratori de biologia molecular del càncer ICO-HUGTIP: HTOXAR3

Les línies cel·lulars van ser testades per la presència de *Mycoplasma* mitjançant tècnica de PCR (*Mycoplasma PlusTM PCR primer set, Stratagene, USA*) seguint el següent protocol:

Partint d'1 mL de medi de cultiu de cada línia cel·lular a testar a on la confluència sigui elevada i el medi no s'hagi reemplaçat en almenys 72 hores.

- *Primers per a la detecció de Mycoplasma:*
MICO 1: 5'- GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG – 3'
MICO 2: 5'-CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G – 3'
- Preparació de la barreja de primers MICO-Mix amb 10 µl de primer MICO1 i 10 µl de primer MICO 2 en 80 µl d'H₂O_d.
- Mix:

<u>Reactiu</u>	<u>[Cf]</u>
Tampó de reacció	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
MICO-mix	10X
Taq polimerasa	0,5 µl

- A la mix de PCR s'afegeix 2 μl de mostra i el volum d' H_2O_d necessària per a assolir un volum final de 20 μl .
- Les condicions de PCR foren:

Desnaturalització inicial motlle	96°C x 2'	} x 35 cicles
Desnaturalització motlle	96°C x 30''	
Unió dels <i>primers</i>	58°C x 1'	
Extensió de la cadena	72°C x 1'	
Manteniment	4°C ∞	

Per a la visualització del producte de PCR obtingut es prepara un gel d'agarosa 2% en tampó TBE 1X tenyit amb bromur d'etidi (0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). L'amplificació d'una banda de 464 pb en el gel representa la infecció de *Mycoplasma* en aquella línia cel·lular testada, que en condicions normals només apareix en el control positiu que es realitza paral·lelament.

Les línies amb les que es van realitzar la major part d'experiments d'aquest treball foren les següents:

HT29: Línia aïllada el 1964 d'un tumor primari de còlon humà. El tumor d'origen era un adenocarcinoma de còlon moderadament diferenciat de grau II. Les característiques que presenta la línia cel·lular son les següents: cèl·lules tumorigèniques de morfologia epitelial i adherents, produeixen i alliberen al medi antigen carcinoembrionari (CEA), *Transforming Growth Factor β* (TGF β) així com mucina. Expressen els oncogens c-myc i KRAS i presenta una mutació de la proteïna p53 en el codó 273 que porta a un canvi d'aminoàcid de Arg>His degut al canvi de base G \rightarrow A en la seqüència del gen traduït-se en una sobreproducció de la proteïna. Presenta fenotip RER negatiu i per tant no mostra inestabilitat de

microsatèl·lits, però sí pèrdua d'heterozigositat del cromosoma 17 a on es localitza el gen p53. La proteïna BRAF també es troba mutada en aquesta línia cel·lular (mutació V600E). No expressa la proteïna p21.

El seu creixement és en monocapa en medi de cultiu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*, Gibco® Invitrogen) suplementat amb L-Glutamina 2 mM (Applichem), HEPES 10 mM (Applichem), 10% de sèrum fetal boví inactivat a 56°C durant 45 minuts (FBS, Reactiva), 400 µg/mL de penicil·lina i 40 µ/mL de gentamicina. El temps de doblatge de la línia cel·lular en aquestes condicions és de 22-24 hores.

HTOXAR3: Línia d'adenocarcinoma de còlon amb resistència adquirida a oxaliplatí obtinguda prèviament al nostre laboratori com es descriu amb detall al treball de Plasencia C. et al. (95).

La generació de la línia HTOXAR3 es va realitzar a partir de la línia HT29. L'aïllament de les cèl·lules resistents a oxaliplatí es va realitzar progressivament amb una dosi inicial de 2 µmol/L d'oxaliplatí (dosi inhibidora del 50% del creixement cel·lular per a una exposició de 72 h). Passat un període d'elevada mortalitat, al voltant del 20-30% de les cèl·lules eren capaces de sobreviure. A mesura que incrementà el nombre de passes, el percentatge de cèl·lules vives respecte les controls també incrementà. Un cop arribat al 70-80% de supervivència a la dosi inicial, aquesta s'incrementà. En estat de cultiu en confluència, la corba de creixement es va estabilitzar i no va ser observable més mortalitat. En el cas de la línia HT29, la dosi va arribar fins a 14 µM. La línia resultant, HTOXAR3, mostrava una resistència de més de 5 vegades respecte la línia sensible però amb temps de doblatge similars (24-26h) com es mostra a la figura 1.

Les cèl·lules resistents tenen un tamany lleugerament més petit que les seves parentals, amb una capacitat major de formar vacuoles mucinoses i amb més facilitat per desadherir-se de la superfície a on creixen. Malgrat tot aquestes cèl·lules creixen en monocapa en les mateixes condicions que la seva parental HT29: medi DMEM suplementat amb L-Glutamina 2 mM, HEPES 10mM, 10% de sèrum fetal boví inactivat per calor (56°C durant 45 minuts) (FBS, Reactiva), 400 µg/mL de penicil·lina i 50 µg/mL de gentamicina.

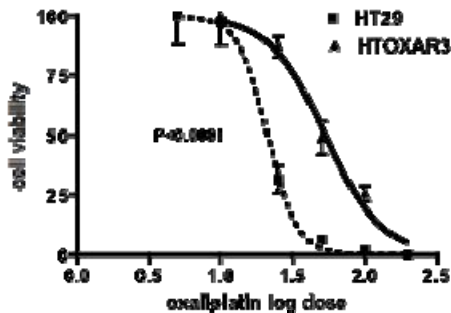


Figura 1. Generació de la línia amb resistència adquirida a oxaliplatí HTOXAR3. Gràfic representatiu de les dosis inhibidores d'oxaliplatí per a cada línia cel·lular (IC_{50}). Un mínim de 3 experiments independents per a cada condició van ser realitzats. Les barres verticals en els gràfics corresponen a \pm la desviació estàndard i el valor p a la comparació dels EC_{50} de les dues corbes per test de Fisher.

La viabilitat i el grau de resistència es comparava periòdicament per test de citotoxicitat MTT (veure apartat 3.3.). La línia resistent no va mostrar resistència creuada a altres fàrmacs com el 5FU, el cisplatí o el SN38 (taula 1). Tot el procés d'adquisició de resistència va durar un període de 10 mesos aproximadament. La línia HTOXAR3 ha sigut utilitzada durant aquest estudi com a model d'adquisició de resistència a oxaliplatí.

Línia cel·lular	OXA ($\mu\text{mol/L}$)		CDDP ($\mu\text{mol/L}$)		SN-38 ($\mu\text{mol/L}$)		5FU ($\mu\text{mol/L}$)	
	IC ₅₀ \pm SD	RI	IC ₅₀ \pm SD	RI	IC ₅₀ \pm SD	RI	IC ₅₀ \pm SD	RI
HT29	6,96 \pm 0,85	4,71	4,70 \pm 0,6	0,6	9,68 \pm 0,07	1,07	13,02 \pm 0,4	0,87
HTOXAR3	32,78 \pm 5,32		2,70 \pm 0,23		10,31 \pm 0,52		12,59 \pm 2,09	

Taula 1. Taula representativa del grau de resistència adquirit per a oxaliplatí en la línia HTOXAR3 i la absència de resistència creuada amb els fàrmacs cisplatí, 5FU i SN38. OXA: oxaliplatí; CDDP: cisplatí. RI: índex de resistència; SD: desviació estàndard.

HCT116: Línia cel·lular humana tumorigènica procedent d'un carcinoma colorectal. És una línia de morfologia epitelial que creix en monocapa i s'inhibeix per contacte cèl·lula- cèl·lula quan la confluència és màxima. Produueix i secreta CEA i sobreexpressa TGF β 1 i 2 en superfície. En aquesta línia p53 no es troba mutada però en canvi el proto-oncogen KRAS presenta una mutació al codó 13. Presenten fenotip RER positiu (MSI-H o *Microsatellite-Instability High*). Els punts de control de dany a l'ADN i del fus mitòtic es troben intactes.

Creixen en monocapa en medi RPMI-1640 (Invitrogen) suplementat amb L-Glutamina 2 mM (Applichem), HEPES 10 mM (Applichem), 10% de sèrum fetal boví (FBS, inactivat a 56°C durant 45 minuts), i amb els antibiòtics penicil·lina 400 $\mu\text{g/mL}$ i gentamicina 40 $\mu\text{g/mL}$. El temps de doblatge de la línia és de 20-22 hores. A la figura 3 es mostren imatges de les 3 línies cel·lulars en cultiu.

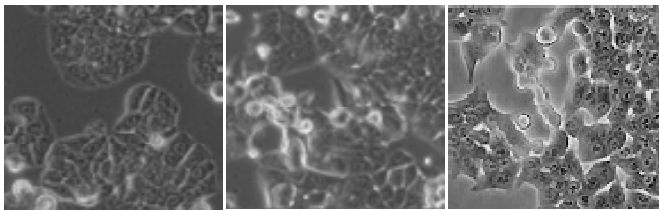


Figura 2. Cèl·lules HT29 (esquerra), HTOXAR3 (centre) i HCT116 (centre) en cultiu confluent. Imatges obtingudes per microscòpia òptica de contrast de fase. Magnificació 20x en microscopi Axiobserver Z1, Zeiss.

3.1.1. Manteniment de les línies cel·lulars

Per tal de mantenir viables totes les línies cel·lulars descrites anteriorment es cultivaren en flascons T-25 cm² canviant el medi de cultiu per medi fresc cada 2-3 dies, valorant el ritme de creixement i tornant a sembrar en flascons nous cada 7 dies. Un cop les cèl·lules assolien un 70% de confluència als flascons, van ser desadherides de la superfície amb Tripsina-EDTA 3X (Nalgene). El comptatge es va realitzar amb tinció de Blau Tripà (Gibco, Invitrogen) en una cambra de Neubauer (hemocitòmetre). El nombre de cèl·lules a sembrar per no assolir mai el 100% de confluència es va determinar en funció del temps de doblatge de la línia, el tamany cel·lular d'aquesta i el nombre de cèl·lules requerides per posteriors experiments.

El temps de doblatge es calculava periòdicament amb la següent fórmula:

$$C_f = C_o \cdot e^{\lambda \cdot t}$$

A on

C_f: concentració final de cèl·lules al flascó

C_o: concentració inicial de cèl·lules sembrades

λ: (ln2/temps de doblatge de la línia (h))/24h (dies)

t: temps transcorregut entre pases cel·lulars (dies)

3.2. FÀRMACS ANTINEOPLÀSICS

Oxaliplatí: preparació de solucions estoc 12,6 mM i 1 mM en H₂O_d o PBS 1X i es guarda congelat a -20°C fins a la seva utilització.

Cisplatí (CDDP): preparació de la solució mare 1 mM en sèrum fisiològic i guardat a -20°C fins a la seva utilització.

SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina)(Sigma): preparació de la solució estoc 10 mM en PBS 1X o DMSO* i congelat a -20°C.

*Concentració demostrada com a no tòxica en medi de cultiu inferior a 0,01% (v/v).

5-Fluorouracil (5FU): preparació de la dilució inicial en PBS 1X ò sèrum fisiològic en fresc cada vegada. Estoc guardat a temperatura ambient protegit de la llum.

Tots els compostos foren diluïts posteriorment en medi de cultiu (específic de cada línia cel·lular) per assolir les concentracions finals de treball.

3.3. TESTS DE VIABILITAT CEL·LULAR

3.3.1. Assaig de viabilitat cel·lular per blau tripà

El blau de tripà és un colorant vital que permet distingir les cèl·lules viables de les no viables. Aquest fet és degut a que les cèl·lules viables no són capaces d'incorporar la tinció, mentre que les cèl·lules mortes queden tenyides de blau al tenir malmesa la membrana citoplasmàtica. Aquesta tinció permet fer mesures de la viabilitat i mortalitat d'una població cel·lular amb l'ajuda de la utilització d'una cambra de Neubauer. En aquesta tesi es va utilitzar aquesta tècnica per determinar la mortalitat i viabilitat de les cèl·lules HT29 després del silenciament de PKM2 i tractament amb oxaliplatí.

En primer lloc es va realitzar la transfecció dels oligos de siRNA siCNT i siPKM2 en les cèl·lules HT29 en plaques de 12 pous tal com s'especifica a l'apartat 3.4. Donat que es va voler comparar l'efecte de l'oxaliplatí a diferents temps de recuperació del fàrmac, es van establir tres grups de tractament.

El nombre de cèl·lules sembrades en cada grup va ser determinat prèviament per tenir un nombre òptim de cèl·lules que evités tant la toxicitat per transfecció amb *siRNA* degut a una baixa densitat de cèl·lules, com per saturació dels pous. Els tractaments es van fer a una dosi 15 μM d'oxaliplatí durant 24 hores a tots els grups. Passat aquest temps, es retirà el fàrmac i es substituï per medi de cultiu fresc. En els pous de control de tractament, és a dir, cèl·lules que no van rebre oxaliplatí, el medi de transfecció es va substituir per medi de cultiu fresc suplementat amb antibiòtic i es va mantenir fins al dia del comptatge. La quantificació de cèl·lules vives i mortes es realitzà a 0 (no recuperació), 24 i 48 hores després d'haver retirat l'oxaliplatí. Prèviament a la quantificació per blau tripà, totes les cèl·lules foren observades per microscòpia òptica amb el microscopi Axiovert 40C (Zeiss). La quantificació per blau tripà es va dur a terme tal com s'indica a l'apartat 3.1.1. Es van realitzar 3 experiments independents i 3 rèpliques per cada condició experimental.

3.3.2. Test MTT

L'anàlisi de citotoxicitat MTT és un assaig colorimètric basat en la capacitat de les cèl·lules vives d'incorporar les sals de *tetrazolium* (color groc) i metabolitza-les mitjançant enzims reductases en la forma cristal·lina i insoluble que dona lloc a les sals de formazà (color violeta). Aquestes sals es dissolen amb un agent solubilitzant que conté 0,1% SDS i 0,01 M HCl resultant en una solució violeta quantificable mitjançant l'ús de lectors colorimètrics. En aquest projecte s'ha fet servir un *kit* comercialitzat per Roche® (*Cell Proliferation Kit I* ref no. 11465007001).

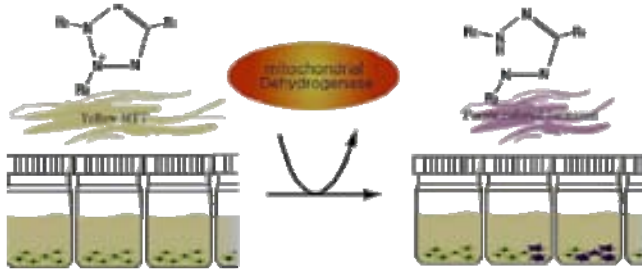


Figura 3. Reacció enzimàtica de les sals de tetrazolium (groc) a sals de formazà (violeta) mitjançant l'enzim deshidrogenasa mitocondrial.

Per a realitzar els experiments es van sembrar cèl·lules en plaques de 96 pous (Nunclon, NUNC) a la densitat òptima de cada línia cel·lular, determinada prèviament al nostre laboratori, per evitar la saturació dels pous en els controls ($1,5 > OD < 1,8$), tenint en compte el temps de doblatge de cada línia cel·lular i la durada dels experiments. Passades 24-48 hores (temps d'adherència de les cèl·lules al fons del pou) es retira el medi cultiu i s'afegeixen 100 μ l dels agents citotòxics a cada pou a les dosis estimades. Passat el temps d'exposició als diferents fàrmacs, es retiren els tractaments i, en els casos requerits, es reemplaça per medi fresc de cultiu per a la recuperació de les cèl·lules supervivents. Després de la recuperació (generalment 72h), es retira el medi de cultiu i es reemplaça per 100 μ l de solució MTT [FBS 10%; MTT 10%; RPMI no suplementat 80%] amb la que s'incuba durant 4 hores a 37°C. Un cop formades les sals de formazà, es solubilitzen amb 100 μ l de solució subtilitzant [SDS 0,1%; HCl 0,01 M] durant 16-20 hores. L'absorbància de la solució es determina en un espectròmetre (*Varioskan Flash*, Thermo®) a una longitud d'ona de 570 nm. La densitat òptica (OD) és proporcional al nombre de cèl·lules viables (sempre i quan els pous no es trobin saturats).

A cada experiment es calcula la **fracció de supervivència (f)** com el quocient entre la OD de les cèl·lules tractades i la OD de les cèl·lules sense tractar. Les dades obtingudes s'analitzen pel mètode de l'efecte mig (**median-effect lines**). Aquest mètode consisteix en representar el $\log_{10}[(1/f)-1]$ enfront el logaritme de la dosi de la droga ($\log_{10}(\text{dosi})$). Posteriorment s'obté la recta de regressió pel mètode dels mínims quadrats (acceptant només rectes que presentin un coeficient R^2 superior o igual a 0,95). De les línies resultants, denominades **median-effect lines** n'extraïem el pendent (**m**) i l'ordenada en l'origen (**b**) que serviran per calcular la **IC₅₀** (concentració inhibidora del 50% del creixement cel·lular). Amb aquests paràmetres es calculen les concentracions individuals de fàrmac necessaris per a inhibir el creixement d'una fracció determinada en un rang del 10% al 90% segons la equació següent:

$$\text{Dosi } f = \text{Dosi}_{IC_{50}} (1/f - 1)^{1/m}$$

A on: **Dosi f**: dosi final

Dosi IC₅₀: dosi inhibidora del 50% de la població cel·lular

f: fracció de supervivència

m: pendent de la recta

Amb aquesta fórmula s'estableixen les concentracions inhibidores (IC₁₀ a IC₉₀) i el grau de resistència entre dues línies cel·lulars davant un mateix compost citotòxic calculat com el quocient:

$$\text{Grau resistència} = IC_{\text{resistent}} / IC_{\text{sensible}}$$

A on: **IC_{resistent}**: dosi inhibidora del 50% de la població cel·lular resistent al fàrmac

IC_{sensible}: dosi inhibidora del 50% de la població cel·lular sensible al fàrmac

3.4. SILENCIAMENT GÈNIC AMB *siRNAs*

La interferència per ARN (ARNi) descoberta per Craig Mello i Andrew Fire el 1998 (151) és un procés de silenciament gènic post-transcripcional de gens específics pel qual petits ARNs de 21-23 nucleòtids de doble cadena (en anglès, *siRNAs*, *small interfering RNAs*) s'uneixen a seqüències d'ARNm complementàries causant la seva degradació i el conseqüent silenciament gènic i/o proteic (figura 4). La tècnica basada en aquest procés biològic es va emprar per silenciar transitòriament l'expressió de PKM2 (Cat. No. AM51331. Seq. Ref. NM_002654; NM_182470; NM_182471; CNT, Ambion) a les línies HT29 i HCT116 (representats a partir d'aquest moment com a siPKM2).

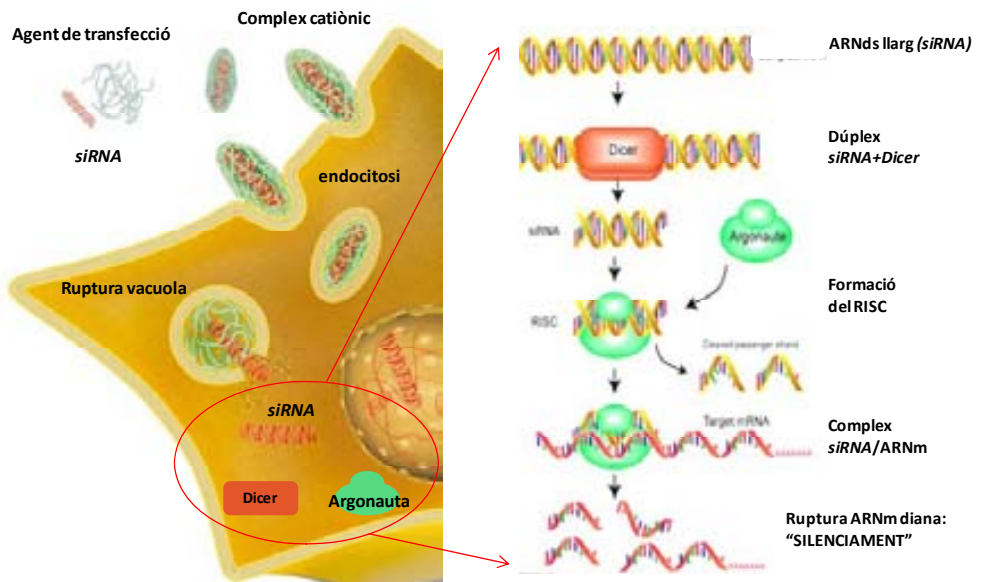


Figura 4. Esquema de silenciament gènic dependent d'ARN. Les molècules de *siRNA* entren a la cèl·lula amb l'ajut d'un agent de transfecció. Un cop al citoplasma, s'uneix amb la ribonucleasa DICER una de les dues cadenes d'ARN. Ambdós elements s'uneixen seguidament amb TRBP i Argonauta formant el complex catalític o RISC (*RNA-induced silencing complex*) per dur a terme el silenciament dels ARNm complementaris.

En els experiments s'introduí un control positiu de silenciament amb *siRNAs* específics per a GAPDH (Cat. No. 4390850. Seq. Ref. NM_002046 (humà); NM_001001303 (ratolí); NM_017008 (rata), Ambion) (designat com a siGAPDH), un control negatiu (Cat. No. AM4611, Ambion) amb un oligonucleòtid format d'una seqüència que no presenta homologia amb cap regió de ARNm humà (a partir d'aquest punt referit com a siCNT) i un *Mock* o control de toxicitat i expressió basal dels gens diana que consisteix en cèl·lules no transfectades. Els volums i concentracions utilitzats dels diferents reactius foren adaptats als requeriments de cada línia cel·lular així com a l'àrea relativa dels pous utilitzats per a cada experiment. El protocol que es va seguir va ser el següent:

1. Tripsinització de les cèl·lules, contatge i concentració a 1.10^5 cèl·lules/ml en medi de cultiu lliure d'antibiòtics. Manteniment de les cèl·lules fins a la transfecció en suspensió a 37°C i 5% CO₂.
2. Formació dels dúplex de siRNA: els tres oligonucleòtids de siRNA utilitzats de cada gen (es van afegir a cada pou a les concentracions òptimes determinades deixant 5 minuts per a la formació dels dúplex de siRNA en medi lliure de sèrum OptiMEM (Gibco-Invitrogen)).
3. Afegir l'agent de transfecció Lipofectamina_{ARNiMAX} (Invitrogen) al volum requerit per a cada línia cel·lular, es barrejà el contingut del pou suaument i es deixà 15-20 minuts a RT per a la formació dels complexos de transfecció.
4. Incorporació de les cèl·lules en suspensió en els pous amb els complexos de transfecció a una quantitat necessària tal per a que a 24h post-transfecció s'aconsegueixi el 30-50% de confluència dels pous i seguidament ajustar amb medi lliure d'antibiòtic.
5. Barreja del contingut dels pous suaument i deixar 24 hores a 37°C.

6. Canvi del medi de cultiu a les 24 hores per medi fresc suplementat amb HEPES, Glutamina, FBS i antibiòtics.
7. Deixar les cèl·lules a 37° fins a la valoració del silenciament o posteriors experiments.
8. Eliminació del sobrenedant, rentat dels pous amb PBS fred i conservació de les plaques a -80°C fins a la validació del silenciament entre 24 i 96 hores post-transfecció per qPCR i/o Western Blot (apartats 3.5.4 i 3.7.3. respectivament).

Per validar i verificar la integritat dels oligonucleòtids de *siRNA* nous i més antics es realitza periòdicament electroforesi en gels d'agarosa al 1,5% a 80 V durant 45 minuts (figura 5). Els *siRNAs* en perfecte estat es veuen com a fragments únics de 20-23 parells de bases.

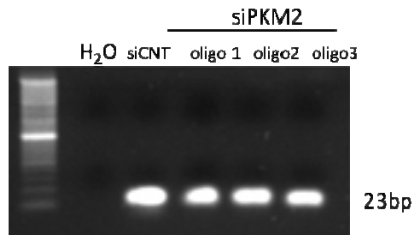


Figura 5. Estudi de la integritat dels oligonucleòtids de *siRNA* mitjançant electroforesi en gel d'agarosa 1.5% . Es visualitza una banda única de 23 pb per a cada *siRNA* (siCNT i siPKM2 1,2 i 3) i cap banda per al control negatiu (H_2O_d) indicant la no contaminació i el bon estat dels oligos de *siRNA*. Pb: parells de bases nitrogenades.

Solucions:

Agarosa 1,5%: 0,8 g agarosa (Ecogen); 3,2 µl Bromur d'Etidi 0,8%; TBE 1X

TBE 10X estoc: Tris 0,89 M; Àcid bòric 0,89 M; EDTA 0,02 M

TBE 1X: TBE 10X diluït en H_2O_d

3.5. ANÀLISI D'EXPRESSION GÈNICA

En els estudis d'expressió gènica es va partir d'ARN obtingut de dues fonts diferents. D'una banda es va utilitzar ARN total de línies cel·lulars i d'altra banda ARN total de mostres tumorals de pacients de CCR avançat tractats prèviament amb quimioteràpia basada en oxaliplatí.

3.5.1. Extracció d'ARN de línies cel·lulars

L'obtenció de l'ARN de les línies cel·lulars d'adenocarcinoma de còlon humà es va realitzar a partir de *pellets* cel·lulars utilitzant un *kit* comercial (Illustra RNAspin Isolation Kit, GE Healthcare). Aquesta tècnica permet obtenir ARN total a partir de columnes amb membrana de sílice que permet una major retenció dels àcids nucleics. El procediment que es va dur a terme va seguir el següent protocol:

1. **LISI CEL·LULAR I FILTRACIÓ:** afegir 350 µl de solució de lisi (tampó RA1 suplementat amb 1% β-mercaptoetanol) i passar tot el contingut per la columna de filtrat per a centrifugar a 14.000 rpm durant 1 minut. Durant aquest pas es realitza la lisi cel·lular i la inactivació d'ARNses.
2. **UNIÓ DE L' ARN A LA MEMBRANA DE SÍLICE:** Afegir al lisat cel·lular 350 µl d'etanol 70% (diluït amb H₂O lliure d'ARNses) i vortejar la mostra 2 cops durant 5 segons. A continuació es passa el contingut de lisi a una nova columna i es centrifuga durant 30" a 14.000 rpm. Després de canviar la columna a un nou tub col·lector s'afegeixen 350 µl de MBD (*Membrane Desalting Buffer*) i es centrifuga durant 1 minut a 14.000 rpm. La dessalació de la membrana permet fer una digestió de ADNasa molt més efectiva.

3. **DIGESTIÓ DE L'ADN:** Per a eliminar el contingut d'ADN de la mostra es fa una incubació amb solució *DNAase reaction mix* (10 µl ADNsa: 90 µl tampó ADNasa per mostra) durant 15 minuts a RT.
4. **RENTATS I ASSECAT DE LA MEMBRANA:** Afegir 200 µl de tampó RA2 per a la inactivació de la ADNasa i rentat de la membrana i centrifugar 1 minut a 14.000 rpm. Passar la columna a un nou tub col·lector a on s'afegiran 600 µl del segon tampó de rentat RA3 repetir la centrifugació de 1' a 14.000 rpm. Finalment repetir el darrer rentat de la membrana amb 250 µl de tampó RA3 i centrifugar durant 2' a 14.000 rpm comprovant que no queda líquid residual a la columna. En cas contrari cal repetir la centrifugació.
5. **ELUCIÓ DE L'ARN PUR:** passar la columna a un tub *ependorf* nou i afegir 20 µl d'H₂O_d lliure de ARNases o DEPC. Centrifugar 1' a 14.000 rpm. Incubar durant 3 minuts a 65°C. Emmagatzemar la mostra a -20°C o -80°C fins al seu ús.
6. **QUANTIFICACIÓ:** La quantificació de l'ARN obtingut es va fer amb un equip NanoDrop TM ND-1000 (Thermo Scientific) mesurant l'absorbància de les mostres a 260 nm (franja dels àcids nucleics), establint la qualitat de la mostra en el ràtio d'absorbàncies entre les longituds 260 i 280 nm (A260/A280) i acceptant mostres amb ràtios de 2,0-2,2 com a mostra d'ARN pura.

3.5.2. Extracció d'ARN parafinat de tumors de còlon

L'extracció de l'ARN procedent de les 64 peces de tumor fixat en formalina (formol) i parafinat es va realitzar manualment. En primer lloc es procedeix al desparafinat de les mostres amb xilè i alcohols a diferents graduacions. Acte seguit les mostres es lisen en tris-cloridi, EDTA, SDS i tampó amb Proteïnasa K.

L'ARN s'extreu amb fenol- cloroform- alcohol isoamil seguit de la precipitació amb isopropanol en presència de glicogen i acetat sòdic. Aquest ARN obtingut es resuspen en solució d'emmagatzematge d'ARN (Ambion Inc, Austin TX, USA) i es tracta amb ADNasa I per a evitar la contaminació de les mostres per ADN.

3.5.3. Retrotranscripció

Procés basat en la síntesi d'ADN complementari (ADNc) utilitzant com a motlle ARN monocatenari mitjançant l'enzim transcriptasa inversa (retrotranscriptasa).

Portant les mostres a una concentració final d'ARN de 300 ng/μl es realitzà un primer pas de desnaturalització de l'ARN i alineació del cebador (a partir d'aquest moment, *primer*) amb la incubació de la mostra a 65°C durant 5 minuts amb mix 1 (dNTP 10 mM i *Random Hexamer Primer* 250 ng/mL). Acte seguit s'afegí la segona mix de retrotranscripció composta per ditiotretiol 0,1 M, ribonucleasa *RNaseOUT* (Invitrogen) (és un inhibidor de ribonucleases A, B i C), i finalment transcriptasa reversa MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Invitrogen) seguint les condicions següents d'amplificació de l'ADNc:

Unió dels <i>primers</i>	25 °C x 10 min
Extensió de l'ADNc	37 °C x 45 min
Inactivació de MMLV	70 °C x 10 min

En el cas d'ARN obtingut de transfecció amb *siRNAs* no es realitzà cap dil·lució del producte obtingut de retrotranscripció. En el cas de partir de *pellets*

cel·lulars, la quantitat d'ADNc obtinguda (3 µg) fou diluïda en H₂O_d per tenir una concentració d'ADNc 20 ng/µL. El material obtingut es conservà a -20°C.

3.5.4. Expressió d'ARNm a temps real (qPCR)

La qPCR (de l'anglès, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) és una tècnica que permet detectar i quantificar simultàniament l'amplificació de l'ADN en temps real mitjançant el senyal fluorescent que emet durant aquesta síntesi, el qual és directament proporcional a la quantitat de producte generat. La quantificació d'aquesta expressió pot donar-se de forma absoluta, o bé relativa a l'expressió d'uns gens de referència (gens *housekeeping* o normalitzadors) ja que s'expressen de forma constitutiva i son capaços de mantenir un nivell constant d'expressió a diferents estats fisiològics de la cèl·lula.

L'anàlisi de PCR quantitatiu es va realitzar a partir de sondes Taqman. Aquestes sondes són oligonucleòtids de entre 18 i 22 pb marcats amb un fluorocrom efector (*reporter*), generalment de curta longitud d'ona, a l'extrem 5', i un agent quelant (*quencher*) de longitud d'ona més llarga, o un agent no fluoròfor, a l'extrem 3'. Aquest quelant té la funció principal de reduir la fluorescència emesa per l'efector. El funcionament d'aquesta polimerasa es basa en l'activitat 5' Exonucleasa de l'enzim Taq (*Thermus aquaticus*), permetent l'alliberament de l'efector i consegüentment, l'emissió de fluorescència que quantifica i enregistra la plataforma en cada un dels cicles de PCR. Tot el procés es troba representat a la figura 6.

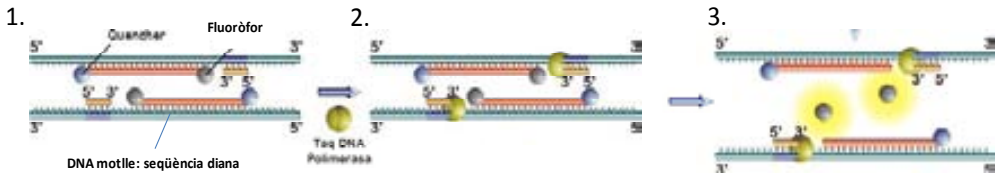


Figura 6. Esquema d'amplificació de ADNc amb sondes Taqman[®]: 1. La sonda d'ADN marcada amb fluoròfor i quencher s'uneix al motlle d'ADN. 2. Quan l'enzim Taq ADN polimerasa comença a amplificar a partir del primer unit a l'ADN diana, desplaça l'extrem 5' que és degradat per acció 5'exonucleasa de la Taq ADN polimerasa 3. L'alliberament del fluoròfor al medi separant-lo del quencher provoca un augment irreversible de la fluorescència, la qual és detectada per la plataforma utilitzada per a l'anàlisi.

Es va utilitzar qPCR per analitzar:

- Expressió gènica de PKM2 i HSP60 en les línies HT29 i HTOXAR3.
- Expressió gènica de PKM2 en un panell de 8 línies cel·lulars humanes d'adenocarcinoma de còlon.
- Expressió de PKM2 en teixit tumoral procedent de pacients de càncer de còlon metastàtic tractats en primera línia amb quimioteràpia basada en oxaliplatí.
- Validació del silenciament dels gens PKM2 i GAPDH (control positiu) per transfecció reversa de siRNAs en les línies cel·lulars HT29 i HCT116.

Els primers i sondes utilitzats per a la detecció de GAPDH (Ambion), PKM2 (Hs00762869_s1, Applied Biosystems), i HSP60 (Hs00762869_s1, Applied Biosystems) foren pre-dissenyats i validats per la casa comercial. Els controls endògens utilitzats, 18S ribosòmic i β -actina van ser dissenyats utilitzant el software *Primer Express v2.0* (Applied Biosystems) i validats posteriorment, donat que no hi havia disponibilitat d'assajos amb amplicons inferiors a 9 pb per a aquests gens i és un factor important a tenir en compte en l'anàlisi de teixit parafinat. Els primers i sondes sintetitzats foren els següents:

- β -actina** *Primer forward:* 5'TGAGCGCGGCTACGCTT 3'
Primer reverse: 5' TCCTTAATGTCACGCACGATTT 3'
Sonda Taqman® TAMRA: 5' ACCACCACGGCCGAGCGG 3'
- 18S** *Primer forward:* 5'ACGCACGGCCGGTAC 3'
Primer reverse: 5' CCAAAGGAACCATAACTGATTTAATG 3'
Sonda Taqman® MGB: 5' AACTGCGAATGGC 3'

En tots els casos el fluoròfor efector incorporat en les sondes era tipus FAM i com a agent quelant es va optar per un *quencher* no fluoròfor (NFQ), el qual no emet fluorescència basal, permet disminuir el soroll de fons i augmentar la sensibilitat de detecció de senyal.

Preparació de les mostres:

Els experiments es realitzaren en plaques de 384 pous (Applied Biosystems) i es van incloure les següents condicions:

- Mostres d'estudi (3 rèpliques)
- Control positiu extern (siRNA): verificar silenciament amb un gen housekeeping (3 rèpliques)
- Control negatiu extern (siRNA): descartar toxicitat per transfecció dels siRNAS (3 rèpliques)
- Control negatiu mix de PCR per a cada gen (2 rèpliques)
- Control negatiu de retrotranscripció (2 rèpliques)
- Control retrotranscriptasa (RT *minus*): descartar contaminació amb ADN genòmic (2 rèpliques)
- Calibrador o ARN de referència (2 rèpliques)

L'ADN complementari (ADNc) obtingut prèviament de la retrotranscripció (*apartat 3.5.3.*) va ser diluït en Taqman® Universal Master Mix (Applied Biosystems) i en els corresponents *primers* i sondes específics per a cada gen (Taqman® Gene Expression assays, Applied Biosystems):

18S - GAPDH - β -Actina		PKM2 - HSP60	
REACTIU	μ l/reacció	REACTIU	μ l/reacció
Taqman® Universal Mix 10X	6,25	Taqman® Universal Mix 10X	6,25
Primer Forward 10 μ M	0,375	Assaig	0,625
Primer Reverse 10 μ M	0,375	H ₂ O lliure de nucleases	2,92
Sonda FAM 15 μ M	0,08		
H ₂ O lliure de nucleases	2,92		

La detecció i quantificació de l'expressió gènica es va fer utilitzant el sistema *qPCR 7900HT Fast Real-time PCR system* amb el software *ABI Prism 7900HT SDS v2.2* (Applied Biosystems) amb les condicions següents de PCR per a la amplificació de l'ADNc:

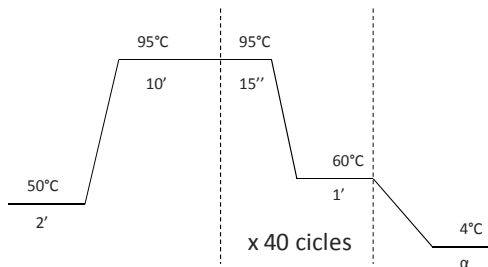


Figura 7. Condicions per a l'amplificació d'ADNc.

La quantificació relativa de l'expressió gènica es va calcular d'acord amb el **mètode comparatiu del cicle llindar** o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que consisteix en establir un valor llindar o *threshold*. Es defineix com a cicle llindar, el cicle de la PCR en que la

fluorescència supera la fluorescència basal. Aquest valor es troba a la zona d'amplificació exponencial (figura 8). Per tant, per a cada una de les mostres es va establir el valor d'expressió de cada gen com el cycle de PCR que talli amb aquest cycle llindar (Ct).

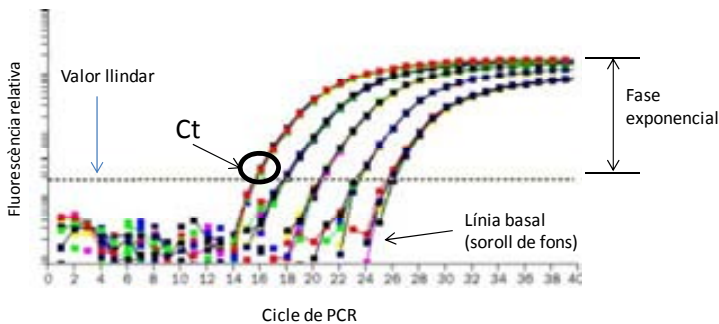


Figura 8. Gràfic d'amplificació gènica analitzada una vegada ha finalitzat el procés. Les corbes representen l'amplificació del gen per a cada mostra. El valor llindar, dependent de cada gen, talla per la part inferior de la zona d'amplificació exponencial.

A continuació es va calcular la diferència de Ct, o ΔCt com la diferència de cycles entre el Ct del gen experimental i el Ct del control endògen (gen *housekeeping*) mitjançant la fórmula següent:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen experimental}} - Ct_{\text{gen housekeeping}}$$

Per a aconseguir que totes les mostres siguin comparables, cal normalitzar els resultats amb un calibrador (o ARN de referència) obtingut comercialment (Stratagene) com ha sigut descrit prèviament per a cada gen analitzat (152):

$$\Delta \Delta Ct_{\text{gen experimental}} = \Delta Ct_{\text{mostra problema}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

Seguidament, el valor de l'expressió per a cada gen, calculat com $2^{-\Delta \Delta Ct}$, es va referenciar al calibrador ($\Delta \Delta Ct = 0$), mostrant quantes vegades per sobre o per sota del calibrador ($2^{-\Delta \Delta Ct} = 1$) s'expressa el gen problema a cada mostra.

Per a determinar el % de silenciament (% K.D.) aconseguit de la transfecció de siRNAs es va realitzar el càlcul següent:

$$\% \text{ K.D.} = [1 - 2^{-\Delta\Delta\text{Ct gen problema}}] * 100$$

En tots els casos es van realitzar 3 rèpliques experimentals i es van considerar com a vàlides aquelles amb una desviació estàndard inferior a 0,25.

3.6. ESTUDI DE MORT CEL·LULAR

3.6.1. Anàlisi de distribució de cicle cel·lular per iodur de Propidi

Per tal d'estudiar el paper de PKM2 en la distribució del cicle cel·lular després de tractar les cèl·lules amb oxaliplatí, es va utilitzar la tècnica de tinció amb iodur de Propidi.

Després de transfectar les cèl·lules HT29 i HCT116 (veure apartat 3.4.) i deixar 24 hores per a assegurar l'adherència i l'entrada dels oligòmers de siRNA a la cèl·lula, es van realitzar els tractaments amb l'agent citotòxic durant 8, 24, 48 i 72 hores. Temps als quals es recolliren cèl·lules i sobrenedants per tripsinització. Els *pellets* cel·lulars obtinguts es deixaren incubar durant un mínim de 30 minuts en etanol fred 70% per a la seva fixació i permeabilització. Després de centrifugar aquestes cèl·lules ja fixades durant 5 minuts a 720 g, es varen resuspendre en 0,5 mL d'HCl 0,1 M i es deixaren incubant durant 10 minuts a 37°C. Per aturar la reacció, es va afegir a cada mostra 2,5 mL de PBS i es centrifugà un cop més durant 5 minuts a 2.000 rpm per a netejar les cèl·lules del l'HCl abans de ser incubades amb 200-250 µl de la solució de iodur de Propidi durant 30 minuts a temperatura ambient i protegides de la llum. L'anàlisi s'efectuà mitjançant citometria de flux amb un equip BD *FACSCanto II* (Beckton Dickinson). Per a una

valoració objectiva, les dades citomètriques obtingudes s'analitzaren amb l'ajut del software Flowjo v9.2.

Solucions:

Solució de Iodur de Propidi: PI [30 μ M] (Applichem); ARNsa A [200 μ g/mL] (Sigma-Aldrich); PBS 1X

Etanol 70% fred: Etanol absolut (Merk); H₂O_d (-20°C)

HCl 0,1 M: HCl _{37% fumarant} (Merk); PBS 1X

3.6.2. Estudi d'activació d'apoptosi per test d'Anexina V/IP

Per a estudiar si el silenciament de PKM2 comporta alteracions en l'activació d'apoptosi en les cèl·lules HT29 en resposta a oxaliplatí, es va realitzar el test d'Anexina V/IP (BD Pharmigen). FITC-Anexina V/IP es una prova utilitzada per a la identificació i determinació quantitativa d'una població que està esdevenint apoptòtica activament. Aquest mètode està basat en la propietat de les cèl·lules apoptòtiques de perdre l'asimetria de membrana en les seves fases inicials, en les que la fosfatidilserina transloca de la cara interna de la membrana plasmàtica a la cara externa quedant exposada al medi extracel·lular. L'Anexina V és una proteïna d'unió a fosfolípids que té gran afinitat per la fosfatidilserina. D'altra banda, el iodur de propidi s'utilitza per a diferenciar entre cèl·lules viables, no viables i necròtiques, ja que les cèl·lules viables amb membranes plasmàtiques intactes exclouen el iodur de propidi i en canvi, membranes de cèl·lules danyades i mortes son permeables a aquest. A la figura 9 es mostra una representació de com es van distribuir les poblacions cel·lulars segons la tinció amb FITC i iodur de propidi.

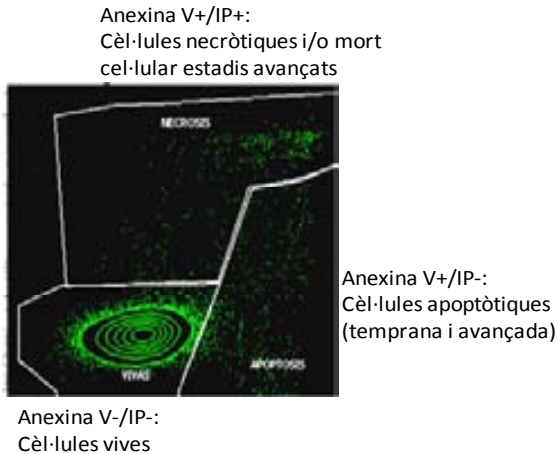


Figura 9. Imatge de la distribució de població viva, morta i en procés de mort cel·lular en les cèl·lules HT29. Esquerra inferior: població de cèl·lules vives o doble negatives (Anexina V-/IP-), dreta inferior: població de cèl·lules apoptòtiques (Anexina +/IP -) Dreta superior: població de cèl·lules en estat avançat de mortalitat i cèl·lules necròtiques (Anexina V+/IP+).

Per a realitzar els experiments, les cèl·lules HT29 van ser transfectades amb siRNAs siCNT i siPKM2 (veure apartat 3.4.) en plaques de 12 pous (Nunc) deixant 24 hores per a la transfecció dels oligòmers de siRNA i per assegurar la total adherència de les cèl·lules a la superfície de la placa. Es van tractar les cèl·lules amb dosis única d'oxaliplatí 10 μ M durant diferents temps (24 i 48 h) i es van recollir per tripsinització tant les cèl·lules adherents com els sobrenedants (veure apartat 3.1.1). Aquestes cèl·lules van ser resuspeses a una concentració de 1.10^6 cèl·lules/ml en tampó d'unió a Annexina (*Annexin Binding Buffer*). De cada condició es van transferir 1.10^5 cèl·lules a un tub de citometria de 5 ml a on es va afegir 5 μ l de FITC-Anexina V i 5 μ l de Iodur de Propidi deixant incubar durant 15 minuts a temperatura ambient i protegides de la llum. Finalment es va afegir tampó d'Anexina V i es va analitzar per citometria de flux en un període no superior a 1 hora amb el citòmetre BD *FACSCanto II* (Beckton Dickinson). Abans d'analitzar les nostres cèl·lules tractades es va realitzar una compensació de fluorescència dels canals pel Iodur de Propidi i pel fluorocrom FITC així com amb controls cel·lulars positius i negatius per a apoptosi. Es van analitzar un mínim de 1.10^4 cèl·lules per mostra i al menys tres rèpliques per condició experimental.

3.7. ESTUDIS PROTEÒMICS

FONAMENT

Les tècniques de proteòmica comparativa en gels de poliacrilamida de 2 dimensions (2D-PAGE) són mètodes àmpliament utilitzats per a l'estudi funcional i comparatiu dels proteomes procedents de cèl·lules, teixits o altres tipus de mostres biològiques. Aquestes tècniques permeten separar proteïnes segons dues propietats independents: punt isoelèctric (1a dimensió) i pes molecular (2a dimensió), per a una posterior identificació. Milers de proteïnes diferents poden ser separades obtenint una valuosa informació de cada una d'elles com és el pes molecular aparent, la quantitat de cada proteïna o les possibles modificacions post-traduccionals com a causa o conseqüència d'algun efecte biològic. La tècnica 2D-DIGE (Electroforesi Bidimensional Diferencial en Gel), descrita per primera vegada per *Ünlü* el 1997 (153), és una tecnologia d'estudi proteòmic comparatiu més recent que aconsegueix la separació i visualització del patró proteic de 2 ó més mostres pre-marcades amb fluoròfors de diferents espectres en un mateix gel en dues dimensions, permetent detectar i quantificar diferències biològiques en l'expressió proteica amb gran fiabilitat estadística i minimitzant l'error entre gels 2D.

En la primera part d'aquesta tesi es va fer ús de les tècniques de proteòmica comparativa convencional (2D-PAGE) per a estudiar les diferències proteiques entre les línies HT29 i HTOXAR3, mentre que les tècniques 2D-DIGE es van aplicar en les cèl·lules HT29siCNT i HT29siPKM2 per a poder identificar les proteïnes relacionades -directa o indirectament- amb l'expressió de PKM2. A continuació es detallen els passos que es van seguir per poder identificar i validar quins canvis proteics succeeixen entre aquestes línies cel·lulars.

3.7.1. Proteòmica comparativa convencional

Aquesta tècnica es va desenvolupar al laboratori de farmacologia i ciències farmacològiques de la Universitat Southern California (USC), sota la direcció del Dr. Nouri Neamati.

3.7.1.1. Primera dimensió: isoelectroenfoc

Els extractes proteics necessaris per dur a terme els experiments es van obtenir mitjançant el *kit ReadyPrep sequential extraction* (Bio-Rad) obtenint dues fraccions proteiques de cada línia cel·lular de diferents graus de solubilitat. La quantificació dels continguts proteics de cada fracció es va realitzar utilitzant el mètode de Bradford (Pierce). De cada fracció proteica de cada línia cel·lular, 150 µg de proteïna total van ser resuspendos en tampó de rehidratació i carregats sobre tires seques d'isoelectroenfoc IPG de 17 cm de llargada i amb un rang de pH 3-10 (Bio-Rad). La rehidratació es va fer a les safates d'enfoc mantenint 50 V entre 12 i 16 hores a temperatura constant de 20°C. Les condicions d'isoelectroenfoc van ser: voltatge final de 10.000 V i rampa ràpida de 40.000 a 60.000 V/h tot mantenint la temperatura a 20°C. Un cop finalitzada la primera dimensió i abans de començar la segona, s'equilibraren les tires IPG en tampons complementats amb SDS en dues fases: 10 minuts en tampó equilibrador I seguits de 10 minuts més d'incubació en tampó equilibrador II.

Solucions:

Tampó de rehidratació: Urea 8 M; CHAPS 2%; DTT 50 mM; Bio-Lyte 0,2%; amfòlit 3/10 i traces de blau de bromofenol.

Tampó equilibrador I: Urea 6 M; Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8); SDS 2%; DTT 2% (w/v) i glicerol 20%

Tampó equilibrador II: Urea 6 M; Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8); SDS 2%; iodoacetamida 2,5% (w/v) i glicerol 20%

3.7.1.2. Segona dimensió: electroforesi

Per a la segona dimensió, les tires IPG equilibrades foren alineades a la part superior dels gels de poliacrilamida al 12% i segellades amb 0,5% agarosa de baix punt de fusió (agarosa *low melting*). La separació de proteïnes es va fer en dues etapes: la primera a 16 mA/gel durant 1 hora i la segona de 24 mA/gel en un temps de 5 i 6 hores. Un cop finalitzada l'electroforesi, abans de procedir a la identificació, els gels es van rentar en aigua destil·lada, fixats per assegurar la desnaturalització de les proteïnes durant tot el procés, i tenyits, bé amb *SYPRO-Ruby Protein Stain Gel* (Bio-Rad), bé amb tinció de plata (Bio-Rad) seguint els protocols proveïts pels fabricants. Els gels obtinguts de les fraccions proteiques de cada línia cel·lular s'escanejaren amb un equip *Typhoon 8610* (GE Healthcare). Les imatges resultants de cada fracció proteica d'ambdues línies cel·lulars es processaren amb el software PDQest 7.0 (Bio-Rad) per a la identificació de les possibles alteracions en l'expressió proteica entre aquestes dues línies cel·lulars. Es van realitzar un mínim de tres experiments independents.

La figura següent esquematitza tot el procés de separació proteica en 2 dimensions a partir d'una mostra proteica detallat als apartats anteriors.

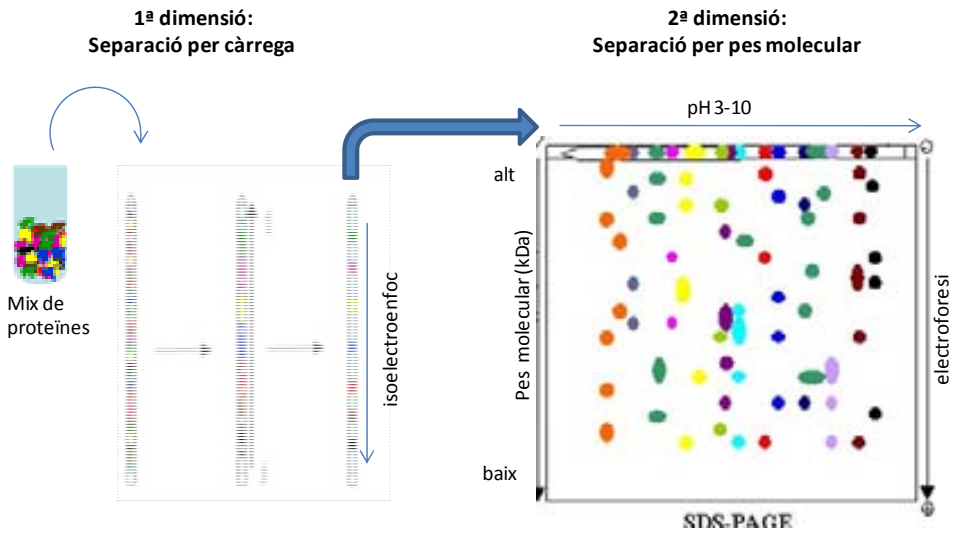


Figura 10. Esquema representatiu de la separació proteica en dues dimensions. La primera dimensió o isoelectroenfoc es realitza en tires d'acrilamida de llargada i rang de pH determinats. Un cop les proteïnes de la mostra han quedat retingudes en el lloc corresponent al seu punt isoelectrífic es realitza la segona dimensió en gels de poliacrilamida al 12% a on aquestes proteïnes es desplaçaran segons el seu pes molecular.

3.7.1.3. Identificació dels punts proteics

La identificació i caracterització de les mostres es va dur a terme mitjançant la tècnica d'espectrometria de masses, tecnologia clau en la identificació i la mesura d'abundància de molècules peptídiques en mostres biològiques al ser eficient, ràpida, precisa i amb una elevada resolució.

Els punts proteics seleccionats foren extrets dels gels SDS-PAGE utilitzant perforadors de biòpsies (Acuderm). Els punts proteics prèviament tenyits amb plata foren sotmesos a un tractament de destinció, de reducció amb DTT i d'alquilació amb iodoacetamida per a evitar la formació de ponts disulfur, tot just abans de la digestió dels seus pèptids amb tripsina (Promega) prèviament

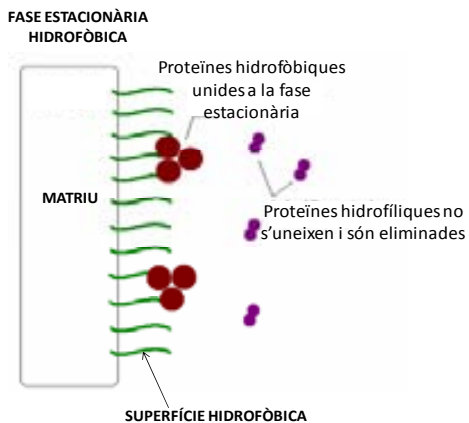
metil·lada per reduir l'autòlisi. La digestió proteica es va dur a terme durant tota la nit a una temperatura constant de 37° C.

Separació Peptídica per Cromatografia de Fase Reversa

El pèptids digerits amb tripsina es separen mitjançant cromatografia en columna capil·lar de fase reversa (HPLC) utilitzant la Bomba *-MS ThermoFinnigan Surveyor MS-Pump* en conjunció amb una columna capil·lar de fase reversa BioBasic-18 100 mm x 0,18 mm (ThermoFinnigan, Waltham, MA). En la separació peptídica en columnes esdevenen dues fases:

Fase sòlida estacionària: formada per columnes compostes de partícules de suport esfèriques, poroses, formades principalment de sílice a les que se'ls ha adherit una molècula de diferent naturalesa segons la interacció d'interès, en aquest cas, una partícula no-polar (cadenes alquil o anells fenil).

Fase líquida mòbil: formada pels pèptids obtinguts de la separació proteica en dues dimensions. Abans de passar per la fase estacionaria, els pèptids s'equilibraren just abans de la injecció de la mostra a la columna amb dues solucions eluents que contenen solvents polars: solució A composta per àcid acètic al 0,1% en H₂O_d i solució B amb àcid fòrmic 0,5% diluït en acetonitril. El mecanisme d'unió dels pèptids a la columna es produeix per atracció hidrofòbica amb els lligands hidrofòbics i no-polars, facilitat



perquè la mostra peptídica es troba en solució aquosa polar. L'elucidació de la

mostra peptídica s'aconseguí disminuint la seva polaritat al afegir components orgànics (p.ex. acetonitril).

Espectrometria de Masses

L'estudi de masses es realitzà amb l'espectròmetre de masses de trampa iònica ThermoFinnigan LCQ Deca XP Plus, equipat amb *nanospray* ionitzador (ThermoFinnigan, Waltham, MA). Els espectres de massa s'adquireixen en un rang de massa/càrrega [m/z] de 400 a 1.800. La identificació de les proteïnes es va dur a terme a través de la tècnica d'espectrometria de masses en tàndem amb l'ajut del software *Mascot* (Matrix Science). Aquestes identificacions proteiques foren confirmades i completades amb l'anàlisi informàtic *TurboSequest* (Bioworks Browser v3.2) i de servidors de bases de dades a on comparar les proteïnes teòricament obtingudes amb grans bases de dades de proteïnes ExpASY (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>).

3.7.2. 2D-DIGE

Aquesta tècnica es va realitzar al laboratori de la Unitat de Proteòmica de l'Institut d'Oncologia Vall d'Hebrón (VHIO), sota la direcció del Dr. Francesc Canals.

Amb l'objectiu d'estudiar si existien alteracions en el proteoma de les cèl·lules HT29 com a conseqüència del silenciament transitori de PKM2, es van dur a terme experiments de proteòmica comparativa 2D-DIGE entre cèl·lules HT29-siCNT (C) i cèl·lules HT29-siPKM2 (PKM2). Es van necessitar 4 rèpliques de cada condició experimental: 4 mostres de control de transfecció HT29-siCNT (C1, C2,

C3, C4) i 4 mostres de cèl·lules amb PKM2 silenciada (PKM2 1, PKM2 2, PKM2 3, PKM2 4). A totes les mostres es van analitzar els nivells proteics de PKM2 per Western Blot (apartat 3.7.3) abans de ser utilitzades per a la proteòmica comparativa per verificar el correcte silenciament de la proteïna.

3.7.2.1. Extracció proteica

Per a l'extracció proteica es realitzà la lisi de cèl·lules amb tampó de lisi del *kit Clean Up (GE Healthcare)*. Durant l'extracció de les proteïnes, les mostres es sonicaren (5 polsos de 10" i 10" de descans) per a l'eliminació dels àcids nucleics. Un cop obtinguts els extractes proteics precipitats, es varen resuspendre en tampó de lisi inicial i es portà a 20 µl per a ajustar el pH a 8,8-9. L'ajust de pH és important per a aconseguir una correcta separació de les mostres durant la primera dimensió. Seguidament es realitzà la quantificació de les proteïnes amb el *kit RC DC (Bio Rad)* basat en el mètode de *Löwry*, prenent BSA [estoc 3 mg/ml] com a estàndard proteic. Totes les mostres s'ajustaren amb tampó de lisi a una concentració 5 µg/µl.

3.7.2.2. Rehidratació de les tires d'isoelectroenfoc

Abans de realitzar el marcatge de les mostres amb els fluoròfors (Cyes) es realitzà la rehidratació passiva (sense l'aplicació de cap camp elèctric durant el procés) de les tires d'isoelectroenfoc (tires *IPG, GE Healthcare*), en safates d'hidratació. Les tires IPG utilitzades eren tires de plàstic amb acrilamida al 4% i un rang de pH de 3-10 de 24 cm de llargada. Per a la seva rehidratació s'incubaren durant 24 hores amb un tampó de rehidratació. Per evitar

l'evaporació i la formació de cristalls, cada una d'aquestes tires foren cobertes amb oli.

3.7.2.3. Marcatge de les mostres

El marcatge no saturant es realitzà amb els fluoròfors *CyeDye DIGE fluor dyes* (GE Healthcare). Els fluoròfors Cy3 (vermell) i Cy5 (verd) s'utilitzaren pel marcatge de les mostres i el fluoròfor Cy2 (blau) pels estàndards interns. Aquests estàndards interns estan constituïts per quantitats equivalents de totes les rèpliques de cada mostra (quatre controls i quatre amb PKM2 silenciada) per establir un referent intern. A cada gel es carregà 400 pmol de fluoròfor (Cy2, Cy3 o Cy5) per 50 µg de mostra (ó estàndard), ja que a quantitats inferiors dels fluoròfors es perd sensibilitat i a concentracions molt elevades es podrien formar múltiples molècules de fluoròfors i provocar la visualització de múltiples punts proteics per a una sola proteïna. Es carregà un mateix volum de totes les mostres per a garantir que la reacció amb els fluoròfors fos el més similar i comparable possible. D'altra banda, ambdues mostres es marcaren amb tots dos fluoròfors (*dye swap*) per a assegurar-nos que les diferències entre gels siguin degudes a variacions reals entre mostres i no a que un fluoròfor emeti amb més intensitat que l'altre. Cada gel llavors, conté mostra estàndard, mostra control i mostra amb PKM2 silenciada. Un cop afegits els fluoròfors a les mostres i als estàndards interns, es van deixar durant 30 minuts en gel i tapades de la llum per a que es donés la reacció de marcatge. Per a aturar la reacció s'afegí 1 µl de lisina a cada mostra i aquestes es guardaren a -20°C fins a realitzar la primera dimensió.

Per preparar les mostres per a la primera dimensió, es barrejaren 12 µl de cada una de les mostres diferencialment marcades (p.ex. C (1) + PKM2 (1) + estàndard Intern) i es rehidrataren en tampó de mostra.

3.7.2.4. Primera dimensió: isoelectroenfoc

La primera dimensió es realitzà utilitzant el sistema *Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare). Per a que totes les proteïnes es situïn al llarg de la tira segons el seu punt isoelèctric (punt d'equilibri o de càrrega neta zero) es va aplicar el programa de voltatge per a tires de 24 cm i rang de pH 3-10:

1. <i>Step and hold</i>	300 V	x	3h
2. Gradient	1000 V	x	6h
3. Gradient	8000 V	x	3h
4. <i>Step and hold</i>	8000 V	x	5,4h
5. <i>Step and hold</i>	50 V	x	4h

El voltatge final aplicat va ser de 64.000 V en un temps total de 16-20 hores protegint les tires d'isoelectroenfoc (tires IPG) de la llum.

3.7.2.5. Segona dimensió: SDS electroforesi

Un cop completat l'isoelectroenfoc, les tires IPG varen ser equilibrades en tampons equilibradors just prèviament a la segona dimensió per a mantenir-les en un rang de pH apropiat per a la electroforesi. S'incubaren en tampó equilibrador I durant 15 minuts i en tampó equilibrador II durant 15 minuts més per a assegurar amb aquest pas una desnaturalització completa de les proteïnes i evitar estructures que puguin interferir en la posterior identificació.

Per a l'electroforesi es realitzaren 4 gels de poliacrilamida al 12,5% i s'utilitzà un sistema d'electroforesi *Ettan DALT six system* (GE Healthcare). A la part superior dels gels s'alinearen les tires IPG anteriorment equilibrades i s'aplicà voltatge en dues fases: etapa inicial de 2,5 W/gel durant 30 minuts i una segona etapa de 17 W/gel durant 6 hores per a aconseguir la correcta migració de les proteïnes al llarg dels gels.

Un cop finalitzada la segona dimensió, les proteïnes quedaren separades segons punt isoelèctric i pes molecular. Els 4 gels van ser escanejats en el *Typhoon Variable Mode System Imager* (GE Healthcare). De cada un d'ells es va obtenir la imatge dels canals per separat (Cy2, Cy3 i Cy5) i en conjunt (*merge*). L'anàlisi de les imatges es realitzà amb el software *Samespot v4.0* (Nonlynear Dynamics). Es realitzà l'alineament de tots els gels i es quantificà la intensitat relativa de cada punt proteic en cada grup (HT29siCNT vs HT29siPKM2) i respecte a l'estàndard intern. Els punts que mostraren diferències s'analitzaren estadísticament utilitzant tests ANOVA. Entre tots els diferents nivells de restricció aplicables s'escolliren per a ser identificats aquells punts proteics que presentaven un rati d'expressió siCNT vs siPKM2 (*fold*) $\pm 1,5$ i un valor $p \leq 0,01$. A la figura 11 es resumeix el procés de marcatge i obtenció dels gels 2D-DIGE.

Solucions:

Tampó de rehidratació: Urea 8 M; CHAPS 2%; amfòlits 10 $\mu\text{l/ml}$ i blau de bromofenol 1%

Tampó de mostra: Urea 8 M; CHAPS 2%; amfòlits 10 $\mu\text{l/ml}$; DTT 2%; blau de bromofenol 1%;

Tampó equilibrador I: Tris-HCl 75 mM; Urea 6 M; Glicerol 30%; DTT 2%; SDS 2,5%; blau de bromofenol 1%

Tampó equilibrador II: Tris-HCl 75 mM; Urea 6 M; Glicerol 30%; DTT 2%; SDS 2%; iodoacetamida i blau de bromofenol 1%

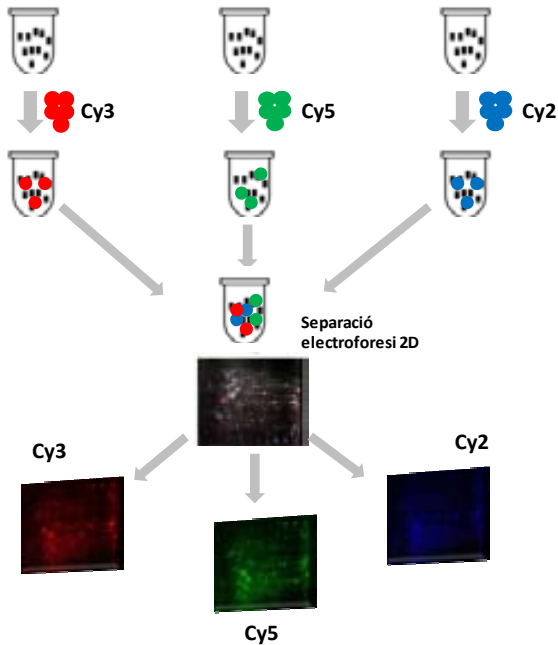


Figura 11. Il·lustració esquemàtica de 2D-DIGE. Esquema representatiu del procés de marcatge i electroforesi. Les mostres experimentals són marcades amb fluoròfors Cy3 o Cy5. Un tercer estàndard intern (generat per un pool de quantitats equivalents de cada mostra biològica de l'experiment) és marcat amb Cy2. Les tres mostres marcades es combinen i co-electroforesen al mateix gel 2D. Després de la 1^a i 2^a dimensió, els respectius patrons dels punts proteics poden ser visualitzats per il·luminació del gel amb diferents longituds d'ona per als diferents fluoròfors.

3.7.2.6. Identificació proteica

Dos dels gels foren fixats i guardats a -20°C i els altres dos es van tenyir amb Flamingo Ruby per aconseguir visualitzar els punts proteics i poder localitzar en el gel d'aquells seleccionats per a ser identificats. Amb l'Ettan Spot Picker (GE Healthcare), sistema robòtic que localitza els punts proteics i els escindeix del gel automàticament, es va obtenir cada un dels punts escollits. Seguidament, aquests punts van ser digerits enzimàticament amb tripsina a 37°C durant tota la nit i els pèptids resultants es van barrejar amb el material de ionització per a ser analitzats per espectrometria de masses MALDI-TOF, LC-ESI o MALDI-TOF/TOF (Bruker) i obtenir així l'empremta peptídica i la identificació de cada un

d'ells amb l'ajut del software Mascot (Matrix Sciences). La confirmació d'aquestes proteïnes identificades es realitzà amb l'ús de servidors de grans bases de dades proteiques de la mateixa manera que per a la proteòmica comparativa convencional (apartat 3.7.1.3.).

La validació de les proteïnes que van mostrar diferències significatives tant per proteòmica comparativa convencional com per 2D-DIGE van ser validades per tècnica de Western Blot com s'especifica al següent apartat.

3.7.3. Western Blot

S'analitzaren per aquesta tècnica els nivells de diverses proteïnes en les diferents línies cel·lulars d'adenocarcinoma de còlon amb els següents propòsits:

1. Validació de les proteïnes diferencialment expressades entre les línies HT29 i HTOXAR3 per proteòmica comparativa 2D-PAGE.
2. Validació del silenciament de PKM2 a nivell proteic.
3. Validació en 1 dimensió de les proteïnes diferencialment expressades mitjançant tècnica 2D-DIGE.

3.7.3.1 Extracció i quantificació proteica

Les cèl·lules es deixaren descongelar 15 minuts en gel. Acte seguit s'afegí solució freda de lisi complementada amb inhibidors de proteases (Roche) i es mantingueren les cèl·lules en agitació constant durant 30 minuts a 4°C. Les cèl·lules lisades es passaren a tubs de 1,5 ml i es centrifugaren durant 20 minuts a 12.000 rpm i 4°C per separar la fracció proteica (sobrenedant) de la fracció restant formada per membranes plasmàtiques, ADN i altres components cel·lulars. Aquests sobrenedants es recolliren en tubs nous separant 60 µl d'extracte proteic per a la seva quantificació. Aquesta quantificació es va

realitzar en plaques de 96 pous amb el kit BCA (Pierce) basat en el mètode Bradford i, utilitzant BSA [2 mg/ml] com a proteïna estàndard. La solució reactiva (*Working Reagent*) es barrejà amb 25 µl de proteïna total i es deixà durant 30 minuts a 37 °C fins a la seva quantificació en un lector de colorimetria *Varioskan Flash* (Thermo®) a una longitud d'ona de 562 nm. La recta patró es va considerar vàlida si pel mètode dels mínims quadrats el valor R^2 és inferior a 0,95.

Un cop quantificades les proteïnes, per a concentrar aquelles mostres que es trobessin massa diluïdes es va procedir a fer una precipitació proteica TCA/DOC en la que la mostra és precipitada en deoxicolat 2% (1/100 volum) durant 30 minuts i seguidament amb àcid tricloroacètic 100% (1/10 volum) entre 1-24 hores a 4°C. Després de conseqüents rentats i centrifugacions es varen resuspendre en tampó de mostra per a tenir totes les mostres a una concentració 5 µg/µl.

Solucions:

Tampó NP-40: Nonidet P-40 1%; Tris-HCl (pH 8) 20 mM; NaCl 137 mM; EDTA 2 mM; Glicerol 10%

Inhibidors de proteases: aprotinina 1 mg/ml (SIGMA); pepstatina 1 mg/ml (Alexis Biochemicals); PMSF 100 mM (SIGMA) i Leupeptina 1 mg/ml (Alexis Biochemicals);

DOC 2%: deoxicolat 2% en H₂O_d

TCA 100%: 454 ml H₂O/Kg Tricloroacetat (TCA). Mantingut a 4 °C i tapat de la llum

Tampó de mostra: LDS 4X (Invitrogen); DTT 0,1 M (Invitrogen)

Tampó RIPA PLUS: PBS 1X; NP-40 1%; Na deoxicolat 0,5%; SDS 0,1%; EDTA 1 mM; NaF 50 mM; NaVO₃ 5 mM; Inhibidors de proteases lliure d'EDTA (Roche Diagnostics)

3.7.3.2. SDS-PAGE

L'electroforesi de proteïnes es va realitzar en gels desnaturalitzants de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) al 10% d'1 mm de gruix (Invitrogen) i 1,5 mm

de gruix (BioRad). Es van carregar entre 10 i 50 µg de proteïna diluïda en tampó de càrrega amb un marcador de pes molecular de rang 3,5-260 kDa (NovexSharp, Invitrogen).

Solucions:

MOPS: MOPS 50 mM; Tris-Base 50 mM; SDS 0,1%; EDTA 1 mM

Tampó de càrrega: LDS 1X; DTT 0,1 M i H₂O_d

3.7.3.3. Transferència a membrana de PVDF

Per a transferir les proteïnes separades prèviament durant l'electroforesi a una membrana de PVDF (Millipore) es van utilitzar dos sistemes diferents: 1) transferència semi-seca i 2) transferència en mullat per a detectar aquelles proteïnes que no havien pogut ser identificades pel primer sistema.

Les membranes de PVDF s'activaren prèviament amb metanol pur i s'incubaren durant 10-15 minuts amb tampó de transferència. Per a la transferència semi-humida s'aplicà un voltatge constant de 15 V durant 30 minuts mentre que per a la transferència en mullat s'aplicà un voltatge de 100 V al sistema durant 1 hora. La validació d'una correcta transferència proteica es realitzà amb tinció reversible de *Ponceau S* (*Sigma*). Per a poder continuar amb la incubació dels anticossos es van destenyir les membranes PVDF amb peròxid de potassi (KOH 0,1 M) durant 5-10 minuts en agitació fins a la desaparició del tint per complet.

Solucions:

Tampó de transferència: Tris 27 mM; Glicina 197 mM; Metanol 20%

Ponceau S: Ponceau S 0,1% (w/v); àcid acètic 5% (w/v).

Solució de destinció KOH: KOH 0,1 M en H₂O_d

3.7.3.4. Immunodetecció

En aquesta tesi doctoral, s'han detectat els nivells proteics per Western Blot de les proteïnes que apareixen a la taula 2 en les línies cel·lulars d'adenocarcinoma de còlon HT29, HTOXAR3 i HCT116 seguint el següent protocol:

1. Activació de les membranes de PVDF amb metanol absolut
2. Rentat amb H₂O_d i incubació amb PBS 1X
3. Bloqueig de les membranes amb solució de BSA 10% o tampó de bloqueig (Licor Biosciences) durant 1-2 hores en agitació contínua a temperatura ambient (TA)
4. Incubació amb els anticossos primaris diluïts en tampó de bloqueig durant 1h a RT o bé tota la nit (O/N) a 4°C en agitació contínua
5. Rentat de les membranes amb TBS/PBS-Tween 0,1% (PBS-T)
6. Incubació amb els anticossos secundaris durant 45-60 minuts
7. Rentat de les membranes amb PBS-T
8. Revelat de les membranes PVDF: 2 sistemes de detecció:
 - 8.1 Revelat per raigs X: les membranes s'incuben prèviament amb un agent quimioluminiscent (Immobilon, Millipore) i s'exposen durant el temps necessari al film (Super RX, FUJIFILM) fins a la obtenció de senyal.
 - 8.2 Escaneig de les membranes i detecció per làser amb el sistema Odyssey® (Licor Biosciences).
9. Quantificació de bandes proteiques:
 - 9.1 Software Image J v1.37
 - 9.2 Software Odyssey® v2.0 (Licor Biosciences)

Anticòs primari	Pes molecular (kDa)	Hoste	Dilució anticòs 1ri	Anticòs 2ri	Dilució anticòs 2ri
PKM2 (Ab)	58	Conill	1/2000	Anti-conill-HRP (CS)	1/4000
PKM2 (CS)			1/2000	Anti-conill 680CW (LB)	1/10000
Plakoglobina (Ab)	87	Ratolí	1/1000	Anti-ratolí 800CW (LB)	1/10000
HSP90 α (M)	90	Conill	1/8000	Anti-conill 680CW(LB)	1/10000
HSP60 (SC)	60	Ratolí	1/2000	Anti-ratolí-HRP (CS)	1/20000
				Anti-ratolí 800CW (LB)	1/10000
HSP70 (SC)	70	Ratolí	1/4000	Anti-ratolí-HRP (CS)	1/40000
HSC70 (SC)	70	Ratolí	1/4000	Anti-ratolí 800CW (LB)	1/10000
Enolasa1 (SC)	48	Conill	1/8000	Anti-conill-HRP (CS)	1/2000
Ezrina (SC)	89	Ratolí	1/500	Anti-ratolí 800CW (LB)	1/10000
Importina B1 (Ab)	97	Conill	1/2500	Anti- conill 680CW(LB)	1/10000
RAN (Ab)	26	Conill	1/2000	Anti- conill 680CW(LB)	1/10000
FKBP4 (Ab)	52	Conill	1/3000	Anti- conill 680CW(LB)	1/10000
B-Actina (S)	42	Conill	1/1666	Anti-conill-HRP (CS)	1/2000
Actina (S)			1/2000	Anti-conill 680CW (LB)	1/10000
α -Tubulina (S)	60	Ratolí	1/15000	Anti-ratolí 800CW (LB)	1/15000
					1/20000

Taula 2. Proteïnes analitzades per Western Blot. A la taula es mostra el pes molecular de la proteïna, el tipus d'anticòs primari i secundari i les dilucions òptimes utilitzades per a la seva detecció.* CS: Cell Signaling; Ab: Abcam; M: Millipore; S: Sigma SC: Santa Cruz Biotechnologies; LB: Licor Biosciences.

3.8. IMMUNOCITOQUÍMICA

La localització subcel·lular de PKM2 es va estudiar en les línies HCT116, HT29 i HTOXAR3 amb tècniques d'immunocitoquímica i observació mitjançant microscòpia de fluorescència. Per a la fixació, permeabilització, bloqueig i incubacions amb anticossos específics es va realitzar el següent protocol:

Es van sembrar les cèl·lules en cambretes de cultiu Falcon BD (Beckton Dickinson) i EZ multi-portaobjectes (Millipore) i es deixaren adherir durant 24 hores per tal de tenir una confluència aproximada del 80% el dia de la fixació i tinció per tal d'evitar la saturació de la cambreta. Un cop adherides a la superfície, es netejaren els pous amb PBS 1X estèril i es realitzaren els tractaments amb oxaliplatí a dosis equivalents per a cada línia cel·lular a diferents temps. La fixació es va realitzar amb acetona freda pura durant 10 minuts a temperatura ambient deixant assecar posteriorment les mostres durant uns minuts. El bloqueig i permeabilització es va fer amb solució PBS-T/FBS durant 30 minuts i la incubació amb l'anticòs primari anti-PKM2 (dilució 1/100) en cabra humida es realitzà durant 1,5 h en agitació suau a temperatura ambient. Després dels 3 rentats amb PBS 1X s'afegí l'anticòs secundari anti-conill Alexa-568 (dilució 1/200) i es deixà durant 40 minuts en agitació suau a temperatura ambient i protegit de la llum. Un cop fets els rentats per eliminar les restes d'anticossos, es va fer la tinció dels nuclis amb *DAPI gold-antifade* (Invitrogen), medi de muntatge fluorescent que conté el tint nuclear i evita que es cremi la mostra per la sobreexposició a la llum. Es segellaren els portaobjectes i es guardaren tapats de la llum a 4°C fins a la seva observació amb el microscopi de fluorescència *Axio Observer Z1* (Carl Zeiss). Per determinar amb exactitud la localització subcel·lular de les proteïnes estudiades es realitzà un anàlisi per *Z-stack* amb talls de 0,750 µm. Aquesta aplicació permet obtenir una sèrie d'imatges transversals a diferents nivells de la cèl·lula.

Per a la obtenció de totes les imatges es va utilitzar el sistema *ApoTome* que inclou el microscopi *Axio Observer Z*. Aquest és un sistema òptic basat en tres graelles de diferents freqüències, que es modifiquen segons la condició de gruix de la mostra i el fluoròfor, que s'utilitza per a prevenir punts desenfocats i

possible soroll de fons de la mostra. D'aquesta manera, ens va permetre obtenir mostres d'alt contrast amb major resolució en la direcció Z de la que es podrien obtenir amb la microscòpia de fluorescència convencional.

Solucions:

Acetona freda (-20 °C)

PBS/T : PBS 1X estèril; Tritó X-100 0,3%

PBS/T/FBS : Tritó X-100 0,3%; FBS 10%; PBS 1X

3.9. ESTUDI EN PACIENTS

3.9.1. Pacients

El protocol que es va seguir per a l'estudi en pacients amb CCR avançat va ser el següent:

1. Selecció de casos a partir de blocs de parafina
2. Preparació de talls, desparafinització. Extracció d'ARN de talls parafinats
3. Retrotranscripció i anàlisi de l'expressió per qPCR
4. *Tissue microarray* i tinció immunohistoquímica
5. Correlació amb els paràmetres clínics: resposta al tractament

Es van incloure retrospectivament 41 pacients de càncer colorectal metastàtic confirmat histològicament. Els pacients eren majors de 18 anys, presentaven un estat funcional ≥ 2 i adequades funcions renals, hepàtiques i medul·lars. Els pacients van rebre quimioteràpia basada en oxaliplatí en primera línia. Aquests pacients rebien oxaliplatí bisetmanalment a una dosi de 85 mg/m² i.v. amb 5-fluoracil en infusió contínua setmanal de 48 hores a una dosi de 2,250 mg/m² amb un màxim de 12 cicles. El tractament va ser mantingut fins a la progressió

de la malaltia, toxicitat intolerable o retirada per rebuig per part del malalt. La mesura de respostes va ser obtinguda d'acord als estàndards de Criteris d'Avaluació de Resposta de Tumors Sòlids (criteris RECIST). El protocol d'estudi va ser aprovat pel comitè ètic local de l'Hospital Germans Trias i Pujol. Tots els pacients van rebre consentiment informat prèviament a la inclusió a l'estudi. Les dades principals recollides van ser les següents:

- Edat
- Localització tumoral
- Sexe
- Quimioteràpia adjuvant prèvia
- Localització metastàtica i nombre de lesions
- Resposta global
- Dates: diagnòstic/ inici quimioteràpia/ final quimioteràpia/ progressió/ èxitus

3.9.2. Estudi de PKM2 i altres marcadors en tumors de pacients amb CCR

Es va estudiar els nivells d'ARNm de PKM2 per qPCR i l'expressió proteica de Ki-67, Bcl-2 i p53 per immunohistoquímica.

3.9.2.1 Estudi d'expressió d'ARNm de PKM2 en teixit tumoral

3.9.2.1.1. Preparació de talls, desparafinització, extracció d'ARN

La preparació dels talls, la seva desparafinització i la posterior extracció d'ARN es va realitzar segons el protocol que es detalla a l'apartat 3.5.2.

3.9.2.1.2. qPCR #

L'anàlisi d'expressió gènica per tècnica de retrotranscripció i PCR quantitativa de les mostres procedents de tumors inclosos en parafina es van realitzar segons s'especifica a l'apartat 3.5.4.

3.9.2.2. Estudi de Ki-67, bcl-2 i p53 per immunohistoquímica

3.9.2.2.1. Obtenció d'un Tissue Microarray a partir de blocs parafinats de tumor

Els *microarrays* de teixit (*Tissue Microarrays*) és una tècnica utilitzada per a l'anàlisi de l'expressió de proteïnes simultàniament en múltiples mostres de teixit i en un mateix bloc o portaobjectes (figura 12), reduint de forma significativa la possible variabilitat inter-mostrals a la hora d'analitzar histològicament una o diverses proteïnes.

En primer lloc, es fa una tinció de les mostres amb hematoxilina i eosina per tal d'identificar les àrees millor preservades. El teixit corresponent a aquestes zones es mostreja aleatòriament dels blocs de tumor parafinat sense preferència especial per les diferents parts del tumor. S'obtenen tres centres cilíndrics de 0,6 mm de diàmetre de cada bloc "donador" utilitzant una estació de treball de *Tissue Microarray MTA-1* (Beecher Instruments) que posteriorment s'inserten en un bloc "acceptor" en forma d'"array" fins a un total de 96 cilindres. D'aquest bloc acceptor s'obtenen els diferents talls a tenyir amb l'anticòs corresponent.

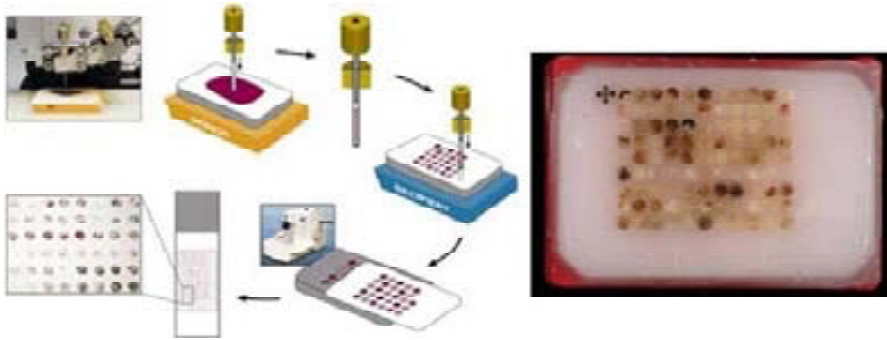


Figura 12. Esquerra: Dibuix- esquema del procés d'obtenció de les mostres histològiques i la formació del *tissue microarray*. Dreta: imatge exemple d'un *tissue microarray*.

3.9.2.2. Immunohistoquímica

A partir del *tissue microarray* es van fer seccions de 5 micròmetres de gruix que van ser desparafinades, hidratades, immerses en tampó citrat i autoclavades. Les seccions van ser incubades durant 30 minuts en sèrum de conill i posteriorment es va incubar amb els anticossos primaris específics (taula 3) durant 22 hores a temperatura ambient. Les mostres van ser rentades i incubades amb anticòs secundari anti-ratolí conjugat amb biotina a una dilució 1/700 i incubats posteriorment en PBS/peròxid d'hidrogen al 6% 15 minuts a temperatura ambient prèviament a l'adició del complex peroxidasa avidina-biotina (Dakopatts). El cromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride va ser afegit i la tinció i contatge es va fer amb hematoxilina de Harris. Com a control negatiu es va fer servir sèrum de ratolí no immune. La quantificació dels resultats va ser adaptada al patrons de tinció per a cada anticòs. Per a p53 i ki-67, les mostres es van classificar segons el percentatge de cèl·lules positives de la següent manera: **0**: <10%; **1**: 10% a 25%; **2**: 25% a 50%; o **3**: >50%. Per a Bcl-2 els tumors van ser analitzats com a positius o negatius.

Anticòs	Proveïdor	Dilució	Tècnica	Paràmetres avaluats
p53 (clon DO7)	Novocastra	1/500	Dako Autostainer	Percentatge
Bcl-2	Dako	1/350	Ventana Nexes	Immunoreactivitat vs negatives
Ki-67(clon MIB-1)	Dako	1/600	Dako Autostainer	Percentatge

Taula 3. Anticossos, proveïdors, dilucions, tècniques i paràmetres avaluats durant la immunohistoquímica. Tots els anticossos primaris foren anticossos monoclonals de ratolí contra proteïna humana.

3.10. ESTADÍSTICA

A continuació es descriuen els mètodes estadístics utilitzats en aquesta tesi a excepció de l'anàlisi dels resultats obtinguts per 2D-DIGE que es pot trobar a l'apartat corresponent a la pag. 137. Tots els càlculs s'han realitzat amb el programa PASW Statistics 18 (IBM) exceptuant l'anàlisi de corbes dosi-resposta que s'ha portat a terme amb el programa PRISM 4 (GraphPad Software).

3.10.1. Prova dels rangs amb signe de Wilcoxon

Aquesta és una prova no paramètrica per a comparar la mediana dels valors d'una variable contínua donada entre dues mostres relacionades (siCNT vs. siPKM2 i HT29 vs. HTOXAR3) i determinar si existeixen diferències entre elles. Es va utilitzar com a alternativa a la prova t d'Student en els casos que no es va poder assumir normalitat dels valors de les mostres a comparar. Es van considerar diferències estadísticament significatives quan el p valor associat va ser inferior a 0,05. A la taula 4 s'enumeren les comparacions on s'ha utilitzat aquesta prova així com l'apartat i pàgina on es poden trobar els resultats.

Comparació	Apartat	Pàg.
Nivells d'expressió proteica i ARNm HT29 vs. HTOXAR3	4.1.2. 4.1.3.	109 110
Apoptosi per Anexina V/IP siCNT vs. siPKM2	4.2.4.	123
Validacions proteïnes 2D-DIGE per WB siCNT vs. siPKM2 HT29 vs. HTOXAR3	4.4.3.	148

Taula 4. Resum de les tècniques a on s'han utilitzat la prova dels rangs amb signe de Wilcoxon per determinar les diferències entre les diferents condicions experimentals. A la taula està indicat la comparació realitzada, l'apartat i la pàgina a on es poden trobar els resultats.

3.10.2. Correlació d'Spearman

Es va calcular el coeficient de correlació d'Spearman, ρ (ro) com a mesura de la correlació entre les variables aleatòries contínues IC_{50} i nivells d'ARNm de PKM2 a l'apartat 4.1.3. de la pàg. 110. Es va considerar que existia correlació quan el valor r va ser major que 0,5 en valor absolut i va tenir un p-valor associat inferior a 0,05.

3.10.3. Corves dosi-resposta

Les diferències estadístiques entre les IC_{50} obtingudes a l'apartat 4.2.2.2. (pàg. 117), es van determinar mitjançant la representació gràfica de les corresponents corbes dosi-resposta i el subseqüent anàlisi per regressió no lineal i test F. Per a la construcció de les corbes, es van transformar les dades de dosi calculant el corresponent $\text{Log}[\text{dosi}]$ i representant-les a l'eix de les abscisses i es van normalitzar els valors obtinguts de viabilitat, definint el màxim a 100% i el mínim

a 0%, i representant-los a l'eix d'ordenades. Es van considerar diferències significatives quan el p-valor associat va ser inferior a 0,05.

3.10.4. Prova U-Mann Whitney

Aquesta prova es va utilitzar per a comparar el grau de translocació nuclear entre les cèl·lules sensibles i resistents tractades a una mateixa dosi i temps (apt. 4.3. pàg. 126). Donat que dins de cada experiment es van contar múltiples camps i que en algun cas, algunes imatges no van poder ser avaluades, les dades es van analitzar de forma independent. També es va utilitzar en la comparació de la distribució de les diferents fases del cicle cel·lular entre siCNT i siPKM2 a una mateixa dosi i temps d'exposició a oxaliplatí (apartat 4.2.3. pàg. 119). En aquest cas, es va escollir aquest test donat que alguns experiments no van poder-se tenir en compte per la gran variabilitat i per tant, vam escollir un test no paramètric per dades no relacionades.

3.10.5. Taules de contingència i test de Chi-quadrat i Fisher

Es van construir taules de contingència per tal de correlacionar les variables categòriques clíniques (localització tumoral, sexe, quimioteràpia adjuvant prèvia, localització metastàsica) i la resultant de transformar la variable contínua "nivells d'ARNm de PKM2" en una variable categòrica (valors per sobre o per sota del quartil més baix) amb la resposta a la quimioteràpia (apt. 4.5. pàg. 152). Les dades observades es van contrastar amb les teòriques mitjançant el test de Chi-quadrat sempre i quan, la freqüència esperada de totes les caselles fos superior a 5. En cas contrari, es va utilitzar el test de Fisher. També es van calcular el risc associat i els intervals de confiança al 95% en cada cas.

3.10.6. Regressió logística

Per tal de avaluar el valor dels nivells d'ARNm de PKM2 com a factor predictiu de resposta independent es va realitzar un model de regressió logística ajustat a p53, Bcl-2 i Ki-67 com a covariables categòriques. Les covariables del model final van ser definides utilitzant la metodologia de entrada en bloc. Es va considerar una correlació significativa quan el p-valor associat va ser inferior a 0,05.

4. RESULTATS

4.1. RESULTATS OBJECTIU 1

ESTUDI PROTEÒMIC COMPARATIU DE RESISTÈNCIA A OXALIPLATÍ

Els resultats corresponents a aquest objectiu han sigut publicats a la revista científica *Molecular Cancer Therapeutics* l'any 2009 (154)(veure annex).

4.1.1. Perfil proteòmic de resistència adquirida a oxaliplatí

Per tal de comprovar quins canvis a nivell de proteoma s'havien donat com a conseqüència del procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí, es van obtenir extractes proteics de les línies HT29 i HTOXAR3 i es van comparar mitjançant l'obtenció d'un perfil proteòmic bidimensional. En primer lloc, aquests extractes proteics es van sotmetre a separació per punt isoelèctric (1a dimensió) en un rang de pH entre 3 i 10 mitjançant isoelectroenfoc i posteriorment a electroforesi convencional en gel de poliacrilamida-SDS per a obtenir la segona dimensió. Com a resultat es van obtenir al voltant de 1.000 punts per a cada línia dividits en dues fraccions proteiques (figura 1). Utilitzant el software PDQest, aquells punts corresponents a proteïnes que es mostraven al menys 4 vegades infra o sobreexpressades a la línia resistent quan es comparava amb la línia sensible, van ser processats per a poder ser identificats. Només uns pocs punts van ser suficientment abundants per a ser eficientment detectats i analitzats per espectrometria de masses i per les bases de dades públiques (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

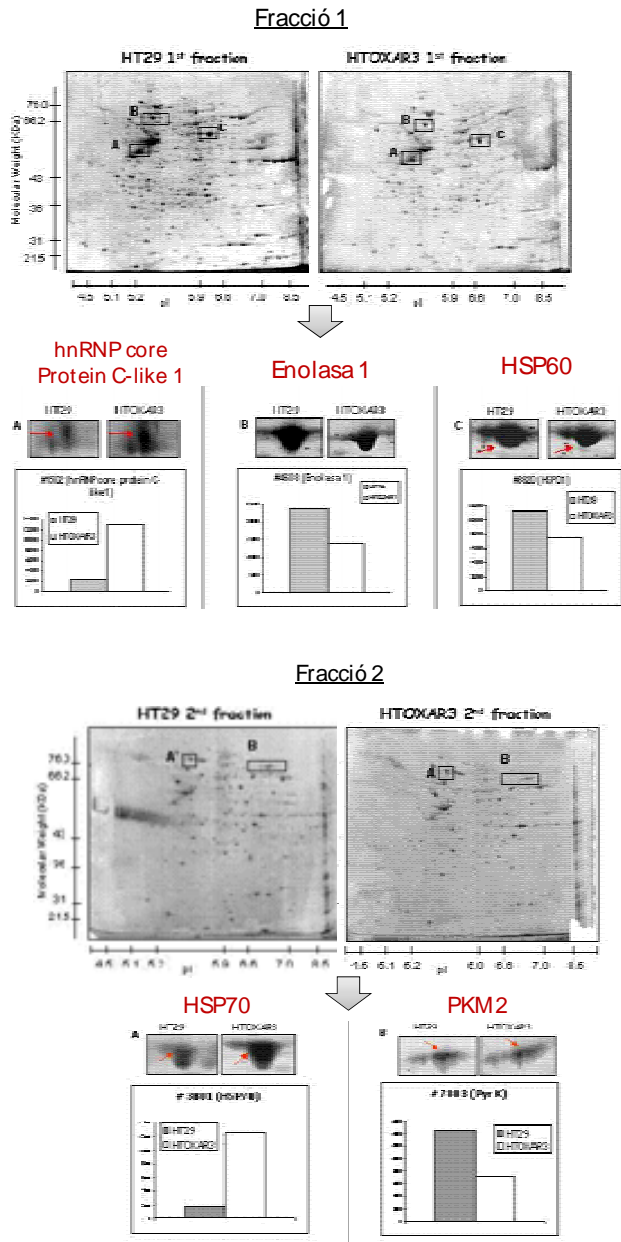


Figura 1. Imatges dels gels 2D SDS-PAGE dels perfils proteics de les línies HT29 i HTOXAR3. De la fracció soluble (fracció 1) es van poder identificar les proteïnes hnRNPCL1, Enolasa 1 i HSP60, mentre que de la fracció insoluble (fracció 2), únicament HSP70 i PKM2 van mostrar diferències en la seva expressió de al menys quatre vegades.

A la base de dades *Swiss-Prot* es van identificar cinc d'aquestes proteïnes: hnRNPCL1 (*heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein C-like* ; 32 kDa *Swiss-Prot* No. O60812), HSP60 (*Heat Shock Protein 60*; 60 kDa *Swiss-Prot* No. P10809), HSP70 (*Heat Shock Protein 70*; 70 kDa *Swiss-Prot* No. P08107), Enolasa 1 (*Enolase 1*; 48 kDa *Swiss-Prot* No. P06733) i PKM2 (*Pyruvate kinase M2*; 58 kDa No. P14618 and P14786).

Com es mostra a la figura 1, les proteïnes HSP60, Enolasa 1 i PKM2 es van trobar menys expressades a la línia HTOXAR3, mentre que les proteïnes hnRNPCL1 i HSP70 es trobaven incrementades respecte les cèl·lules sensibles HT29.

4.1.2. Validació de proteïnes relacionades amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí

Per tal de confirmar els resultats obtinguts de la proteòmica comparativa, les proteïnes HSP60, HSP70, Enolasa 1 i PKM2, es van analitzar per proteòmica convencional en 1 dimensió mitjançant Western Blot.

Com es mostra a les figures 2A i 2B, l'expressió proteica de HSP60 i PKM2 es manté significativament inferior a la línia HTOXAR3 respecte HT29. Pel que fa a Enolasa 1 i HSP70, no es van trobar diferències significatives entre ambdues línies cel·lulars mitjançant aquesta tècnica.

Per tal de conèixer si les diferències d'expressió són degudes a canvis post-transcripcionals, s'analitzaren els nivells d'ARNm de les proteïnes PKM2 i HSP60 per tècnica de PCR quantitativa a temps real.

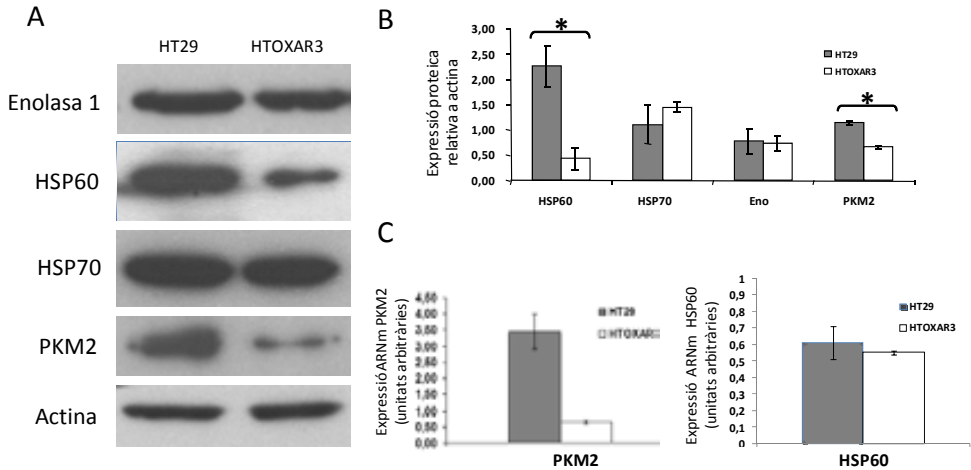


Figura 2. Expressió de les proteïnes Enolasa 1, HSP60, HSP70 i PKM2. A. Imatge representativa obtinguda dels Western Blots corresponents per a cada proteïna en les dues línies cel·lulars i prenent actina com a control intern. B. valors promig de l'expressió relativa de cada proteïna. C. Expressió relativa d'ARNm de PKM2 i HSP60 en les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 (* p<0,05). En tots els casos, un mínim de 3 experiments independents es van realitzar. Les barres verticals en els gràfics corresponen a \pm la desviació estàndard. Eno: Enolasa 1.

No es van observar diferències significatives en l'expressió gènica de HSP60 però sí es va confirmar la menor expressió d'ARNm de PKM2 a la línia resistent HTOXAR3. A més, les diferències per a PKM2 entre línies cel·lulars són majors a nivell d'ARNm (5 vegades) que a nivell de proteïna (1,8 vegades) com es mostra a les figures 2B i 2C.

4.1.3 Expressió de PKM2 en altres línies cel·lulars de carcinoma colorectal humà

Per tal de confirmar si els nivells de PKM2 poden tenir també una relació amb el grau de resistència intrínseca a oxaliplatí, es van estudiar els nivells d'ARNm de PKM2 en un panell de 8 línies de carcinoma i adenocarcinoma de còlon (SW480,

HCT116, LS411N, LS513, LS1747, SW1417, SW48 i SW1116) amb diferents graus de sensibilitat a aquest platínat (valorats segons IC_{50}). Tal i com es mostra a la figura 3, els nivells d'ARNm de PKM2 foren inversament proporcionals a la sensibilitat que les línies cel·lulars presentaven al fàrmac (*Spearman* $r = -0,846$, $P = 0,008$), mostrant d'aquesta manera uns nivells de PKM2 més elevats en les línies cel·lulars amb una sensibilitat major (i per tant, menor IC_{50}) i els nivells més baixos de PKM2 en aquelles que mostraven més resistència a l'acció de l'oxaliplatí.

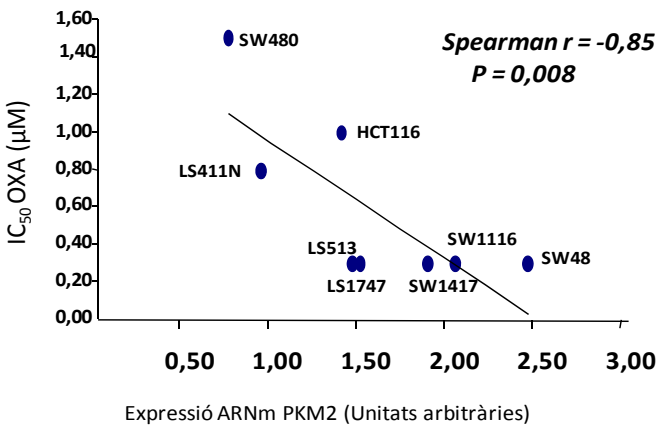


Figura 3. Expressió de PKM2 en línies d'adenocarcinoma colorectal i resposta a oxaliplatí. Gràfic de correlació entre l'expressió gènica de PKM2 i la resistència intrínseca a oxaliplatí en un panell de 8 línies cel·lulars de CCR.

Per tal d'entendre quin és l'efecte de l'oxaliplatí en l'expressió gènica de PKM2, les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 van ser tractades a una concentració 15 μ M, dosi corresponent a la IC_{70} per a les HT29 i la IC_{30} per a les HTOXAR3 (figura 4) durant 24 hores. Passat aquest temps es va substituir el medi que contenia oxaliplatí per medi fresc. La recollida de cèl·lules es va fer a temps 0 (no tractament), 4, 24, 48 i 72 h post-tractament i tant la viabilitat cel·lular com els nivells d'ARNm de PKM2 van ser mesurats.

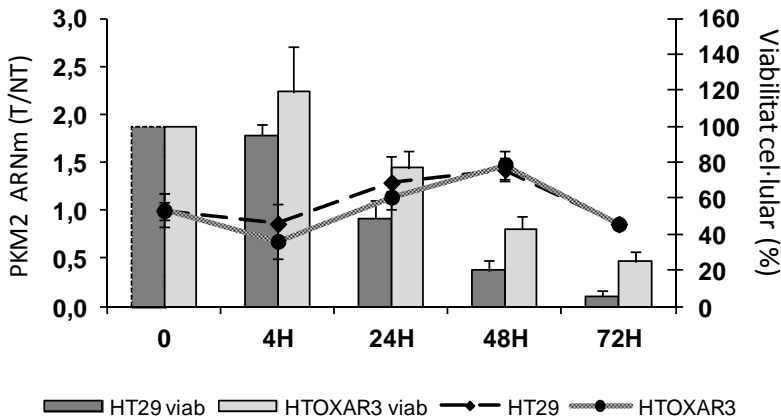


Figura 4. Expressió de PKM2 i viabilitat cel·lular en resposta a oxaliplatí en les línies HT29 i HTOXAR3. El gràfic de línies representa els nivells relatius d'ARNm de PKM2 entre cèl·lules tractades i sense rebre tractament per a cada temps de tractament. El gràfic de barres representa la viabilitat cel·lular relativa entre cèl·lules exposades a OXA(T) i sense rebre tractament (NT) en les línies HT29 i HTOXAR3 al llarg de les 72h d'exposició a OXA 15 µM. Un mínim de 3 experiments independents per a cada condició van ser realitzats. Les barres verticals en els gràfics corresponen a ± la desviació estàndard.

Com mostra la figura 4, ambdues línies mostren un comportament similar davant el fàrmac veient com, a partir de les 4 hores post-tractament hi ha un increment de PKM2 que es perllonga durant les 48 h següents coincidint amb un decreixement de la viabilitat cel·lular. A partir de les 48-72 h post-tractament, la viabilitat cel·lular pateix la major davallada de forma paral·lela amb la disminució dels nivells de PKM2. Cal remarcar que, encara que el comportament entre ambdues es similar, els nivells de PKM2 a la línia HT29 es mantenen més elevats que a la seva derivada resistent. Així mateix, com és d'esperar, les diferències en la viabilitat cel·lular entre ambdues línies es mantenen durant tot el temps d'exposició a l'agent platinat.

Tenint en compte aquests resultats, vam decidir aprofundir en l'estudi de la implicació de PKM2 en la resposta i resistència a oxaliplatí.

4.2. RESULTATS OBJECTIU 2

ESTUDI DEL PAPER DE PKM2 EN LA RESPOSTA A OXALIPLATÍ

En aquest objectiu, es pretén conèixer si PKM2 té un paper rellevant en la resposta a oxaliplatí i si existeix una possible relació (directa o indirecta) amb l'adquisició de resistència a aquest. Donat que la proteïna es troba menys expressada en la línia resistent, vam utilitzar la tècnica d'inhibició de l'expressió gènica per *siRNA* per tal d'emular aquest efecte a la línia sensible.

4.2.1. Silenciament de PKM2 en les línies HT29 i HCT116

La inhibició de l'expressió de PKM2 amb *siRNAs* es va realitzar a les línies HT29 i HCT116. La línia HT29 va servir com a referència i posada a punt de la tècnica en la que es va utilitzar el silenciament de GAPDH com a control positiu de silenciament (*siGAPDH*) per ser una proteïna altament expressada en la majoria de models cel·lulars (inclòs el nostre). També es va utilitzar un control negatiu de transfecció (*siCNT*), format per *siRNAs* que no contenen cap seqüència comú amb ARN humà i per tant, incapaç de silenciar cap gen, un control negatiu de toxicitat de transfecció (Mock) i 3 oligonucleòtids d'ARN específics per a l'ARNm de PKM2. La figura 5 mostra com es va obtenir un silenciament de PKM2 i GAPDH de més del 93 % tant a nivell d'expressió d'ARNm (figura 5A), com proteic (figura 5B) 48 hores després de la transfecció de *siRNAs*.

Com s'observa a la figura, els nivells de PKM2 i GAPDH no es modificaven entre *siCNT* i Mock i tampoc no es va obtenir un nivell significatiu de mort cel·lular per

toxicitat causada per la transfecció. En la línia HCT116 també es va aconseguir silenciar l'expressió de PKM2 amb una elevada eficiència (més del 93 %).

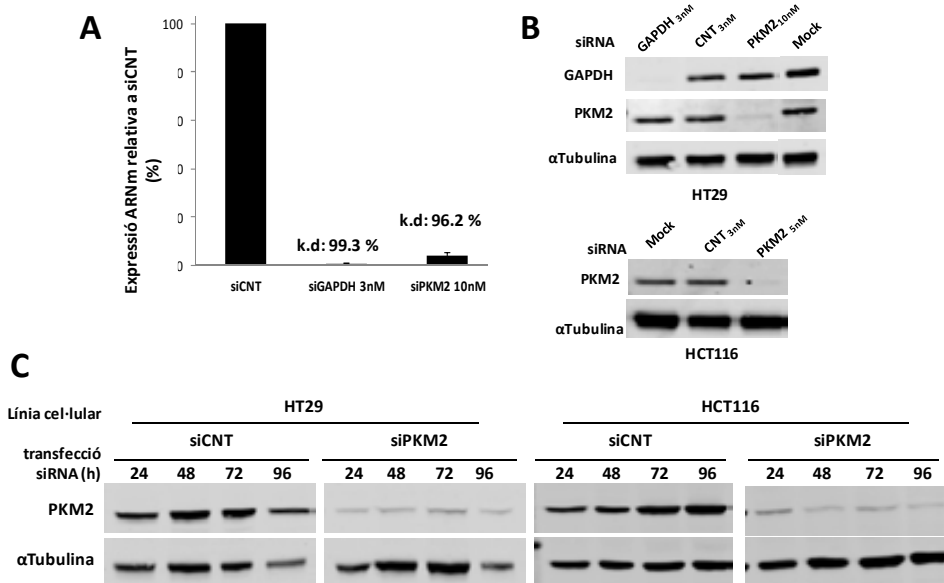


Figura 5. Silenciament de PKM2 en les línies d'adenocarcinoma de còlon humà. A. Validació del silenciament de GAPDH i PKM2 en HT29 a nivell d'ARNm mitjançant PCR quantitativa a temps real. B. Validació del silenciament proteic de PKM2 en les línies HT29 i HCT116. C. Silenciament proteic de PKM2 durant 24, 48, 72 i 96 hores posteriors a la transfecció dels oligos de *siRNA*. Per a cada condició experimental, un mínim de 3 experiments independents van ser realitzats.

Malgrat haver utilitzat una tècnica de silenciament transitori es va aconseguir mantenir la inhibició de l'expressió de PKM2 fins a 96 hores post-transfecció (figura 5C) assegurant així, que els resultats que es pogueren obtenir en experiments posteriors no s'alterarien a causa d'una reexpressió de la proteïna en aquest interval de temps.

4.2.2. Efecte del silenciament de PKM2 en la sensibilitat a oxaliplatí

Per estudiar si el silenciament de PKM2 afecta a la resposta a oxaliplatí en les cèl·lules tumorals de CCR es van utilitzar les tècniques d'assaig de viabilitat amb blau tripà i test de MTT. Aquests mètodes ens permeten determinar la capacitat proliferativa de cada línia cel·lular, conèixer si el fet de silenciar PKM2 per sí sola o bé, al tractar amb oxaliplatí, pot tenir algun efecte en la proliferació de les cèl·lules HT29 i comparar-ho amb la línia HCT116, més sensible a oxaliplatí i amb p53 wt.

4.2.2.1. Determinació de l'alteració de la viabilitat cel·lular causada per oxaliplatí

El recompte del nombre de cèl·lules vives i mortes després de silenciar PKM2 en les cèl·lules HT29 i d'exposar-les a un tractament amb oxaliplatí a una dosi 15 µM durant 24 hores es va realitzar mitjançant la tinció blau tripà, al llarg de diferents temps de recuperació (0, 24 i 48 hores) i es va comparar amb els resultats de les cèl·lules control HT29siCNT, tractades de la mateixa manera. Aquesta forma de tractament permet comprovar si la cèl·lula és capaç de recuperar-se de l'acció del fàrmac, o bé el dany és irreversible i, d'altra banda, comprovar si l'efecte és principalment citotòxic o citostàtic. La dosi d'oxaliplatí es va escollir en base a resultats anteriors en que s'havia demostrat que provocava una resposta citotòxica en aquestes cèl·lules i que, alhora, alterava els nivells d'expressió de PKM2 (figura 4, apartat 4.1.3.).

Els ràtios de viabilitat cel·lular entre cèl·lules vives exposades a oxaliplatí i cèl·lules vives sense rebre tractament es mostren a la figura 6A. Abans de procedir al contacte cel·lular, les cèl·lules es van observar per microscòpia òptica

i es van captar al menys 3 imatges aleatòries de cada pou de cultiu. A la figura 6B es mostren les imatges més representatives de cada condició experimental.

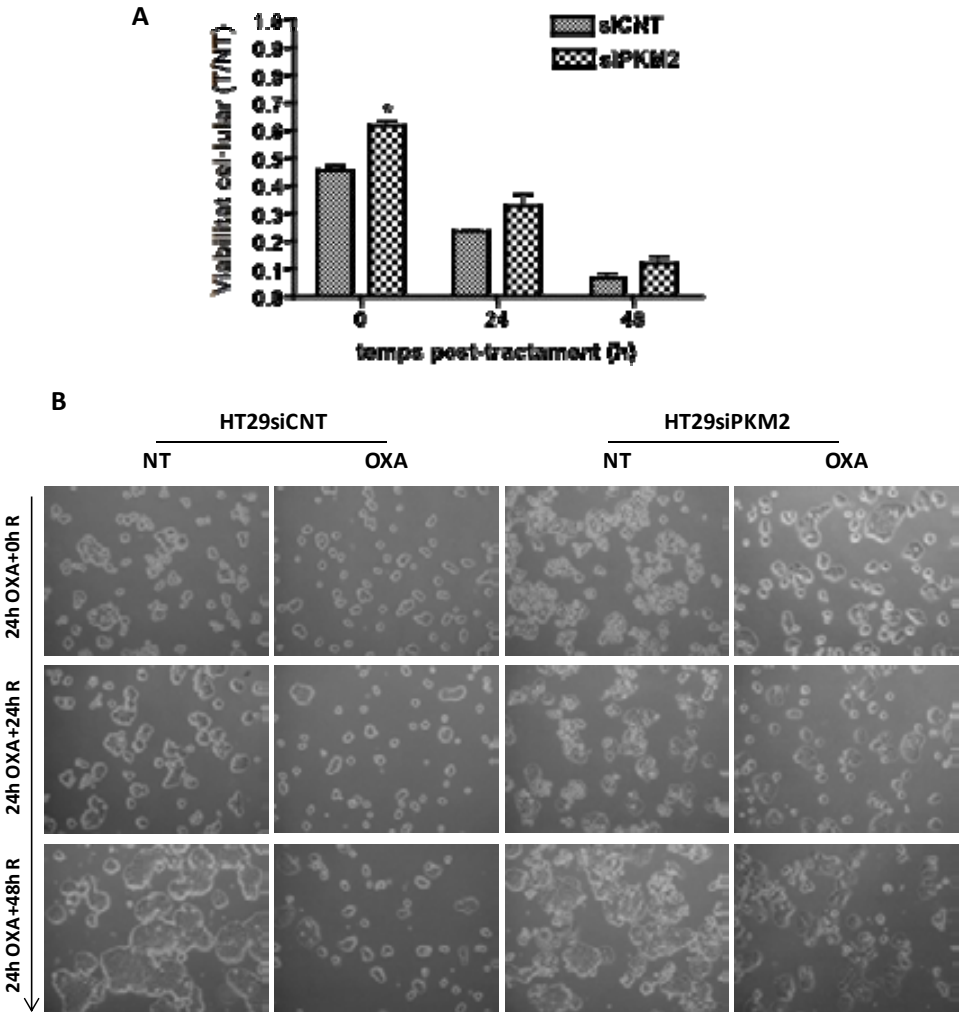


Figura 6. Determinació de la viabilitat cel·lular en resposta a oxaliplatí i silenciament de PKM2 en les cèl·lules HT29. A: Ràtios de viabilitat entre cèl·lules vives tractades amb OXA 15 µM i sense tractar a diferents temps. B: Imatges de microscopia òptica representatives de les cèl·lules HT29 siCNT i siPKM2 en cultiu i l'efecte de l'oxaliplatí al llarg del temps. Magnificació 10x. Les barres verticals en els gràfics representen la desviació estàndard. *: valor $p < 0.05$. R: temps de recuperació del tractament.

Com es mostra a la figura superior, es va poder detectar un clar efecte de l'oxaliplatí en la viabilitat cel·lular tant en les cèl·lules siCNT com en les cèl·lules amb PKM2 silenciada, observant-se un menor efecte en aquestes darreres. La viabilitat cel·lular disminueix progressivament al llarg del temps. Malgrat ser únicament significatiu a la primera condició (tractament sense recuperació), els ràtios de viabilitat com a efecte de l'oxaliplatí es mantenen lleugerament superiors en les cèl·lules siPKM2 i de manera constant en totes les condicions experimentals.

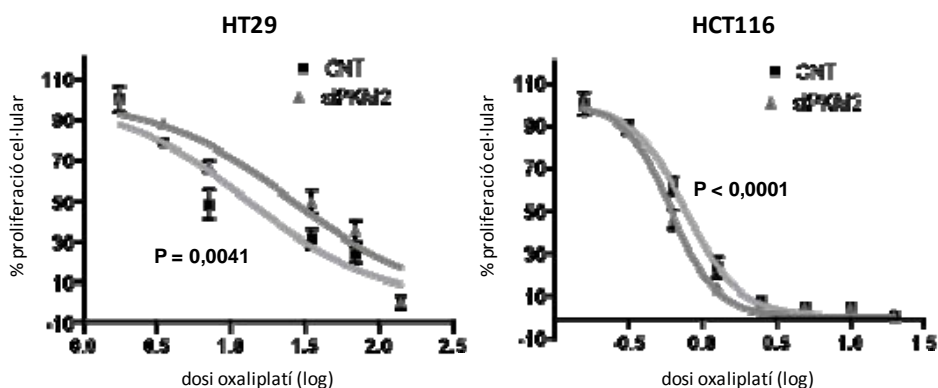
Cal mencionar que no es va obtenir una mort cel·lular superior al 6% en cap grup (dades no mostrades) i que, per una altra banda, mentre les cèl·lules que no van rebre tractament, mantenien els ritmes proliferatius entre 20-24h, com és d'esperar, es va observar que en resposta a oxaliplatí les cèl·lules allargaren els temps de doblatge a entre 50 i 100 hores, suggerint que l'oxaliplatí pot tenir un important paper citostàtic en aquestes cèl·lules. Es necessitaran tècniques més específiques per determinar quin és el paper predominant de l'oxaliplatí en els nostres models cel·lulars.

4.2.2.2. Anàlisi de la proliferació cel·lular en resposta a oxaliplatí i silenciament de PKM2

El silenciament de PKM2 en cada línia cel·lular es va dur a terme en plaques de 96 pous a una densitat de 1.000 cèl·lules/pou. Després de 48 h de transfecció es realitzaren els tractaments amb oxaliplatí a les dosis apropiades a la sensibilitat de cada una de les línies cel·lulars determinades anteriorment en el nostre laboratori. Les cèl·lules s'exposaren a l'acció de l'OXA durant 24 h i transcorregut aquest temps es realitzà el test de MTT (apartat 3.3.2.). Els resultats es mostren

a la figura 7. Un mínim de tres experiments i entre 4 i 8 rèpliques per condició van ser analitzats.

Segons els resultats obtinguts, mentre el silenciament de PKM2 en les cèl·lules HCT116 (p53 wt) sembla afavorir l'efecte de l'oxaliplatí, en les cèl·lules HT29 sembla ser que l'efecte és oposat, provocant un increment de la resistència al fàrmac d'un 52 % (figura 6) i corroborant la nostra hipòtesi.



OXALIPLATÍ IC ₅₀				
Línia cel·lular	siCNT (IC ₅₀ ±SD)	siPKM2 (IC ₅₀ ±SD)	Grau Resistència siPKM2/siCNT	valor P
HT29	17,1 ± 1,9	26 ± 4,2	1,52	0,0041
HCT116	1,02 ± 0,35	0,58 ± 0,13	0,56	<0,0001

Figura 7. Efecte del silenciament de PKM2 i l'acció citotòxica de l'oxaliplatí en les línies cel·lulars HT29 i HCT116. Resultats de l'anàlisi de viabilitat cel·lular per tècnica MTT. Imatge superior: corbes dosi-resposta per a cadascuna de les línies cel·lulars i condició experimental. Taula inferior: valors corresponents a la dosi inhibidòria del 50% per a cada condició experimental i grau de resistència obtinguts. Els valors IC procedeixen del valor mig de supervivència de tots els experiments independents realitzats. Les barres verticals en els gràfics corresponen a ± la desviació estàndard. SD: desviació estàndard.

4.2.3. Estudi de la influència de PKM2 en la pertorbació del patró del cicle cel·lular induïda per oxaliplatí

Donat que l'oxaliplatí provoca que les cèl·lules aturin el cicle cel·lular per a poder activar els mecanismes de reparació del dany generat a l'ADN, o bé activar la mort cel·lular si el dany no pot ser reparat, vam voler investigar si el fet de silenciar PKM2 tenia algun efecte en el control del cicle cel·lular al tractar amb oxaliplatí. Es va intentar estudiar la distribució de les diferents fases del cicle cel·lular mitjançant tinció amb iodur de propidi i anàlisi per citometria. Coneixent que p53 es troba mutada en les cèl·lules HT29 i que aquesta mutació provoca un cert grau de resistència a l'efecte de l'OXA, varem creure oportú estudiar la distribució del cicle cel·lular en aquestes cèl·lules i comparar-la amb la de les cèl·lules HCT116, que són p53 *wt* i significativament més sensibles a aquest agent, a una mateixa dosi i temps d'exposició al fàrmac.

Segons els nostres resultats, les cèl·lules control d'ambdues línies cel·lulars mantenen un mateix patró de distribució constant al llarg del temps veient com la majoria de la població es troba en fase G1. L'exposició a oxaliplatí, com a agent de dany genòmic, provoca un efecte ben diferent en el control del cicle entre ambdues línies cel·lulars, tal com podíem esperar. Com es mostra a la figura 8, es pot observar clarament l'efecte citostàtic que provoca l'oxaliplatí en les cèl·lules HCT116 ja que, al llarg de les 72 hores d'exposició continua al fàrmac, les cèl·lules romanen detingudes a les mateixes fases del cicle cel·lular (fases G1 i G2) degut als punts de control de cicle cel·lular que es troben als punts G1 abans d'entrar en fase S i G2 abans de continuar amb la mitosi. Efecte que justificaria el baix percentatge que s'observa de cèl·lules en fase S (o fase de síntesi) tant en el grup siCNT com en siPKM2. El silenciament de PKM2 *per sé* no

provoca cap canvi en el control del cycle cel·lular de les cèl·lules sense tractar de cap de les dues línies cel·lulars testades.

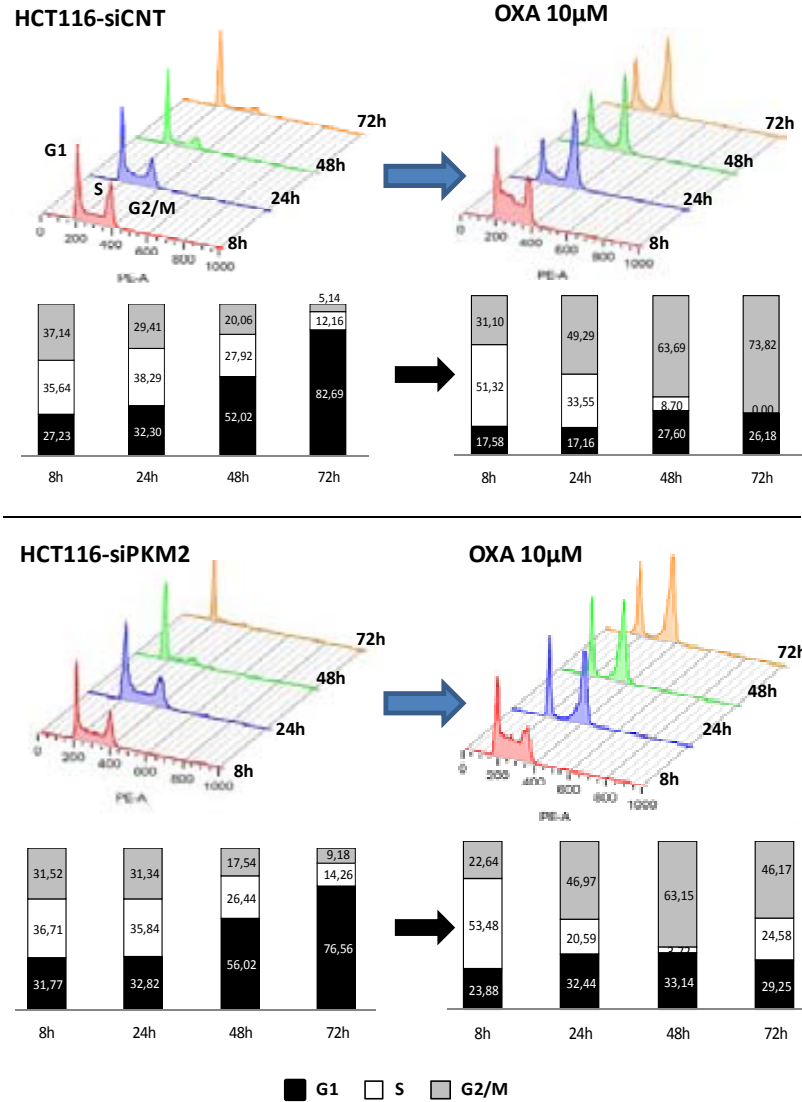


Figura 8. Alteracions en la distribució del cycle cel·lular en cèl·lules HCT116 en resposta al silenciament de PKM2 i/o al tractament a oxaliplatí durant 8, 24, 48 i 72 hores. Els gràfics 3D representen l'experiment més representatiu respecte els valors mitjos de, al menys, 3 experiments independents.

En canvi, el silenciament de PKM2 en les cèl·lules HCT116, únicament sembla incrementar lleugerament la retenció de cèl·lules en fase G1 respecte les cèl·lules siCNT tractades. Fet que podria explicar els resultats de MTT (apartat 4.2.2.2.) en els quals el silenciament de PKM2 en aquestes línies sembla afavorir la citotoxicitat provocada per l'oxaliplatí.

A les cèl·lules HT29 l'efecte citostàtic és ben diferent al de les cèl·lules HCT116. Degut principalment a l'estat mutacional de p53, aquestes cèl·lules "salten" el primer punt de control a G1 quedant la majoria d'elles retingudes en fase S durant les primeres 48 hores d'exposició a oxaliplatí, per acabar acumulant-se en fase G2/M 72 h després d'haver estat exposades a aquest, com també descriuen altres autors (68). La inhibició de PKM2 provoca un canvi de ritme cel·lular significatiu quan es compara amb el de siCNT, sobretot a les 48 i 72 h d'exposició amb el fàrmac ($p=0.05$ en ambdós casos). Aquelles cèl·lules que no expressen PKM2, mantenen un efecte similar durant les primeres 24 hores amb el fàrmac, però a les 48 h, i sobretot a les 72 hores, una gran proporció de cèl·lules es manté en fase de síntesi sense acabar d'observar en cap moment l'acumulació en G2/M que s'observa en les cèl·lules siCNT (figura 9). Es podria pensar, doncs, que aquest increment de cèl·lules en fase S degut al silenciament de PKM2 podria afavorir una resistència a l'efecte de l'oxaliplatí, o almenys alterar el ritme proliferatiu de la cèl·lula. Aquests resultats poden suggerir una relació entre l'estat mutacional de p53, la presència o absència de PKM2 i la resposta a oxaliplatí. Encara que no es mostren els resultats amb cèl·lules Mock, paral·lelament es van realitzar els mateixos experiments amb aquestes cèl·lules donant resultats obtinguts molt similars als obtinguts en les cèl·lules HCT116siCNT i HT29siCNT i demostrar que l'efecte de la transfecció és pràcticament nul.

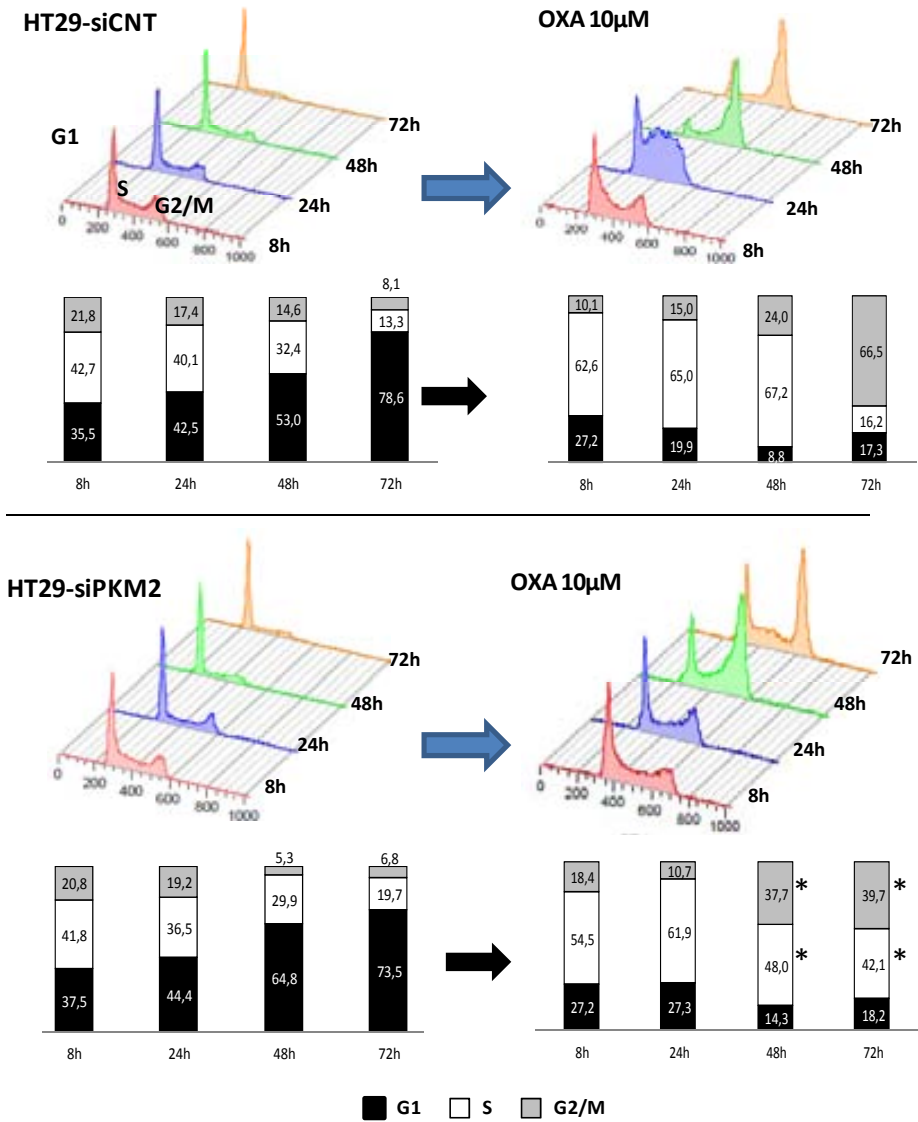


Figura 9. Alteracions en la distribució del cicle cel·lular en cèl·lules i HT29 (requadre inferior) en resposta al silenciament de PKM2 i/o al tractament a oxaliplatí durant 8, 24, 48 i 72 hores. Els gràfics 3D representen l'experiment més representatiu respecte els valors mitjos de 3 experiments independents. * valor p=0.05.

4.2.4. Estudi de l'efecte de la inhibició de l'expressió de PKM2 sobre l'activació d'apoptosi en resposta a oxaliplatí per test d'Anexina V/Iodur de Propidi

Després d'haver aconseguit inhibir quasi totalment l'expressió de PKM2, i en conseqüència modificar la sensibilitat a oxaliplatí en les cèl·lules HT29, ens varem proposar d'una banda, conèixer si l'acció de l'oxaliplatí en aquestes cèl·lules es tradueix en una activació de la mort cel·lular i estudiar mitjançant inhibició per *siRNAs* específics, en quin grau és important la presència o absència de PKM2 per modular i/o afectar a aquesta resposta.

Per a assolir aquest objectiu es van analitzar els patrons de tinció amb Anexina V i Iodur de Propidi (IP) al llarg de 48 hores per diferenciar les cèl·lules vives, apoptòtiques i necròtiques o amb mort cel·lular avançada com es defineix a l'apartat 3.6.2. És important remarcar que no s'han tingut en compte els resultats a 72 h degut a la elevada variabilitat obtinguda entre experiments, fent difícil la determinació d'un patró de resposta concret.

A la figura 10 es mostren els nivells d'apoptosi i necrosi/mortalitat avançada obtinguts mitjançant citometria de flux després d'una exposició contínua de les cèl·lules HT29 (*siCNT* i *siPKM2*) durant 24 i 48 hores a una dosi d'oxaliplatí 10 μ M. La distribució de les cèl·lules sense tractar va ser molt similar entre les cèl·lules *siCNT* i *siPKM2*, presentant entre un 90-95 % de cèl·lules viables al llarg de tot l'experiment. Pel que fa a l'acció de l'OXA, tant a les figures com als gràfics es mostra un lleuger increment de cèl·lules apoptòtiques i necròtiques o en avançat estat de mortalitat que no arriba fins a les 48 h d'exposició a aquest.

L'acció de l'OXA a les 24 h sembla ser gairebé nul en tots els casos i no és fins a les 48 h quan es comença a percebre un increment de la mort cel·lular

programada deguda a l'efecte de l'oxaliplatí. Efecte que resulta, malgrat no ser significatiu, lleugerament inferior en les cèl·lules siPKM2.

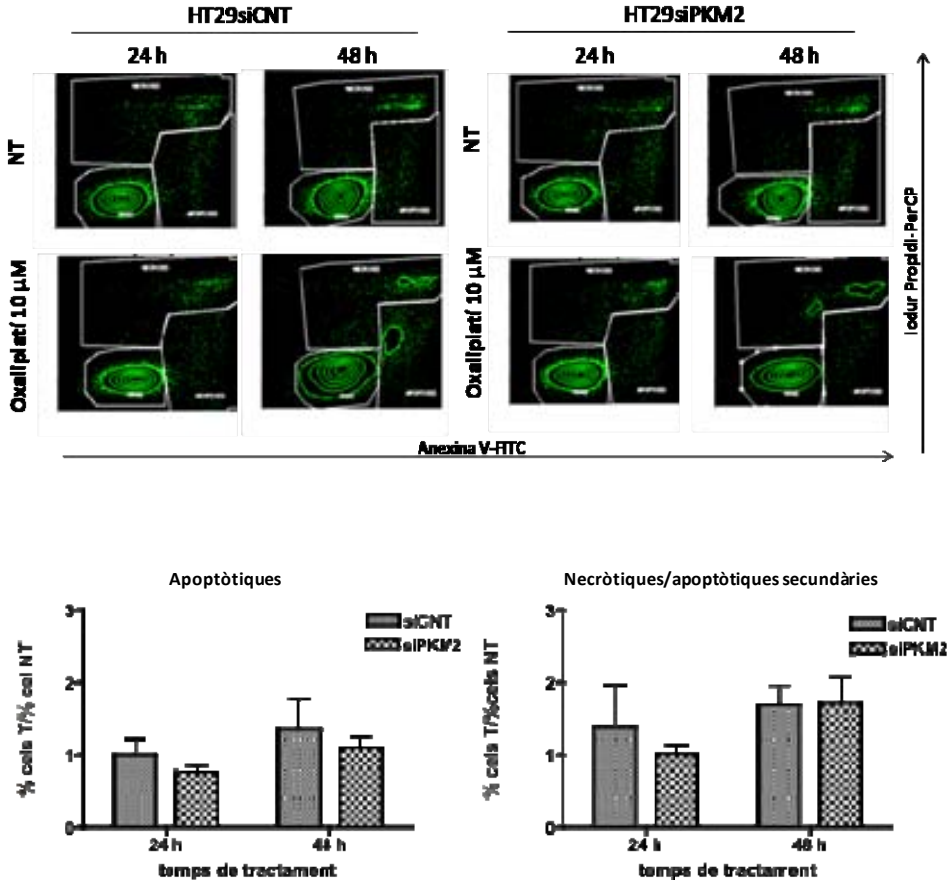


Figura 10. Activació d'apoptosi i mort cel·lular en resposta a oxaliplatí en cèl·lules HT29. Imatge superior. Anàlisi per citometria de flux de la doble tinció amb Anexina V-FITC/ iodur de propidi de les cèl·lules HT29si PKM2 i HT29siCNT tractades amb oxaliplatí 10 μM durant 24 i 48 h. Imatge inferior. Gràfic representatiu de l'efecte de l'oxaliplatí en l'increment de població apoptòtica i necròtica representat mitjançant el ràtio entre el percentatge de cèl·lules tractades amb OXA (cèl·lules T) i el de cèl·lules sense rebre tractament (cèl·lules NT). Un mínim de 3 experiments independents per a cada condició van ser realitzats. Les barres verticals en els gràfics corresponen a ± la desviació estàndard.

La població de cèl·lules necròtiques o en estat de mortalitat avançada (Anexina V positiva/IP positives) també incrementa al llarg del temps, i inclús més que la població de cèl·lules apoptòtiques, però podria ser degut en part, a aquella fracció de cèl·lules que havien estat apoptòtiques anteriorment (Anexina V positives) i avancen en el deteriorament de la cèl·lula, permetent la entrada del iodur de propidi, o bé a l'activació d'altres vies de mort cel·lular independents de caspases. Les cèl·lules HT29 es van "desenganxant" de la superfície a mesura que van morint i es troben en suspensió en el sobrenedant. Per aquest motiu es va creure oportú incloure aquesta població en suspensió en els experiments. Però també cal assenyalar que dita població pot contenir fragments cel·lulars (*debris*) que incrementin el recompte final d'aquesta població en avançat estat de mortalitat com observem, tant en les cèl·lules tractades, com sense tractar. En tot cas, és important remarcar que les cèl·lules HT29 (tant siCNT com siPKM2) no mostren en cap cas un increment d'apoptosi de més del 15 %. Aquest fet indica que l'activació de mecanismes de mort cel·lular programada, com l'apoptosi, no és la forma prioritària, al menys per a aquesta dosi de l'agent platinat. Aquests resultats corroboren resultats propis (Plasencia, C. Tesi Doctoral) i d'altres grups (113, 155).

4.3. RESULTATS OBJECTIU 3

LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE PKM2 EN RESPOSTA A OXALIPLATÍ

Stétak, A. i cols van demostrar que PKM2 és capaç de localitzar al nucli de les cèl·lules en resposta a l'estrès oxidatiu i al dany a l'ADN per H_2O_2 i per radiació UV respectivament (147). En aquest treball es va creure oportú estudiar la localització de PKM2 a les cèl·lules HCT116, HT29 i HTOXAR3 en resposta a oxaliplatí, donat que aquest produeix trencaments en l'ADN i genera estrès oxidatiu. Mitjançant immunocitoquímica i visualització per microscòpia de fluorescència, es van conèixer els possibles canvis de localització subcel·lular quan les cèl·lules s'exposen a diferents dosis d'oxaliplatí al llarg de 72 hores de tractament (veure apartat 3.8.). A diferència de l'estudi de Stétak, A. i cols. (147) en que veien translocació nuclear de PKM2 a partir de les 2 h d'exposició a l'agent genotòxic, nosaltres no vam observar translocació abans de les primeres 24 h, i per tant, els resultats es mostren per a 24, 48 i 72 hores.

Com s'observa a les imatges de la figura 11, quan les cèl·lules HCT116 no reben cap estímul, PKM2 es distribueix per tot el citoplasma de la cèl·lula, mentre que després de 24 hores d'exposició a la IC_{50} d'oxaliplatí ($1,65 \mu M$), PKM2 es troba al nucli en gairebé la meitat de les cèl·lules. Curiosament aquest efecte no dura més de 24 hores, ja que, a partir de les 48 h següents, es comença a apreciar l'efecte citotòxic del fàrmac i PKM2 deixa la seva localització nuclear (imatges de 48 i 72 hores de tractament).

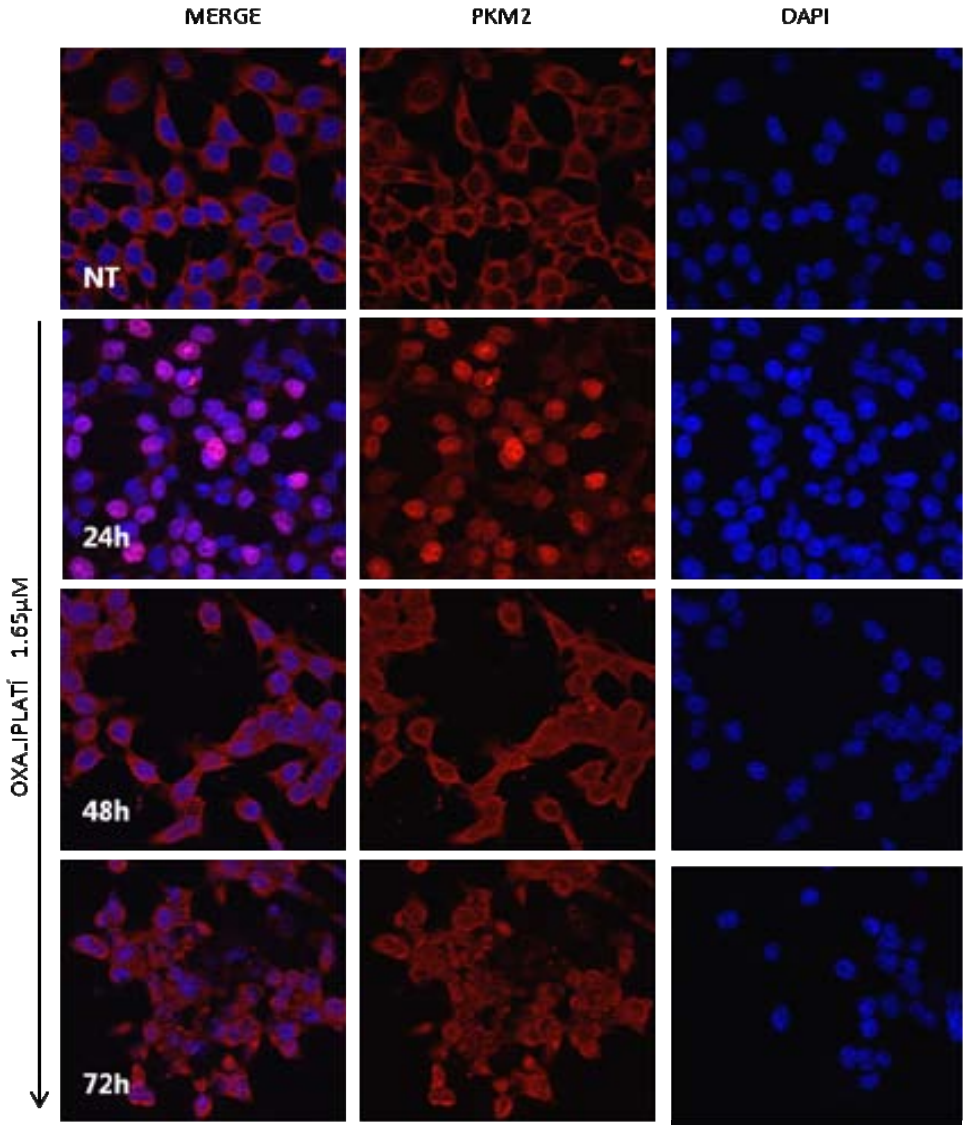


Figura 11. Localització subcel·lular de PKM2 en la línia HCT116 en estat basal (NT) i exposades a oxaliplatí 1,65 μM durant 24, 48 i 72 hores. Imatges esquerra (*Merge*): superposició dels dos canals en el que s'observen els nuclis i la distribució sub-cel·lular de PKM2. Centre (vermell): tinció de PKM2 amb anticòs anti-conill Alexa-568. Imatges dreta (blau): imatge dels nuclis tenyits amb DAPI. Objectiu 40x oli d'immersió.

Pel que fa a les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 en estat basal, PKM2 es troba distribuïda per tot el citoplasma i és en resposta a les diferents dosis i temps d'exposició a oxaliplatí quan es veuen les diferències de localització entre ambdues línies. Com mostren les figures 12 i 13, a una dosi 10 μ M, suficient per induir la mort del 50% de les cèl·lules HT29 però només el 25% de les HTOXAR3, PKM2 es localitza al nucli de les cèl·lules HT29 a partir de les 24 hores d'exposició a la droga i ho fa de manera creixent, fins a arribar a veure's translocada en més del 80% de les cèl·lules tractades a les 72 h. Mentre que, per contra, les cèl·lules resistents mostren una discreta i constant translocació nuclear de PKM2 que no arriba mai a ser superior al 11% i que fins i tot arriba a desaparèixer.

Per comprovar que la diferència en l'efecte de l'OXA sobre PKM2 no depenia de la dosi, es van tractar ambdues línies cel·lulars a la IC_{50} de les cèl·lules HTOXAR3. A les cèl·lules sensibles, la localització nuclear no s'observa fins a les 48 h de tractament tot i que aquesta es dona en un 75-80% de les cèl·lules. A les 72 h, el marcatge al nucli disminueix fins al 47,4% observant-se un increment de cèl·lules mortes o en procés de mort (figura 14). En el cas de les cèl·lules HTOXAR3, s'observa una marcada disminució de la tinció de PKM2 (figura 15) i les cèl·lules continuen sense assolir el grau de translocació observada en les cèl·lules HT29.

Cal remarcar també que sota l'estímul d'oxaliplatí PKM2 transloca al nucli gairebé en la seva totalitat, sense quedar cap proporció retinuda al citoplasma.

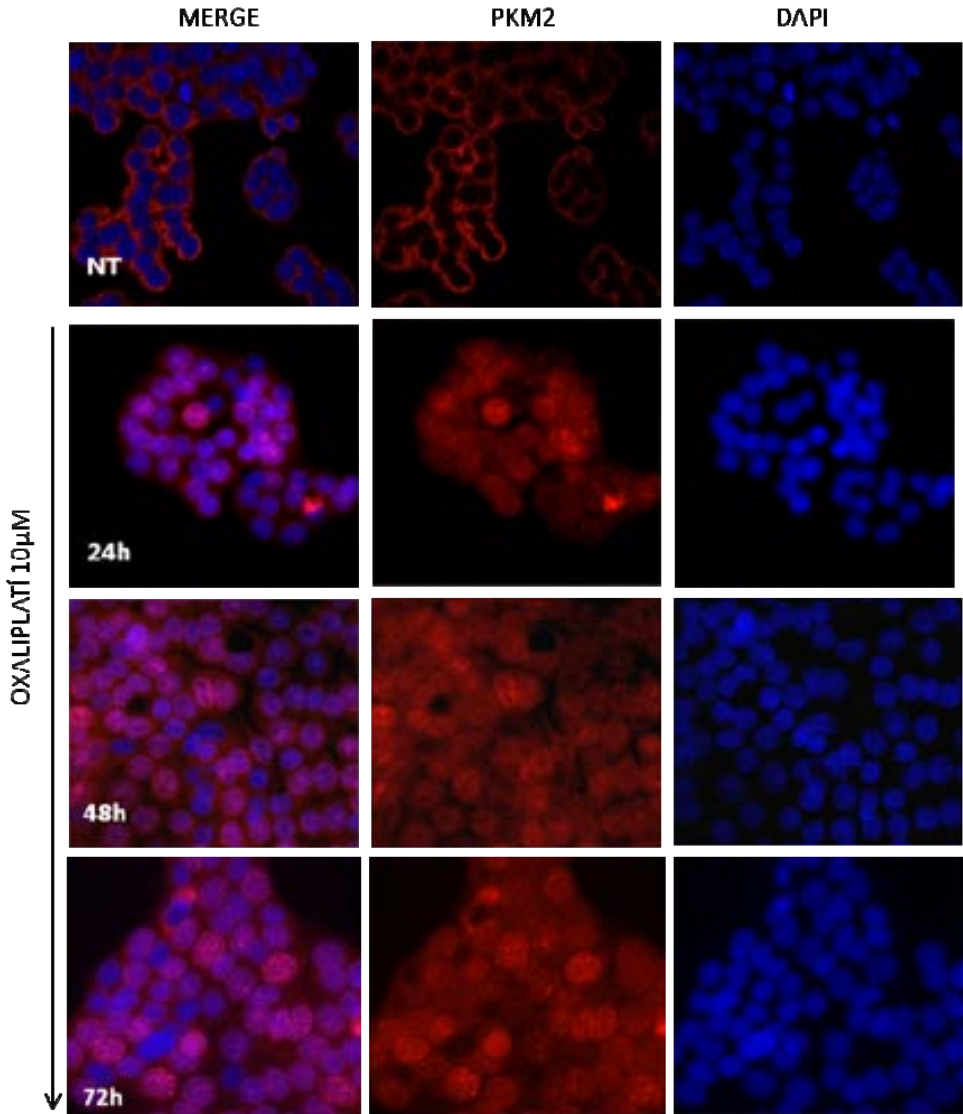


Figura 12. Localització subcel·lular de PKM2 a la línia HT29 en estat basal (NT) i exposades a oxaliplatí 10 μ M al llarg de 24, 48 i 72 hores. Imatges esquerra (*Merge*): superposició dels dos canals en el que s'observen els nuclis i la distribució sub-cel·lular de PKM2. Centre (vermell): tinció de PKM2 amb anticòs anti-conill Alexa-568. Dreta (blau): imatge dels nuclis tenyits amb DAPI. Objectiu 40x oli d'immersió.

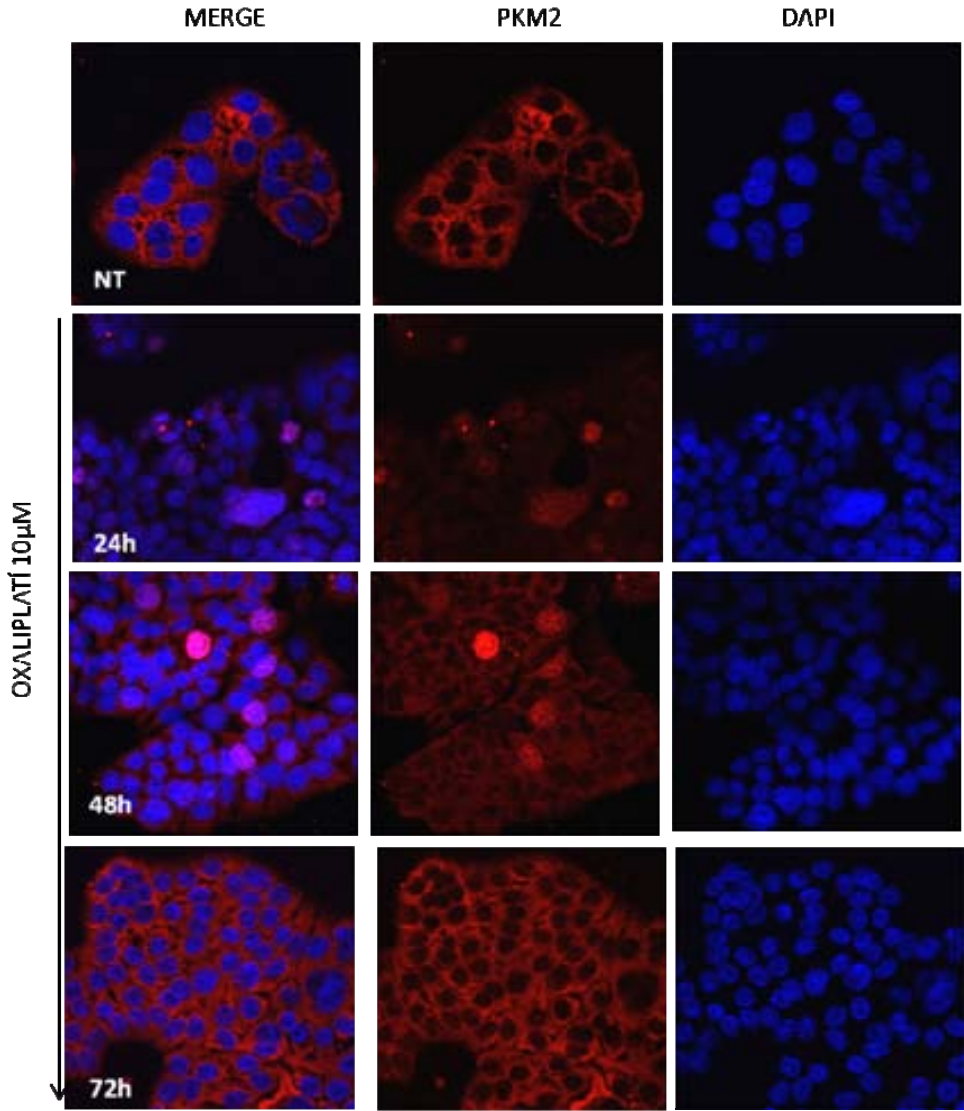


Figura 13. Localització subcel·lular de PKM2 a la línia HTOXAR3 en estat basal (NT) i exposades a oxaliplatí 10 μM al llarg de 24, 48 i 72 hores. Imatges esquerra (*Merge*): superposició dels dos canals en el que s'observen els nuclis i la distribució sub-cel·lular de PKM2. Centre (vermell): tinció de PKM2 amb anticòs anti-coniill Alexa-568. Dreta (blau): imatge dels nuclis tenyits amb DAPI. Objectiu 40x oli d'immersió.

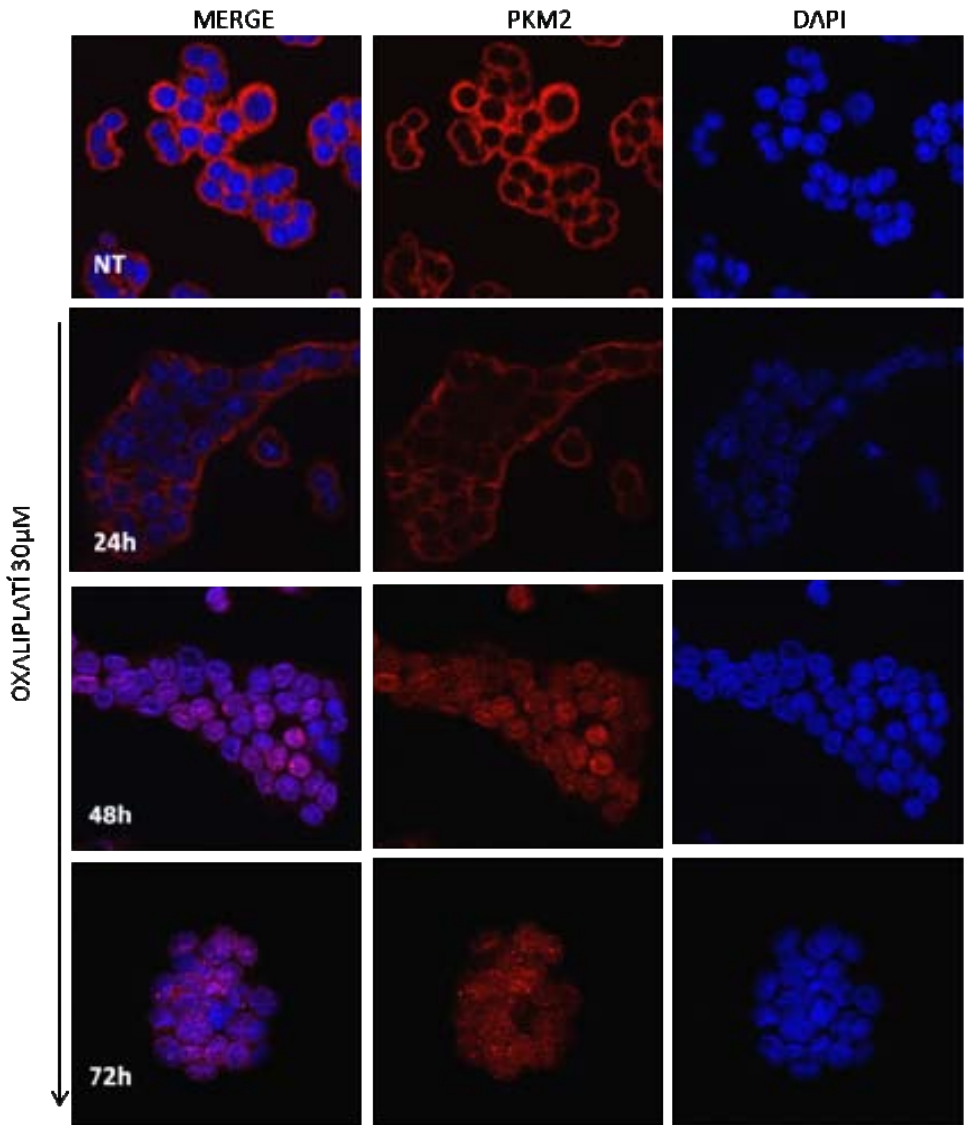


Figura 14. Localització subcel·lular de PKM2 a la línia HT29 en estat basal (NT) i exposades a oxaliplatí 30 µM al llarg de 24, 48 i 72 hores. Imatges esquerra (*Merge*): superposició dels dos canals en el que s'observen els nuclis i la distribució sub-cel·lular de PKM2. Centre (vermell): tinció de PKM2 amb anticòs anti-conill Alexa-568. Dreta (blau): imatge dels nuclis tenyits amb DAPI. Objectiu 40x oli d'immersió.

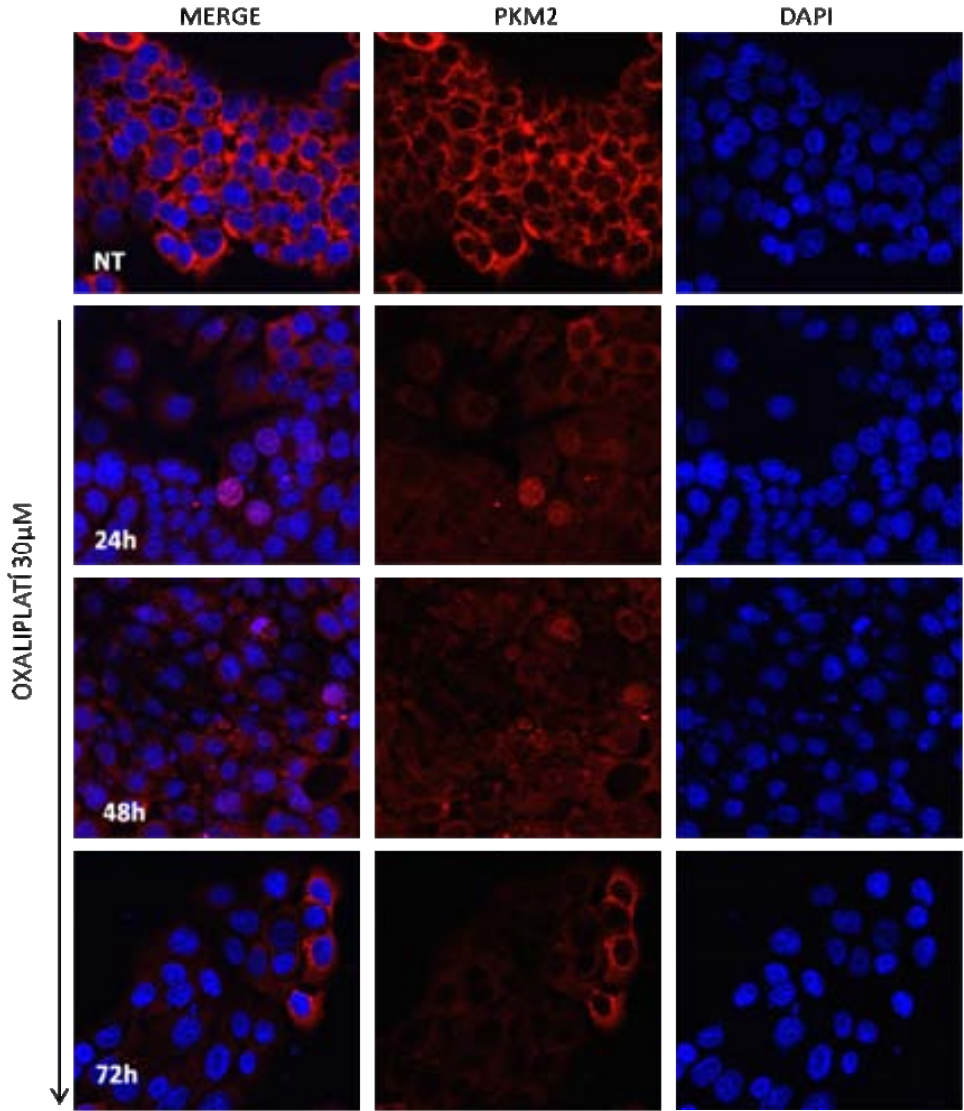


Figura 15. Localització subcel·lular de PKM2 a la línia HTOXAR3 en estat basal (NT) i exposades a oxaliplatí 30 μ M al llarg de 24, 48 i 72 hores. Imatges esquerra (*Merge*): superposició dels dos canals en el que s'observen els nuclis i la distribució sub-cel·lular de PKM2. Centre (vermell): tinció de PKM2 amb anticòs anti-conill Alexa-568. Dreta (blau): imatge dels nuclis tenyits amb DAPI. Objectiu 40x oli d'immersió.

Al mateix temps es va determinar quin percentatge de cèl·lules presentava PKM2 al seu nucli. De tots els camps dels que es va obtenir imatge es va quantificar el nombre total de cèl·lules i el de cèl·lules que mostraven translocació de PKM2 (nuclis color violeta de les imatges superposades, ò *Merge*) i es van calcular els percentatges corresponents. Com es mostra als gràfics de la figura 16, la translocació de PKM2 al nucli de les cèl·lules HT29 és significativament superior que a les cèl·lules HTOXAR3 al llarg de tots els temps de tractament i dosis administrades.

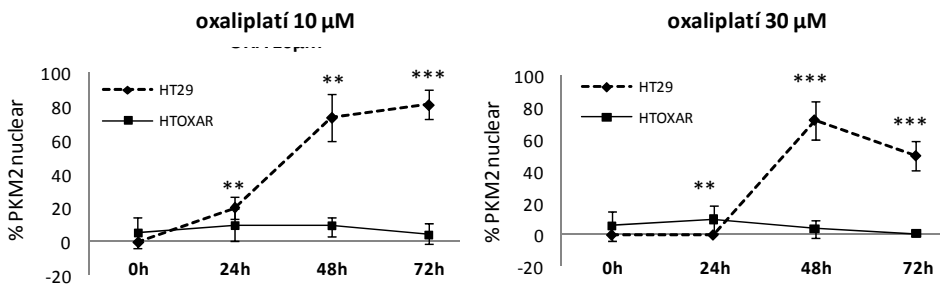


Figura 16. Quantificació del percentatge de cèl·lules que van mostrar localització de PKM2 al nucli en les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 a les dosis 10 i 30 µM durant 0 (no tractament), 24, 48 i 72 h d'exposició a oxaliplatí. Més de 9 camps aleatoris diferents per a cada condició varen ser quantificats. Les barres en el gràfic mostren ± la desviació estàndard. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Durant la visualització per microscòpia també es van observar altres estructures tant en cèl·lules exposades a oxaliplatí com en cèl·lules que no havien rebut tractament, com és el cas de les cèl·lules HTOXAR3. Si bé no vàrem saber identificar amb certesa de quines estructures es tracta, hem cregut oportú mostrar-les i comentar-les.

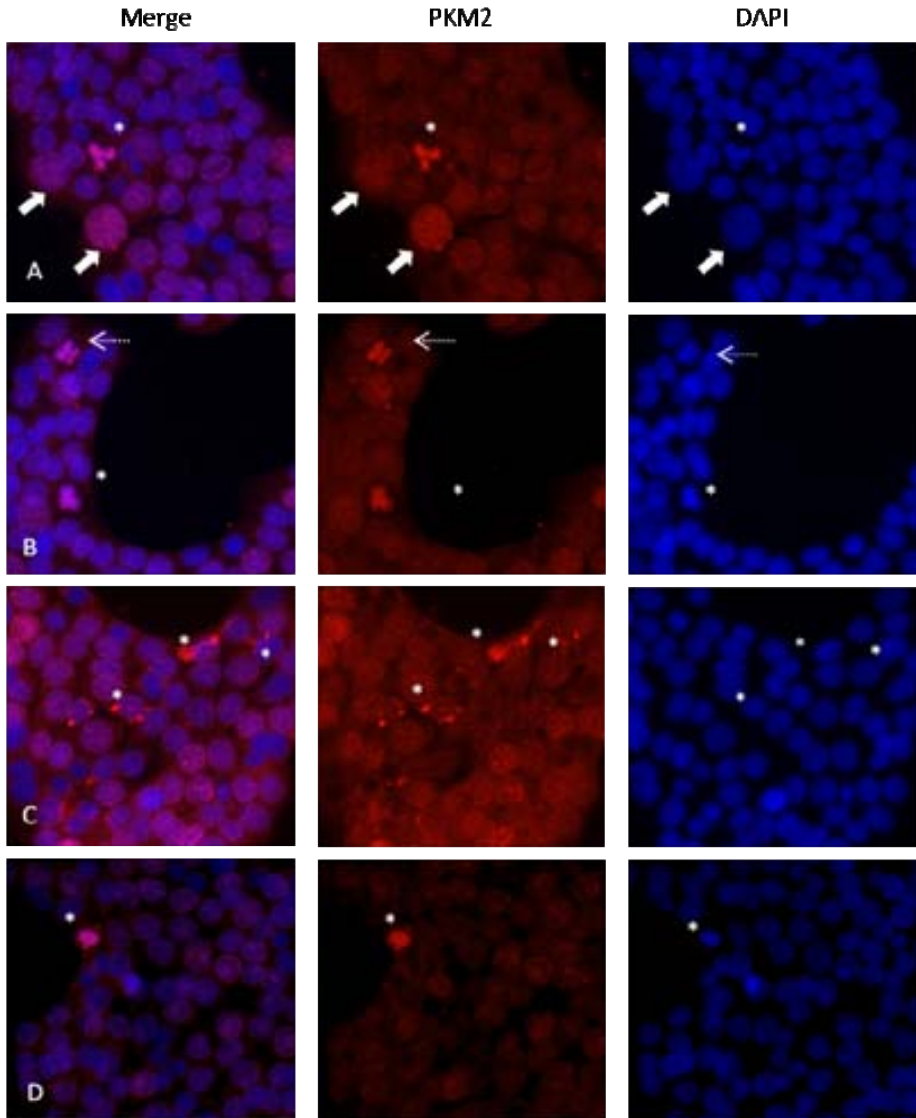


Figura 17. Diferents estructures cel·lulars formades a les cèl·lules HT29 com a resposta a diferents dosis d'oxaliplatí al llarg de 72 hores d'exposició a aquest. A: *: metafase multipolar. Fletxes: Cèl·lules que han duplicat el tamany nuclear. B: *: aberració cromosòmica. Flexa: cèl·lula en possible metafase o telofase del cicle cel·lular. C: acumulació de PKM2 en vacuoles. D: PKM2 associada a cromatina condensada. Objectiu 40x oli d'immersió.

Tant les cèl·lules HT29 com HTOXAR3 mostraren PKM2 associada a cromatina en situacions a on sembla que la cèl·lula es troba en alguna fase mitòtica del cicle cel·lular, sobretot en metafase i anafase, a on els cromosomes es troben posicionats al centre de la cèl·lula i comencen a dividir-se per donar la mateixa dotació cromosòmica a les dues cèl·lules germanes. Un altre fenomen que es va poder observar és el significatiu increment del tamany cel·lular i dels seus nuclis, possiblement donat per la fusió de diversos nuclis. Aquestes cèl·lules, conegudes com a poliploïdes, es van observar amb més freqüència a la línia HTOXAR3.

A les cèl·lules HT29 es va observar PKM2 associada a cromatina en diverses aberracions formades durant la segregació cromosòmica (figura 17 A i B) amb relativa freqüència. Aquestes estructures també són conegudes com a metafases multipolars. Tots aquests fets ens porten a pensar en la catàstrofe mitòtica com una altra via de mort cel·lular en la que l'oxaliplatí podria participar. D'altra banda, també cal assenyalar la visualització puntejada de PKM2 al nucli, suggerint acumulacions de la proteïna pel nucleoplasma quan la cromatina es troba descondensada. Un darrer efecte observat va ser l'acumulació de PKM2 en vacuoles que bé podrien ser vacuoles intracel·lulars o significar que PKM2 forma part d'exosomes que es secreten al medi extracel·lular.

Pel que fa a HTOXAR3 (figura 18), la principal característica observada va ser que PKM2 es troba molt dispersa pel citoplasma cel·lular i la presència de cèl·lules amb moltes vacuoles. Una alta proporció d'elles semblaven haver perdut el nucli o bé tractar-se de cèl·lules amb una gran vacuola que ocupa tot el citoplasma de la cèl·lula resistent. Finalment, cal destacar que malgrat haver incrementat lleugerament la intensitat de PKM2 per a la seva millor observació al microscopi, PKM2 es troba en menor quantitat en les cèl·lules HTOXAR3, sobretot després de ser exposades a oxaliplatí, tal com hem demostrat per tècnica de qPCR.

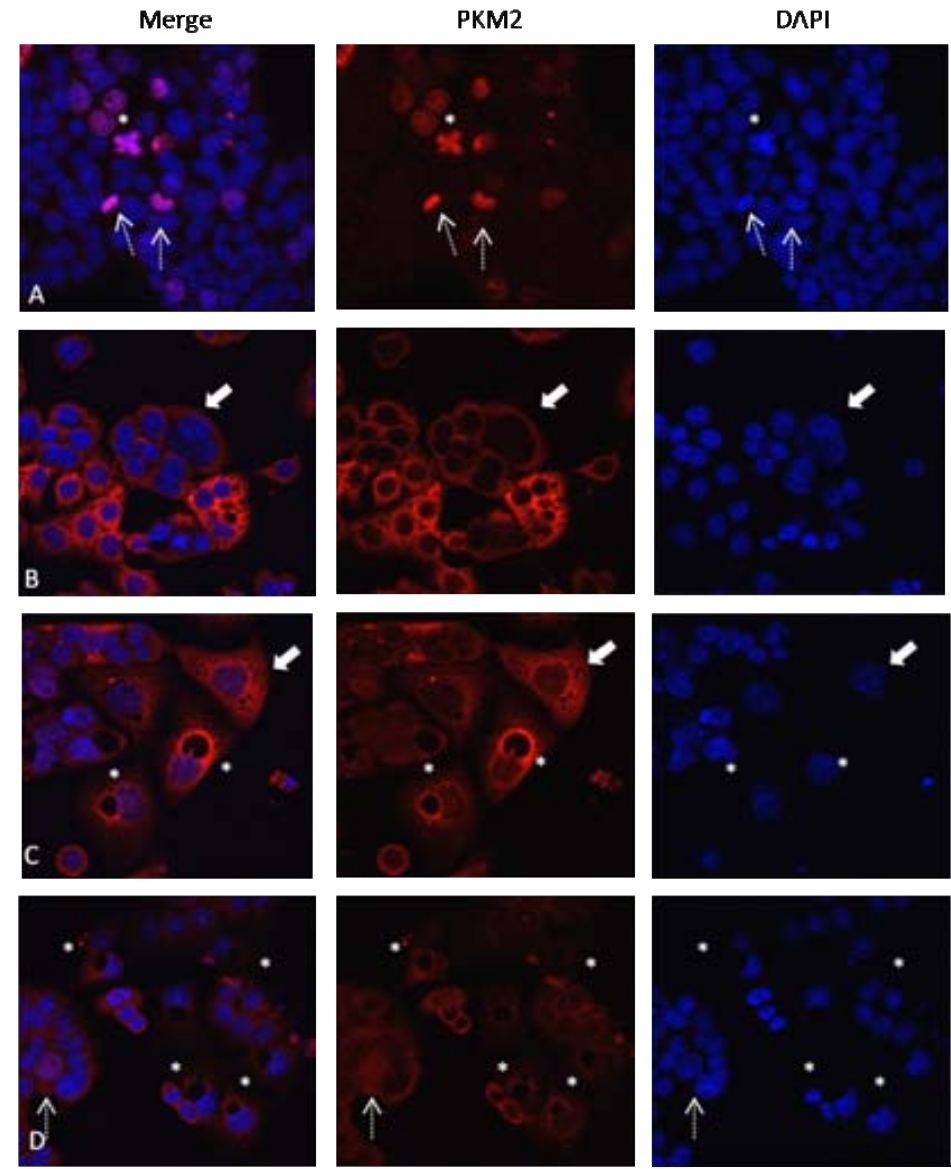


Figura 18. Diferents estructures cel·lulars formades a les cèl·lules HTOXAR3 tant en cèl·lules tractades a diferents dosis d'oxaliplatí com en cèl·lules en estat basal. A: *: aberració en la segregació cromosòmica o metafase multipolar. Fletxes: Cel·lules que han duplicat el tamany nuclear. B: Flexta: cèl·lula formada per la fusió de tres nuclis. C: Fletxa: cèl·lula amb nuclis de tamany duplicat. *: cèl·lules amb grans vacuoles o anucleades. D: Flexta: PKM2 associada a cromatina. Cèl·lula poliploide. *: cèl·lules anucleades o amb grans vacuoles. Objectiu 40x oli d'immersió.

4.4. RESULTATS OBJECTIU 4

ESTUDI DE PROTEÏNES RELACIONADES –DIRECTA O INDIRECTAMENT- AMB L'EXPRESSIÓ DE PKM2

Per a poder identificar els possibles canvis que es produeixen en el proteoma de les cèl·lules HT29 com a conseqüència del silenciament de PKM2 es van utilitzar les tècniques 2D-DIGE i seqüenciació proteica per espectrometria de masses. Amb aquest experiment es pretén identificar aquella o aquelles proteïnes l'expressió de les quals depèn de la de PKM2.

4.4.1. *Obtenció dels patrons proteics diferencials entre HT29siCNT i HT29siPKM2 per tècnica 2D-DIGE*

Abans de realitzar la electroforesi bidimensional, es va silenciar PKM2 en 4 experiments independents validant la seva inhibició mitjançant WB (figura 19A). Els extractes proteics corresponents a les condicions siCNT i siPKM2 i l'estàndard intern van ser marcats prèviament amb els fluoròfors corresponents i es van sotmetre a electroforesi bidimensional diferencial en gel per a obtenir els respectius patrons proteics segons el seu punt isoelèctric i pes molecular (apartat 3.7.2.). Els gels resultants van ser escanejats i de cada un d'ells es va obtenir la imatge per canals (Cy2, Cy3 i Cy5) i en conjunt (*Merge*) com es mostra a la figura 19B. A la imatge global de tots els canals, o *Merge*, es poden observar punts roses i verds representant aquells punts proteics diferencialment expressats entre el grup control i les cèl·lules amb PKM2 silenciada. En aquest cas, els punts roses indiquen una sobreexpressió en el grup control respecte el grup siPKM2. Pel contrari, els punts verds mostrarien una sobreexpressió en les cèl·lules amb PKM2 silenciada en referència al grup control.

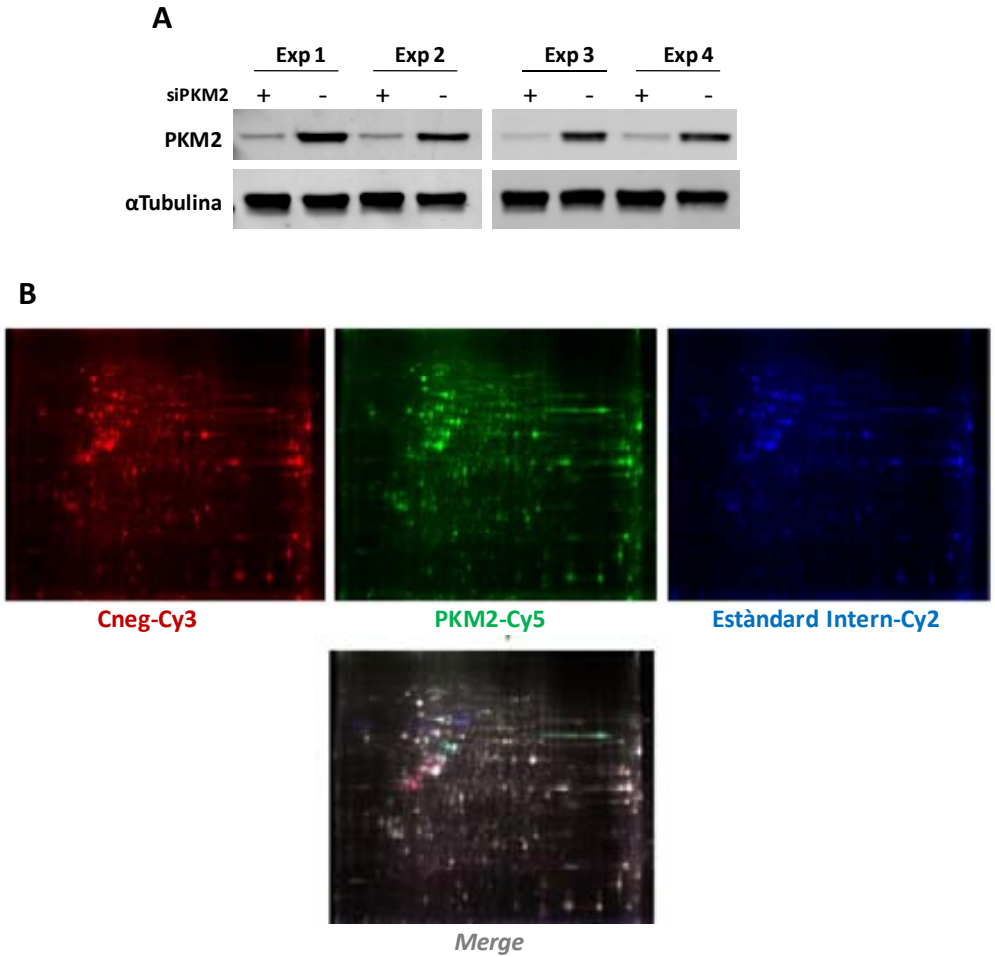


Figura 19. A. Validació prèvia del silenciament de PKM2 en els extractes proteics dels 4 experiments destinats a ser analitzat per 2D-DIGE. B. Imatges corresponents a un dels 4 gels escanejats en el que es mostra la separació per canals i la suma dels tres (*Merge*). En aquest cas Cy3 (vermell), representa al grup control negatiu (siCNT), Cy5 (verd), per a grup amb PKM2 silenciada (siPKM2) i Cy2 (blau) per a l'estàndard intern, així com la imatge global de tots els canals superposats (*Merge*).

Aquells punts proteics que mostraren diferències entre les condicions siCNT i siPKM2 es processaren tal com es detalla a l'apartat 3.7.2. i s'analitzaren estadísticament utilitzant el test ANOVA. Dels més de 200 punts proteics

diferencialment expressats, es varen escollir per a ser identificats 42 que responien als criteris de restricció de mostrar un *fold* $\pm 1,5$ amb una $p \leq 0,01$. Malgrat no complir el criteri de presentar un valor $p \leq 0,01$ es va considerar oportú seleccionar 3 punts proteics més que presentaven un *fold* $\pm 2,5$ i $p \leq 0,05$.

Les empremtes peptídiques obtingudes de cada punt proteic per les diferents tècniques (apartat 3.7.2.6.) es contrastaren amb la base de dades *Swissprot* (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>). A les taules 3, 4 i 5 es mostren els punts proteics, les identitats, els increments d'expressió així com les característiques bioquímiques de cada punt proteic identificat.

La tècnica 2D-DIGE permet la separació proteica segons el seu punt isoelèctric i la seva massa molecular. Aquesta separació permet també identificar les diferents modificacions post-traduccionals que pot expressar una mateixa molècula. És per això que, dels 45 punts proteics seleccionats es varen identificar 48 pèptids, dels quals en algunes ocasions en un mateix punt proteic es pogueren identificar 2 o més proteïnes (p.ex. el punt 731 correspon a la proteïna CCT6A però també a la fosfoglucomutasa (PGM1)) i en altres ocasions diferents punts corresponien a una mateixa proteïna (p. ex. *spots* del 1948 al 1962 corresponen a PKM2). Del total de 48 pèptids s'han pogut identificar 35 proteïnes relacionades directa o indirectament amb l'expressió proteica de PKM2. De totes elles, 33 proteïnes es trobaven menys expressades en les cèl·lules siPKM2 i únicament 2 incrementaven la seva expressió proteica com a conseqüència del silenciament d'aquesta.

RESULTATS

Punt. num.	Anova (p)	Fold C / PKM2	Identificació	SwissProt	Nom Gen	pl Teoric	pl Obsv.	Pes molec. (Da)Teoric	Ap. Pes Molec. (kDa)	Pes Molec. (kDa) Samesp.	Punt.	Pep match (%seq)	error	% inte
280	0,01	1,51	ADN mismatch repair protein Msh2	MSH2_HUMAN	MSH2	5,58	5.5-6.0	105418	>100	100	73	7 (10)	15	59,8
362	1,17E-04	1,65	Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A_HUMAN	HSP90A A1	4,94	5.5-6.0	85006	≈100		42	1 (2)	133	
425	0,006	1,88	Desmoplakin	DESP_HUMAN	DSP	6,44	≈6.8	334021	75-100		95	2 (0.6)	41,5	
432	0,001	1,90	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	RIR1_HUMA	RRM1	6,76	≈6.8	90925	75-100		72	2 (2)	71	
436	0,01	1,80	ATP-dependent ARN helicase DDX1	DDX1_HUMAN	DDX1	6,81	6.8-7.5	83349	75-100	89	38	1 (1)	199	
487	0,009	1,87	ATP-dependent ADN helicase 2 subunit 2	KU86_HUMAN	XRCC5	5,55	5.5-6.0	83222	<100	85	80	10 (19)	29	73,8
497	0,003	1,67	Junction plakoglobin	PLAK_HUMAN	JUP	5,75	5.5-6.0	82434	<100		65	12 (23)	35	20,6
518	0,003	1,85	Ezrin	EZR1_HUMAN	EZR	5,94	<6.0	69484	75-100	81	84	22 (31)	22	84
			Glycyl-tARN synthetase	SYG_HUMAN	GARS	6,61		83828			70	10 (16)	17	7,6
585	0,006	2,30	Glycyl-tARN synthetase	SYG_HUMAN	GARS	6,61	5.5-6.0	83828	>75	77	143	18 (34)	17	74,9
640	0,011	3,18	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	HSPA8	5,37	≈5.5	71082	<75	72	267	30 (49)	15	94,2
643	0,032	1,92	Transketolase	TKT_HUMAN	TKT	7,58	>7.5	68519	<75	72	150	19 (36)	11	89,2
731	0,007	2,07	T-complex protein 1 subunit zeta	TCPZ_HUMAN	CCT6A	6,23	6.0-6.4	58444	50-75	65	104	22 (49)	18	55,7
			Phosphoglucomutase-1	PGM1_HUMAN	PGM1	6,3		61696			96	11 (32)	24	12,8
768	3,84E-04	2,44	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	PKM2	7,96	7.5-8.0	58470	50-75	62	224	27 (56)	17	65,2
			T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN	CCT7	7,55		59842			120	13 (34)	21	25,7
770	2,51E-04	2,82	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	PKM2	7,96	>7.5	58470	50-75	62	231	18 (39)	13	87,2
774	2,60E-04	2,31	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	PKM2	7,96	7.5-8.0	58470	50-75	61	215	29 (65)	17	62,9

Taula 3. Característiques dels punts proteics identificats per tècniques MALDI/TOF, MALDI/TOF-TOF i ESI-LC-MS. Punt. puntuació. Obsv: observat. Ap: aparent.

RESULTATS

Punt. num.	Anova (p)	Fold C / PKM2	Identificació	SwissProt	Nom Gen	pl Teoric	pl Obsv.	Pes molec. (Da)Teoric	Ap. Pes Molec. (kDa)	Pes Molec. (kDa) Sames p.	Punt.	Pep match (%seq)	error	% inte
775	0,018	1,88	T-complex protein 1 subunit epsilon	TCPE_HUMAN	CCT5	5,45	>5.5	60089	>50	61	128	17 (39)	15	68,5
777	0,002	2,16	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	PKM2	7,96	7.5-8.0	58470	50-75		77	10 (20)	45	39,7
779	0,001	3,38	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	PKM2	7,96	>7.5	58470	50-75	61	246	30 (56)	11	79,6
			T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN	CCT7	7,55		59842			253	7 (11)	96	
783	0,008	2,07	Tyrosyl-tARN synthetase, cytoplasmic	SYYC_HUMAN	YARS	6,61	6.4-6.8	59448	50-75		261	6 (10)	101	
784	8,02E-04	1,87	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	PKM2	7,96	>7.5	58470	50-75	61	207	30 (61)	12	63,4
			T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN	CCT7	7,55		59842			173	21 (47)	15	25,7
790	0,034	5,14	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_HUMAN	HSPD1	5,7	4.7-5.4	61187	50-75	61	224	32 (63)	23	84,8
815	0,001	-1,53	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_HUMAN	PDIA3	5,98	5.5-6.0	57146	50-75	58	266	37 (57)	15	91,1
858	0,016	2,30	FK506-binding protein 4	FKBP4_HUMAN	FKBP4	5,35	≈5.5	52057	≈50	55	144	14 (40)	13	76,3
979	0,018	2,04	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	6PGD_HUMAN	PGD	6,8	6.8-7.5	53619	<50	48	142	15 (38)	17	76,7
1077	0,043	1,88	Citrate synthase, mitochondrial	CISY_HUMAN	CS	8,45	>7.5	51908	37-50	44	105	10 (20)	15	73,2
1313	0,035	1,98	Aldo-keto reductase family 1 member B10	AK1BA_HUMAN	AKR1B10	7,12	≈7.5	36226	25-37	35	166	20 (68)	21	48,8
			Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	ARK73_HUMAN	AKR7A3	6,67		37582			97	7 (29)	30	13,1
1412	0,008	1,94	Annexin A5	ANXA5_HUMAN	ANXA5	4,94	4.6-5.5	35971	25-37	138	17 (61)	28	82,8	
1553	0,03	2,24	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN_HUMAN	RAN	7,01	6.4-6.8	24579	≈25	26	57	6 (36)	28	12,8
1577	0,027	2,14	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMAN	PGAM1	6,67	≈6.4	28900	≈25	25	143	8 (52)	39	98,5

Taula 4. Característiques dels punts proteics identificats per tècniques MALDI/TOF, MALDI/TOF-TOF i ESI-LC-MS. Punt. puntuació. Obsv: observat. Ap: aparent.

RESULTATS

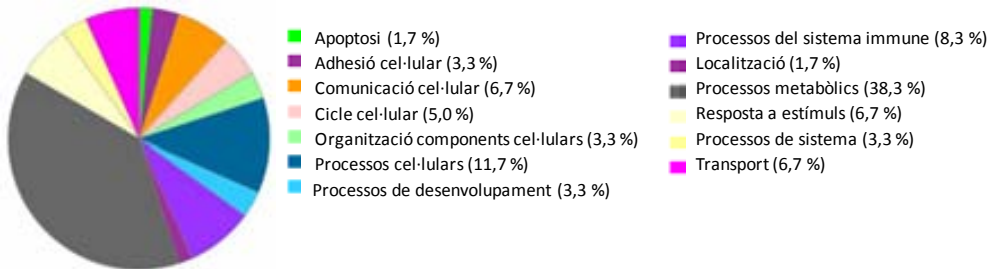
Punt. num.	Anova (p)	Fold C / PKM2	Identificació	SwissProt	Nom Gen	pl Teoric	pl Obsv.	Pes molec. (Da)Teoric	Ap. Pes Molec. (kDa)	Pes Molec. (kDa) Samesp.	Punt.	Pep match (%seq)	error	% inte
1948	1,11E-04	5,50	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	PKM2	7,96	>7.5	58470	50-75	61	301	39 (66)	15	88,9
1949	5,67E-06	3,61					>7.5			141	13 (27)	35	35,2	
1952	2,16E-04	2,27					≈8.0			55	1 (2.4)	86,86		
1961	7,25E-04	2,74					≈8.0			61	405	46 (77)	21	92,9
1962	7,50E-04	2,50					≈8.0			261	28 (59)	26	84,5	
1999	0,002	2,20				8,96	>7.5			92	11 (31)	35	26,4	
2025	0,006	1,53	Heat shock protein 105 kDa	HS105_HUMAN	HSPH1	5,28	≈5.5	97716	100-150		167	27 (44)	19	67,4
2027	0,004	1,71					<5.5			164	29 (41)	23	68,4	
2055	0,011	1,93	Annexin A2	ANXA2_HUMAN	ANXA2	7,57	≈7.5	38808	<37		274	28 (71)	14	82,2
2066	0,016	1,97	Ezrin	EZRI_HUMAN	EZR	5,94	≈6.0	69484	≈75	81	212	30 (50)	14	92,4
2069	0,006	2,08	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN	VCP	5,14	4.6-5.5	89950	≈100	96	78	9 (13)	25	62,9
2073	0,011	1,87	T-complex protein 1 subunit beta	TCPB_HUMAN	CCT2	6,01	≈6.0	57794	≈50	52	299	27 (59)	43	81,7
2087	0,024	2,15	Transketolase	TKT_HUMAN	TKT	7,58	>7.5	68519	<75	136	14 (29)	19	73,1	
2125	0,034	2,48	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_HUMAN	HSPD1	5,7	≈5.5	61187	50-75	234	38 (67)	23	89,1	
2127	0,004	1,54	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1_HUMAN	LASP1	6,61	6.0-6.4	30097	25-37	35	90	9 (31)	9	79,1
2157	0,032	1,80	Elongation factor 2	EF2_HUMAN	EEF2	6,41	≈6.4	96246	75-100	97	318	31 (58)	24	86,7
2160	0,007	1,57	Importin subunit beta-1	IMB1_HUMAN	KPNB1	4,68	4,68	98420	≈100	94	258	25 (39)	32	92,7
2202	0,008	-1,57	Triosephosphate isomerase	TPIS_HUMAN	TPI1	6,45	6.4-6.8	26938	≈25	75	8 (38)	41	22,7	

Taula 5. Característiques dels punts proteics identificats per tècniques MALDI/TOF, MALDI/TOF-TOF i ESI-LC-MS. Punt.: puntuació. Obsv: observat. Ap: aparent.

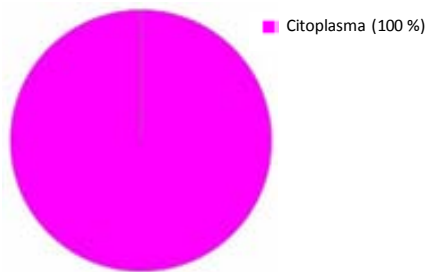
4.4.2. Estudi funcional de les proteïnes amb expressió dependent de PKM2

Un cop identificades les proteïnes relacionades amb l'expressió de PKM2, es va fer una primera recerca bibliogràfica de les funcions principals que realitzen aquestes proteïnes dins la cèl·lula a través de les pàgines www.uniprot.org i www.genecards.org. (taules 6 i 7). Les proteïnes van ser classificades segons localització cel·lular, funció biològica i classe proteica fent ús del sistema de classificació de gens i proteïnes PANTHER (156, 157). Finalment, a través de la base de dades STRING 9.0 (158). Es va poder conèixer el tipus d'interacció que existeix entre les proteïnes que han modificat la seva expressió com a conseqüència del silenciament de PKM2. El mapa d'interaccions proteiques i les diferents classificacions es mostren a les figures 20 i 21. De totes elles cal destacar que quasi bé totes les proteïnes són ATP o GTP dependents i la majoria van disminuir la seva expressió quan es va silenciar PKM2. La major proporció de proteïnes participa en processos metabòlics (38,3%) però també hi ha proteïnes que participen en altres processos biològics com la comunicació i adhesió cel·lular (3,3% i 6,7%) o el transport intracel·lular (6,7%). Totes les proteïnes pertanyen al component citoplasmàtic encara que pugin realitzar funcions a altres compartiments cel·lulars. En referència a la classe proteica, dels principals tipus representats en destaquem les chaperones (28,1%), les proteïnes del citoesquelet (12,5 %) i les proteïnes d'unió a àcids nucleics (12,5%). Aquestes darreres podrien tenir una funció en la síntesi i reparació de l'ADN en resposta a un dany genòmic com el que provoca l'oxaliplatí.

PROCESSOS BIOLÒGICS



COMPARTIMENTACIÓ CEL·LULAR



CLASSE PROTEICA

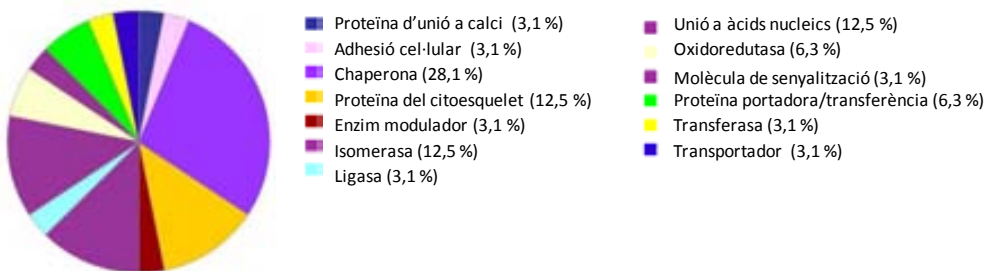


Figura 20. Gràfics de categories funcionals per a les proteïnes diferencialment expressades entre HT29-siCNT i HT29-siPKM2 mitjançant 2D-DIGE. Als tres gràfics es mostren els principals processos biològics en que participen les proteïnes alterades com a conseqüència del silenciament de PKM2 i els seus percentatges així com el compartiment cel·lular on es localitzen i la classe de proteïna i funció que realitzen.

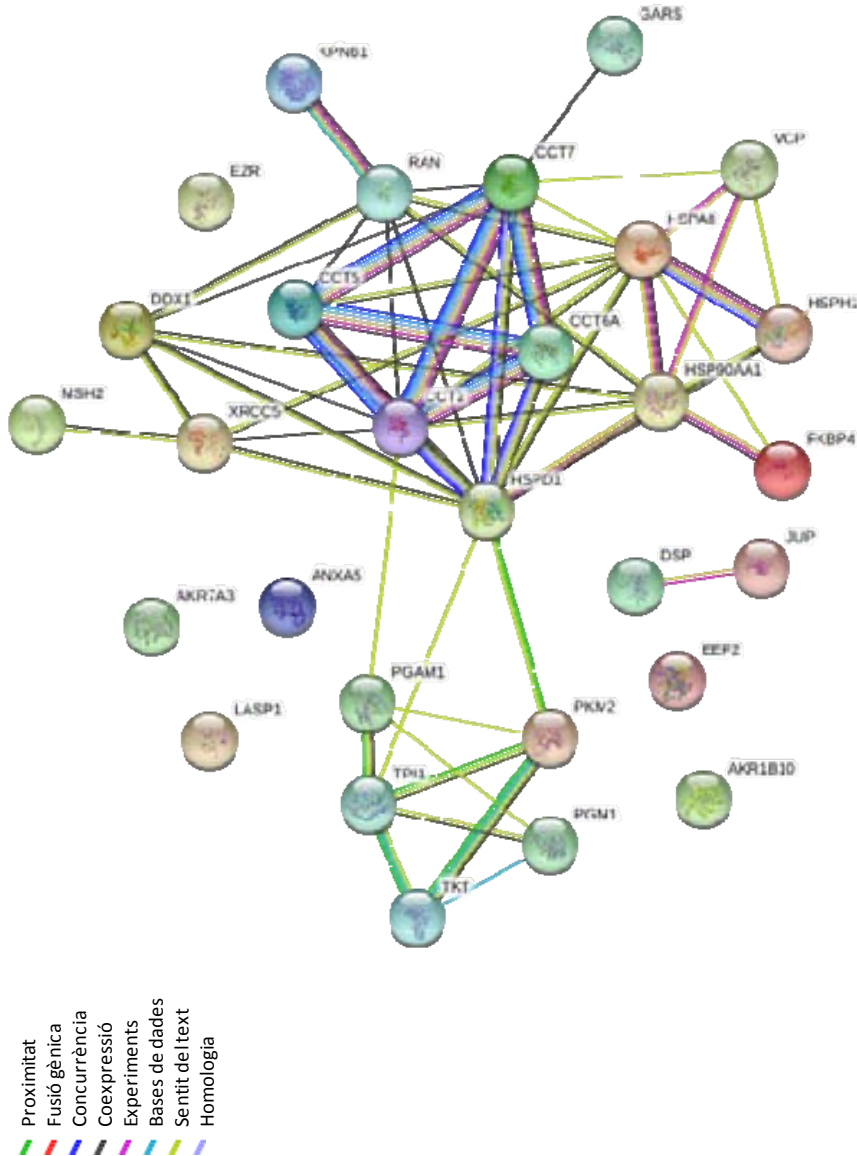


Figura 21. Xarxa d'interaccions entre PKM2 i les proteïnes que van mostrar alterada la seva expressió mitjançant proteòmica 2D-DIGE com a conseqüència del silenciament de PKM2. Cadascun dels colors representen el tipus d'evidència per a les associacions basats en proximitat proteica, fusió gènica, concurrència, coexpressió, homologia, així com evidències experimentals. Programa utilitzat: SRING v9.0 amb interval de confiança $p=0.4000$.

Nom gen	Identificació	Funció
MSH2	ADN mismatch repair protein Msh2	Detecció i reparació del dany genòmic (via MMR)
RRM1	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	Replicació ADN
XRCC5	ATP-dependent ADN helicase 2 subunit 2	Recombinació ADN, dany i reparació
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Regula la desunió del fus mitòtic finalització de mitosis. Formació de l'embolcall nuclear.
DDX1	ATP-dependent ARN helicase DDX1	Ensamblatge de l'espliceosoma. Regulador de l'inici de transcripció
GARS	Glycyl-tARN synthetase	Síntesi proteïnes. Mort cel·lular
ANXA2	Annexin A2	Regulació de la fusió de vesícules
ANXA5	Annexin A5	Apoptosi; regulació transducció senyals
RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	Divisió cel·lular; Transport proteïnes
EEF2	Elongation factor 2	Promotor GTP-depenent de la translocació de la cadena proteica nativa del A-site al P-site del ribosoma
KPNB1	Importin subunit beta-1	Importació proteïnes nuclears. S'uneix a β -importina al Complex del Porus Nuclear
YARS	Tyrosyl-tARN synthetase, cytoplasmic	Catalitza la unió de tirosina a tARN(Tyr)
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	Resposta a l'estrés cel·lular
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	Resposta a l'estrés cel·lular; interacció virus-hoste
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Plegament proteic sota condicions d'estrés
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	Reunió de ponts -S-S- en el complex TAP (peptide loading complex (PLC))
FKBP4	FK506-binding protein 4	Associació amb HSP90 i HSP70 en complexos del receptor de hormona esteroide inactius
HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	Preven l'agregat de proteïnes desnaturalitzades a on els nivells d'ATP disminueixen dràsticament. Inhibeix HSPA8/HSC70 ATPasa i activitat chaperona. Sobreexpressada en cèl·lules tumorals.

Taula 6. Funció biològica principal descrita de les proteïnes identificades.

Nom gen	Identificació	Funció
CCT2	T-complex protein 1 subunit beta	Chaperona molecular; Plegament proteic amb hidròlisi d'ATP. Plegament d'actina i tubulina
CCT7	T-complex protein 1 subunit eta	
CCT6A	T-complex protein 1 subunit zeta	
CCT5	T-complex protein 1 subunit epsilon	
DSP	Desmoplakin	Proteïna dels desmosomes. Organització dels complexos cadherina-plakoglobina i ancoratge dels filaments intermedis als desmosomes.
JUP	Junction plakoglobin	Proteïna de la placa junccional. Present en desmosomes i unions intermèdies. Regulació de la via Wnt.
EZR	Ezrin	Participa en les connexions de les estructures majors del citoesquelet associat a la membrana plasmàtica
LASP1	LIM and SH3 domain protein 1	Interactua amb actina F. Regulació de les activitats del citoesquelet d'actina
PGM1	Phosphoglucomutase-1	Trencament i síntesis de glucosa
AKR1B10	Aldo-keto reductase family 1 member B10	Detoxificació d'esteroides; processos metabòlics
PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Metabolisme de glucosa
TKT	Transketolase	Metabolisme de la via de les pentoses fosfat
PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Metabolisme de les pentoses fosfat
CS	Citrate synthase, mitochondrial	Cicle krebs (TCA); metabolisme dels carbohidrats
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	Vies glicolítica i de pentoses fosfat
TPI1	Triosephosphate isomerase	Síntesi d'àcids grassos, gluconeogènesis, glicòlisi i canvi a via de pentoses fosfat
AKR7A3	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	Protecció del fetge davant els efectes tòxics i carcinogènics de l'aflatoxina 1 AFB1

Taula 7. Funció biològica principal descrita de les proteïnes identificades.

4.4.3. Validació de les proteïnes alterades com a conseqüència del silenciament de PKM2

Un cop identificades i classificades, es va decidir validar mitjançant tècnica de Western Blot les proteïnes HSP60, HSC70, Ezrina, Plakoglobina, Ran, Importina B1, HSP90AA i FKBP4. La chaperona HSP60 havia sigut identificada en la proteòmica comparativa d'estudi de resistència a oxaliplatí (apartat 4.1.1.) i és per aquest motiu inicial que va ser candidata a validar, ja que podria establir una relació entre la resposta i la resistència adquirida a oxaliplatí. HSP90AA1 i FKBP4 són proteïnes amb funcions relacionades al càncer i a l'estrès cel·lular i es va considerar interessant poder-les estudiar. D'altra banda Ezrina i Plakoglobina són proteïnes involucrades en l'adhesió cel·lular podent participar en processos de transició epiteli-mesènquima. Finalment, Importina B1 i Ran son importants en el tràfic molecular cap al nucli. Vàrem afegir les línies HT29 i HTOXAR3 paral·lelament per tal de conèixer si existeix algun tipus de relació també en les cèl·lules amb resistència adquirida. Al menys es van realitzar 3 experiments independents en cada cas. La quantificació de cada proteïna es va relativitzar als nivells d'actina respectius (control intern). El ràtio d'expressió es va obtenir a partir de la relació: valor d'expressió siCNT dividit pel valor d'expressió en siPKM2 i valor d'expressió HT29 respecte del valor d'expressió HTOXAR3. En conseqüència, un valor igual a 1 indica que no hi ha diferències entre condicions, mentre que valors superiors a 1 indiquen menys expressió en les cèl·lules amb PKM2 silenciada i en les cèl·lules resistents.

Com es mostra a les figures 22 i 23, en la majoria de les proteïnes escollides es validà una menor expressió en les cèl·lules amb PKM2 silenciada (valors>1) , però la diferència era menor si es comparava amb els resultats del 2D-DIGE.

Diferències d'expressió tan petites són difícils d'observar per Western Blot. Malgrat tot, la visualització de les bandes corresponents va ser possible i per tant la quantificació relativa de cadascuna també.

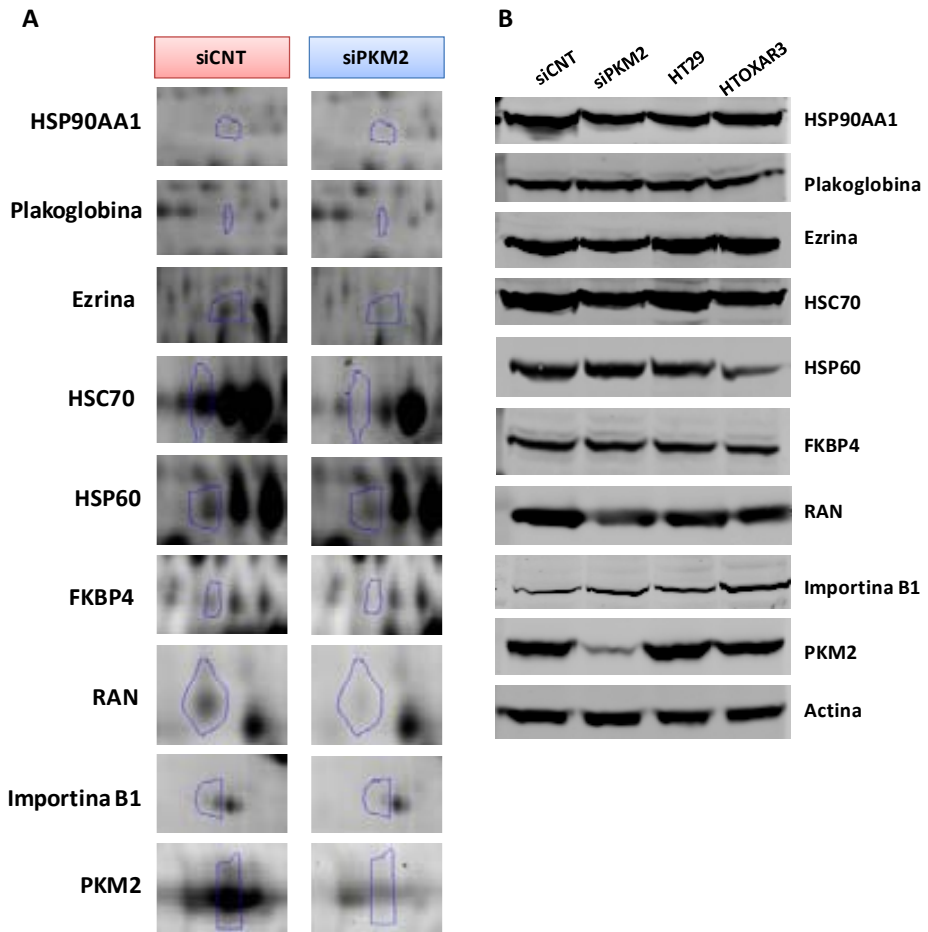
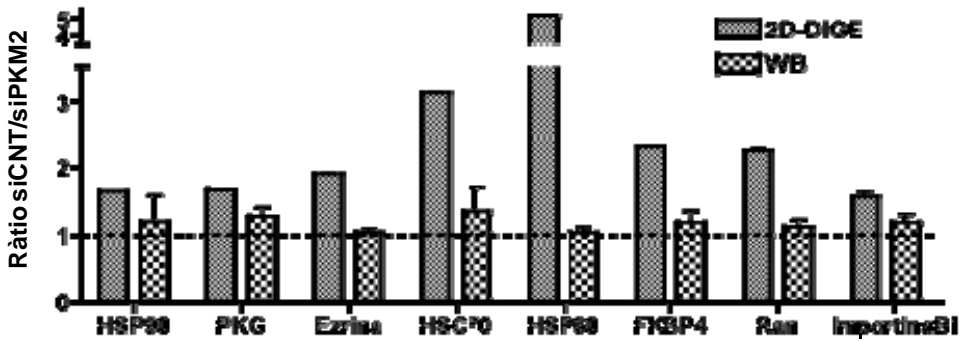


Figura 22. Imatges de les proteïnes diferencialment expressades obtingudes a partir de 2D-DIGE i WB. A: imatge dels punts proteics obtinguts per 2D-DIGE en les cèl·lules HT29-CNT i HT29-siPKM2. B: imatges corresponents a la identificació de dites proteïnes mitjançant anticossos específics per WB a les cèl·lules HT29-CNT i HT29-siPKM2 i també a les cèl·lules HT29 i HTOXAR3. Com a control intern de Western Blot es va utilitzar Actina.



Proteïna	2D-DIGE <i>fold</i>		Western Blot <i>fold</i> siCNT/siPKM2		Western Blot <i>fold</i> HT29/HTOXAR3	
	Promig	SD	Promig	SD	Promig	SD
HSP90AA1	1,65	1,17E-04	1,2	0,39	1,02	0,09
Plakoglobina	1,67	0,003	1,28	0,13	1,02	0,12
Ezrina	1,9	0,003	1,05	0,05	1,26	0,14
Hsc70	3,12	0,011	1,35	0,36	1,48	0,35
Hsp60	5,14	0,034	1,04	0,08	2,49	0,62
FKBP4	2,3	0,016	1,19	0,17	1,71	0,19
Ran	2,24	0,03	1,13	0,1	1,01	0,13
Importina B1	1,57	0,007	1,19	0,12	0,35	0,06
PKM2	5,5	7,50E-04	6,95	0,6	1,92	0,14

Figura 23. Gràfic i taula representatius dels valors *fold* CNT vs siPKM2 obtinguts per 2D-DIGE, la validació mitjançant Western Blot i la comparació entre les línies HT29 i HTOXAR3. Valors de les mitges i les desviacions estàndards (representada com a barres al gràfic i com SD a la taula) corresponents a un mínim de 3 experiments independents. PKG: Plakoglobina. HSP90: HSP90AA1.

Les proteïnes Ezrina i HSP60 no van mostrar diferències d'expressió entre les cèl·lules siCNT i siPKM2. En canvi, les proteïnes Ran, Importina B1, HSP90AA, Plakoglobina, HSC70 i FKBP4, encara que amb resultats de ràtio inferiors, als

obtinguts per 2D-DIGE, i no significatius estadísticament, sí van mostrar un petit decrement d'expressió al silenciar PKM2. Val la pena destacar les proteïnes FKBP4 i HSC70. FKBP4, malgrat no mostrar una disminució significativa de la seva expressió al silenciar PKM2 (siCNT: $0,714 \pm 0,55$ vs siPKM2: $0,156 \pm 0,39$; $p=0,068$), sí ho va fer a les cèl·lules resistents a oxaliplatí (HT29: $0,692 \pm 0,37$ vs HTOXAR3: $0,407 \pm 0,20$; $p=0,018$). La chaperona HSC70 es va trobar menys representada tant a les cèl·lules sense PKM2 (siCNT: $1,907 \pm 1,21$ vs siPKM2: $1,363 \pm 0,58$; $p=0,028$) com en les cèl·lules HTOXAR3 (HT29: $2,20 \pm 0,78$ vs HTOXAR3: $1,568 \pm 0,62$; $p=0,028$), indicant una possible relació amb PKM2 i el procés d'adquisició de resistència a OXA (figura 24).

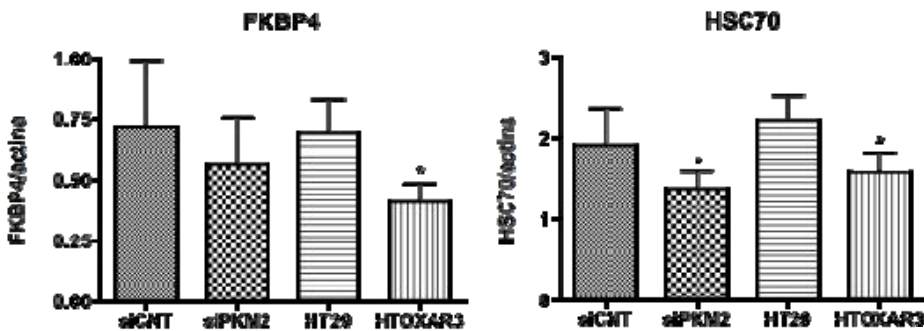


Figura 24. Expressió relativa de les proteïnes FKBP4 i HSC70. Els gràfics representen els valors mitjos i desviació estàndard de l'expressió de FKBP4 i HSC70 en les cèl·lules HT29siCNT (siCNT), HT29siPKM2 (siPKM2), HT29 i HTOXAR3. Tots els valors es van referenciar al control intern Actina. Un mínim de 3 experiments independents van ser realitzats. *: valor $p < 0.05$.

Tanmateix, es confirma de nou el silenciament de PKM2 en les cèl·lules HT29 i la baixa expressió de PKM2 a les cèl·lules HTOXAR3 en comparació amb l'expressió obtinguda a les cèl·lules siCNT i HT29 (figures 22 i 23).

4.5. RESULTATS OBJECTIU 5

ESTUDI DEL VALOR PREDICTIU DE RESPOSTA DE PKM2 EN PACIENTS DE CCR AVANÇAT

Per tal de poder traslladar els resultats obtinguts *in vitro* a l'entorn clínic, es van estudiar els nivells d'ARNm de PKM2 en 41 peces de teixit tumoral de pacients amb càncer colorectal avançat que havien estat tractats o estaven rebent quimioteràpia amb 5FU i oxaliplatí en primera línia de tractament (esquema FOLFOX del grup espanyol per al tractament de tumors digestius, TTD). Les dades dels pacients es troben resumides a la taula 8. El 76,2% dels casos presentà localització en el còlon; el valor *Karnofsky* va ser superior a 80 en tots els casos i superior a 100 en un 42,9% d'ells. Les medianes per al temps a la progressió i la supervivència global foren de 8,31 i 22,14 mesos respectivament. Un 66,7% dels pacients va respondre al tractament.

Com s'ha mostrat en resultats anteriors (veure apartat 4.1.3.), es va trobar una correlació entre els nivells d'ARNm i de proteïna de PKM2 a les línies cel·lulars. Tenint en compte a més, que la tinció per immunohistoquímica de PKM2 va resultar molt intensa i inadequada per a comparar entre diferents casos, es va escollir la quantificació d'ARNm de PKM2 per qPCR per dur a terme l'estudi. Els resultats d'expressió es van dividir en quartils. PKM2 es va detectar a tots els tumors, amb valors d'expressió relatius al control intern β -actina en un rang entre 0,25 i 2,09, amb una mediana de 0,67. No es van observar diferències significatives entre els nivells d'ARNm de PKM2 i les característiques clíniques. En canvi, sí es va observar que els pacients en el quartil inferior corresponent als

nivells més baixos d'ARNm de PKM2 (PKM2 < 0.49) varen tenir taxes de resposta significativament inferiors com es mostra a la taula següent:

	Expressió ARNm de PKM2		P
	<0,49	>0,49	
Estat, mediana (rang)	59,5 (55-74)	67 (46-81)	
Localització tumor			
Còlon	6 (60%)	22 (71%)	0,2*
Recte	4 (40%)	9 (29%)	
Sexe			
Home	6 (60%)	17 (55%)	1†
Dona	4 (40%)	14 (45%)	
QT adjuvant prèvia			
5FU	3 (30%)	9 (29%)	1†
No	7 (70%)	22 (71%)	
Localització metàstasi			
Fetge	7 (70%)	19 (61%)	0,85*
Pulmó	1 (10%)	3 (10%)	
Altres	2 (20%)	9 (29%)	
Resposta Global			
Resposta (RC+RP)	2 (20%)	20 (65%)	0,026*
No resposta (ME+ PM)	8 (80%)	11 (35%)	

Taula 8. Relació entre els nivells de PKM2 i les característiques clíniques dels pacients i la resposta al tractament. Abreviacions: P: p valor associat a *: Test F Fisher i † Test Chi Quadrat ; QT: quimioteràpia; RC: resposta completa; RP: resposta parcial; ME: Malaltia Estable; PM: Progrés de Malaltia.

Per validar aquests resultats, es van analitzar, a més, tres marcadors tumorals àmpliament estudiats i utilitzats en el diagnòstic de tumors en el departament d’anatomia patològica de l’Hospital Germans Trias i Pujol com són la proteïna p53, punt clau en el progrés del cicle cel·lular i l’activació de les vies de mort cel·lular, Bcl-2, coneguda per la seva funció anti-apoptòtica, i Ki67, que és un marcador estricte de proliferació cel·lular. Es va realitzar un *tissue microarray* en el que es van estudiar per immunohistoquímica aquests tres marcadors en les peces tumorals i es va estudiar la possible correlació tant amb els nivells d’expressió de PKM2 com amb la resposta a la quimioteràpia (taula 9).

PKM2	Bcl-2			p53			Ki-67		
	Present	Absent	P	<25%	>25%	P	<50%	>50%	P
<0,49	4 (40%)	6 (60%)	1*	1 (10%)	9 (90%)	0,032*	1 (10%)	9 (90%)	1*
>0,49	13 (42%)	18 (58%)		15 (50%)	15 (50%)		4 (13%)	27 (87%)	
RG									
R	8 (47%)	14 (58%)	0,54*	10 (62,5%)	12 (50%)	0,54†	4 (80%)	18 (50%)	0,35†
NR	9 (53%)	10 (42%)		6 (37,5%)	12 (50%)		1 (20%)	18 (50%)	

Taula 9. Associació dels nivells d’ARNm de PKM2 amb els nivells de tinció per immunohistoquímica de p53, Bcl-2 i Ki67 i la resposta a quimioteràpia. Abreviacions: RG: resposta global; R: resposta; NR: no resposta; *: p-valor associat a Test Fisher; †: p-valor associat a Test χ^2 .

Com es mostra a la taula superior, no es va trobar cap associació estadística entre nivells d’aquests marcadors i les característiques clíniques. Tampoc no es va observar correlació entre els nivells d’expressió de PKM2 i Bcl-2 ó Ki67. En canvi, els nivells d’ARNm de PKM2 es van associar amb mutacions amb p53 donat que el 90% dels tumors amb valors de PKM2 < 0,49 sobreexpressaven p53 (>25% de cèl·lules positives), mentre que en la resta de tumors, el percentatge

de cèl·lules que mostraven positivitat per p53 només va arribar al 50% ($P=0.032$). Dels pacients amb baixa expressió de PKM2 i alta p53, únicament va respondre el 16.67% d'ells (2/9) mentre que un 66.7% (10/15) de pacients que presentaven alta PKM2 i baixa p53 van respondre a la quimioteràpia basada en oxaliplatí.

Finalment es va establir un model de regressió logística en el que es van incloure com a co-variables els valors d'expressió de p53, Bcl-2, Ki67 i PKM2 per avaluar si aquests marcadors podien tenir algun efecte en la resposta a quimioteràpia.

Marcador	RG (95% IC)	P
PKM2 >0.49	11.09 (1.6-76.72)	0.015
P53 < 50%	1.65 (0.34-7.99)	0.53
Ki67 < 50%	0.2 (0.013-3.23)	0.26
Bcl-2 negatiu	0.52 (0.12-2.22)	0.38

Taula 10. Model de regressió logística per a resposta a quimioteràpia per als marcadors PKM2, p53, Bcl-2 i Ki67. Abreviacions: RG: resposta global; IC: interval de confiança 95%.

Com es mostra a la taula superior, presentar baixos nivells d'ARNm de PKM2 va resultar l'únic factor de risc independent associat a la no resposta al tractament amb un risc relatiu (*odds ratio*) associat de 11,9, un valor p igual a 0,015 i un interval de confiança al 95% de entre 1,6 i 76,73.

5. DISCUSSIÓ

Malgrat tots els avenços en la tecnologia i la medicina per poder assolir tractaments oncològics cada cops més personalitzats i esperances de vida més llargues, l'adquisició de resistència a la quimioteràpia continua sent un dels principals obstacles del seu èxit. Com s'ha mencionat en diverses ocasions al llarg d'aquesta tesi, la resistència no parteix d'un únic factor determinant de sensibilitat o resistència, si no que són molt diversos els elements i els mecanismes que hi participen, de manera que és important conèixe'ls i entendre'ls per poder combatre'ls.

Encara que les darreres tendències de tractament del càncer estan enfocades principalment cap al desenvolupament de molècules anti-diana, l'administració d'oxaliplatí continua essent clau i essencial en el tractament en el CCR avançat. Tot i així, encara queda molt per conèixer sobre les molècules a les que es pot unir i/o alterar i sobre la seva acció citotòxica i citostàtica.

En aquest treball, mitjançant l'ús de tècniques de proteòmica comparativa en 2D hem demostrat que els patrons proteics pateixen canvis durant el procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí. En un model *in vitro* desenvolupat al nostre laboratori, l'expressió de cinc proteïnes va resultar alterada al menys 4 vegades entre la línia sensible HT29 i la seva derivada resistent HTOXAR3: HSP70, PKM2, Enolasa 1, HSP60 i hnRNP C1. Mitjançant tècniques més específiques es van poder validar HSP60 i PKM2. HSP60 va mostrar canvis a nivell proteic mitjançant WB però no va mostrar cap alteració en l'expressió d'ARNm, fet que indica que els canvis proteics observats són únicament a nivell traduccional. HSP60 és una chaperona mitocondrial amb funcions pro-apoptòtiques al participar en la maduració de pro-caspasa 3 i en l'activació de mort cel·lular programada (159, 160). La baixa expressió de HSP60 en les cèl·lules HTOXAR3 provocaria una menor maduració d'aquesta caspasa i podria disminuir l'activació

d'apoptosi justificant, en part, la baixa capacitat citotòxica que mostren aquestes cèl·lules HTOXAR3 a l'oxaliplatí.

Al demostrar que els nivells de PKM2 són inferiors en les cèl·lules resistents a nivell d'ARNm i també a nivell proteic, podem confirmar que PKM2 es troba regulada tant a nivell transcripcional com traduccional. La menor expressió de PKM2 en cèl·lules més resistents a oxaliplatí es verifica en un panell de 8 línies d'adenocarcinoma colorectal a on es va observar que l'expressió gènica d'aquesta és inversament proporcional a la seva sensibilitat intrínseca. A més, vam observar que després d'exposar les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 a oxaliplatí ambdues línies responen disminuint els nivells de PKM2 a partir de les primeres 24 hores d'exposició a aquest, mantenint uns nivells superiors a les cèl·lules HT29. Tots aquests fets fan pensar que pot existir algun tipus de relació entre PKM2 i l'oxaliplatí. La proteïna piruvat quinasa (PK) és un enzim glicolític destinat a proveir les cèl·lules amb els requeriments metabòlics i energètics que necessiten. De les quatre isoformes existents (L, R, M1 i M2), PKM2 es troba present principalment en cèl·lules amb elevats ritmes proliferatius com les cèl·lules embrionàries, les cèl·lules mare adultes i especialment en les cèl·lules tumorals (127, 128). Durant el procés de tumorigènesi, PKM2 juga un paper destacat, ja que mentre les isoformes específiques de teixit van desapareixent, PKM2 torna a ser expressada. Aquesta PKM2 tumoral, es pot trobar de forma dimèrica o tetramèrica com a resultat d'una complexa regulació tant a nivell al·lostèric, com a través d'un nombre elevat de modificacions post-traduccional que es tradueixen en canvis funcionals que podrien interferir en la resposta als agents antineoplàsics (142). Tots aquests fets anteriorment esmentats ens han portat a estudiar PKM2 amb profunditat i conèixer la seva possible relació amb la resposta i l'adquisició de resistència a oxaliplatí en el càncer colorectal avançat.

Amb l'objectiu de conèixer si una davallada dels nivells de PKM2 en les cèl·lules inicialment sensibles a oxaliplatí provocaria un increment de la resistència quan són exposades a aquest platí, es va silenciar PKM2 en cèl·lules sensibles a oxaliplatí i es va avaluar la seva possible relació amb aquest fàrmac mitjançant l'anàlisi de la viabilitat i de la capacitat citotòxica i proliferativa. En una primera aproximació mitjançant contacte per blau tripà, vàrem observar que les cèl·lules HT29 a les que s'havia silenciat PKM2 i s'havia tractat amb oxaliplatí mantenien un percentatge de viabilitat lleugerament superior al llarg de tots els temps de tractament, i uns ritmes proliferatius també superiors. Fet que es va validar per tècnica MTT. El fet d'inhibir l'expressió de PKM2 a la línia HT29 va resultar en un increment de la resistència a OXA del 50%. Això corrobora que PKM2 té un paper en l'adquisició de resistència tot i no ser l'únic, tenint en compte una inhibició de PKM2 de més del 90%, i un increment de la resistència del 50% (la línia resistent té el doble de PKM2 i és 5 vegades més resistent a OXA que HT29). En la línia HCT116 en canvi, el silenciament de PKM2 va comportar de manera significativa un increment de la sensibilitat a OXA de gairebé el 50%.

Com hem mencionat anteriorment, l'expressió de PKM2 es veu disminuïda com a conseqüència d'una llarga i continua exposició a oxaliplatí, ajudant a incrementar la tolerància cap al fàrmac. Aquests resultats estan en la línia del treball de Yoo, BC i cols. a on, fent servir una aproximació similar a la nostra, demostren que el procés d'adquisició de resistència a un agent platinat, en aquest cas el cisplatí en línies cel·lulars derivades de tumor gàstric, provoca la disminució de PKM2 i de la seva activitat (150). Cal remarcar altres treballs com el de Sakai, A. en que també demostren que com a resultat d'un procés d'adquisició de resistència a un agent antineoplàstic com el 5FU, PKM2 també disminueix la seva presència a la cèl·lula (161). Les causes que podrien justificar

aquesta davallada d'expressió en cèl·lules resistents a agents antineoplàstics es comenten a continuació: un dels possibles reguladors del gen PKM és p53 ja que algunes eines informàtiques pronostiquen llocs d'unió per la proteïna p53 a la seva regió promotora (<http://switchgeargenomics.com/>). La transcripció del gen PKM pot estar regulada per PPAR γ i per factors de transcripció com Sp1 i Sp3 (162). Recentment s'ha descrit que en cèl·lules hepàtiques hiperplàsiques, PPAR γ pot unir-se al promotor de PKM i activar la seva expressió (163). Una disminució de PPAR γ o bé de la seva afinitat per aquesta regió promotora en les cèl·lules tumorals resistents, podria justificar la baixa expressió de PKM2 observada, però val a dir que experiments preliminars realitzats al nostre laboratori no han pogut demostrar diferències d'expressió de PPAR γ entre les cèl·lules HT29 i HTOXAR3, i per tant, aquesta causa no seria vàlida en el nostre model de resistència. Per una altra banda, el factor de transcripció Sp1 ha mostrat tenir diferent afinitat pel promotor PKM segons les condicions cel·lulars: quan la concentració de glucosa és elevada, Sp1 es desfosforila i s'uneix amb gran afinitat al promotor PKM (164), però una alta concentració d'espècies reactives d'oxigen (ROS) disminueix aquesta afinitat i, conseqüentment, l'expressió de PKM2 (165). L'oxaliplatí ha demostrat ser capaç de generar ROS en cèl·lules tumorals colorectals i alterar diverses proteïnes relacionades amb la supervivència, la proliferació i l'angiogènesi com Src, FAK, etc. (71). A més, quan l'estrès oxidatiu és elevat en una cèl·lula tumoral, PKM2 redueix la seva activitat, hiperactiva la via de les pentoses fosfat i genera NADPH com a poder reductor per reforçar les defenses antioxidants de la cèl·lula (170). En aquest context, podríem hipotetitzar que, després d'una llarga i contínua exposició a oxaliplatí com es dona en les cèl·lules HTOXAR3, la constant presència de ROS provocaria la pèrdua d'afinitat de Sp1 pel promotor PKM i la disminució de l'expressió gènica de PKM2. Conseqüentment, la davallada de PKM2 estimularia la via de pentoses fosfat

que, d'una banda protegiria les cèl·lules resistents de l'excés de radicals d'oxigen, augmentant la velocitat de reciclatge de l'oxaliplatí i escurçant el seu temps d'acció. D'altra banda, es promouria la síntesi de nucleòtids, necessaris per la reparació del dany a l'ADN i la proliferació cel·lular (140, 150, 166).

Les lesions a l'ADN activen els punts de control que regulen els mecanismes específics de reparació en les diferents fases del cicle cel·lular. Les cèl·lules detingudes en aquests punts de control, reactiven la progressió del cicle un cop el dany ha estat reparat, mentre que les cèl·lules amb dany irreparable romanen arrestades o bé moren. Es coneix que l'oxaliplatí indueix la detenció de les cèl·lules principalment en fases S i G2/M però aquesta detenció, segons hem observat a partir dels nostres resultats, no només depèn del tipus de lesió que provoca el fàrmac o la fase en la que es trobi la cèl·lula en el moment de la lesió, si no que l'estat mutacional de p53 juga un paper fonamental. En consonància amb altres autors hem observat que, mentre l'oxaliplatí provoca el bloqueig permanent de les cèl·lules HCT116 (p53 *wt*) en les fases G1 i G2/M des de les primeres 24 hores d'exposició a aquest, les cèl·lules HT29 (p53 mutada) es troben principalment detingudes a la fase S, però la gran majoria d'elles acabaran retingudes en G2/M al llarg del temps de tractament. Aquesta diferència de comportament confirma que l'efecte de l'oxaliplatí en cèl·lules amb p53 mutada és independent de p53. Pel que fa a PKM2, si bé el seu silenciament no exerceix cap alteració en el control del cicle cel·lular de les cèl·lules HCT116 i HT29 en estat basal, sí sembla provocar un petit increment de cèl·lules HCT116 detingudes en fase G1, fet que podria explicar l'augment de la sensibilitat a oxaliplatí observat mitjançant test MTT. Les cèl·lules HT29siPKM2 mostraren un ritme proliferatiu diferent de les cèl·lules siCNT, veient com incrementen les cèl·lules en fase de síntesi sense quedar retingudes a la fase següent. La

capacitat d'avançar en el cicle cel·lular que mostren les cèl·lules HT29siPKM2, pot significar que o bé vingui donada per una elevada capacitat de saltar lesions i per tant, provoqui un increment en la acumulació de mutacions i aberracions que acabin generant un tumor més agressiu, o bé una ràpida capacitat de reparació del dany genòmic i per tan una resistència més elevada a l'acció de l'oxaliplatí. Aquests resultats podrien suggerir una possible interacció entre PKM2, l'estat mutacional de p53 i la sensibilitat intrínseca a oxaliplatí (66, 67, 113, 155).

L'apoptosi ha sigut establerta com una via reguladora de mort cel·lular programada conservada al llarg de l'evolució. Malgrat tot, està començant a guanyar terreny el concepte de que l'apoptosi no és l'únic mecanisme regulador i que inclús la necrosi pot considerar-se com un tipus de mort cel·lular programada (167). En les nostres condicions experimentals hem observat que l'apoptosi induïda per oxaliplatí juga clarament un paper minoritari, ja que de l'estudi d'activació de mort cel·lular mitjançant test d'Anexina V/IP no vàrem observar que PKM2 pugui tenir cap paper significatiu en l'activació d'apoptosi (ni en estat basal ni en resposta a OXA) però tampoc l'oxaliplatí en sí mateix ja que, en cap cas l'increment de mort cel·lular provocada per oxaliplatí va ser superior al 10%. Per tant, el bloqueig del cicle cel·lular juga un paper important en la resposta a aquest fàrmac en comparació amb l'apoptosi i suggereix, com s'ha comentat anteriorment, que altres vies alternatives de p53 poden ser les responsables de la sensibilitat a oxaliplatí en les cèl·lules HT29. Aquest fet fa pensar que mecanismes com l'autofàgia, la necrosi o la catàstrofe mitòtica podrien ser els que participessin en la resposta citotòxica a aquest fàrmac. I tal com el grup d'Ullrich, A. varen demostrar, PKM2 podria estar implicada en l'activació de mort cel·lular independent de Caspasa 3 i Bcl-2 (147, 167, 168).

Aquests autors van suggerir que el paper de PKM2 en l'activació de mort cel·lular només es dona quan aquesta proteïna transloca al nucli cel·lular en resposta a estímuls tals com l'estrès oxidatiu. En aquest sentit, en els darrers anys s'ha pogut constatar la importància de les funcions nuclears de PKM2 en el suport de la proliferació cel·lular i la progressió tumoral. Recentment s'ha demostrat que únicament la forma dimèrica de PKM2 és la que es localitza al nucli degut a la regió de translocació nuclear que posseeix a la seva regió C-terminal, zona de regulació al·lostèrica i regió d'unió amb proteïnes com la Importina B1 per facilitar el seu transport nuclear (146). Aquesta regió de translocació, però, no és un senyal de translocació NLS clàssic ja que no és rica en arginines o lisines i per tant, es podria creure que la translocació nuclear de PKM2 podria ser mediada per canvis conformacionals induïts per estímuls concrets en aquesta regió però no per un mecanisme clàssic de senyal NLS (145).

Les funcions nuclears proposades per a PKM2 són molt diverses. La majoria dels estudis publicats indiquen que quan PKM2 es troba al nucli en resposta a estímuls com factors de creixement (EGF), una situació d'hipòxia cel·lular o la interleukina-3, pot interactuar amb i activar factors de transcripció com per exemple β -catenina (145, 169), Oct-4 (144), HIF1 α (170, 171) o STAT3 (146) i contribuir en la supervivència i proliferació cel·lular. També s'ha demostrat, però, que l'estrès oxidatiu generat per H₂O₂ així com el dany genòmic provocat per radiació UV provoca la translocació al nucli de PKM2 i l'activació de vies de mort cel·lular independents de caspases (147). Aquests fets ens van donar peu a estudiar a on pot estar localitzada PKM2 en les nostres línies cel·lulars i sí un dany genòmic com el que genera l'oxaliplatí pot ser motiu per alterar la localització de PKM2. En concordança amb Stetak, A. i col·laboradors, hem demostrat que PKM2 transloca al nucli de les cèl·lules en resposta a dany

genotòxic (i indirectament a l'estrès oxidatiu) generat per oxaliplatí en les cèl·lules HCT116 i HT29. No és el cas de les cèl·lules HTOXAR3, les quals no mostren translocació de PKM2 al nucli en resposta a cap dosi d'oxaliplatí al llarg de les 72 hores d'exposició al fàrmac. La resposta cel·lular al dany genòmic està mediada per un elevat nombre de proteïnes quinases com són ATM/ATR i una de les 700 dianes que aquestes proteïnes regulen és PKM2 (172). Per tant, la regulació de PKM2 mitjançant ATM/ATR podria ser una de les causes per les quals transloca al nucli en resposta a oxaliplatí. Encara i no tenir evidències i no conèixer si PKM2 s'uneix o no a l'ADN en aquestes condicions, podrien ser diverses les funcions de PKM2 en el nucli en resposta al dany genotòxic provocat per l'oxaliplatí. PKM2 podria participar en la transcripció i la replicació de l'ADN mitjançant l'estabilització de la matriu nuclear o de l'estructura de la cromatina. Podria exercir una funció com a proteïna quinasa també al nucli cel·lular (146). El canvi de compartimentalització cel·lular d'enzims metabòlics com GAPDH o LDH, sembla ser un mecanisme general per a la inducció de mort cel·lular (147, 173-175). Per similitud, PKM2 també podria tenir un paper al nucli com a mediador de la resposta cel·lular al dany, afavorint, directa o indirectament, l'expressió de gens de mort cel·lular o inhibint la de gens involucrats en la supervivència, el metabolisme o la reparació del dany a l'ADN.

D'altra banda, PKM2 ha estat relacionada a la forma citoplasmàtica de la proteïna PML (PMLc) en diversos tipus cel·lulars. PML també s'ha localitzat en els cossos nuclears associada a proteïnes com p53 i participant en l'aturada del creixement cel·lular, la senescència i l'apoptosi (176). Suposant que PKM2 pogués unir-se a PML nuclear (PMLn) de la mateixa forma que ho fa amb PMLc, aquest fet podria suposar que PKM2 també es trobés localitzada en aquests cossos nuclears amb dos motius: que l'acumulació suposi un mecanisme pel qual

la cèl·lula sensible al fàrmac “inactiva” una proteïna proliferativa, o bé que PKM2 pogués participar en la senescència i altres formes de mort cel·lular.

Com s’ha mencionat anteriorment, durant el procés d’adquisició de resistència es produeixen molts canvis en la cèl·lula, i possibles modificacions post-traduccionals tant en PKM2 com en els seus elements reguladors en podrien ser la causa de la seva permanent localització citoplasmàtica en les cèl·lules HTOXAR3. L’adquisició de mutacions en la regió C-terminal de PKM2 durant el procés d’adquisició de resistència podria evitar la translocació nuclear al no poder-se unir a les importines que la transporten ni a altres elements reguladors com s’ha observat que pot donar-se amb la proteïna p53 en cèl·lules resistents a oxaliplatí (177, 178). S’ha plantejat que els mecanismes de translocació de PKM2 estan relacionats amb la interacció amb la proteïna PIAS3 (*Protein Inhibitor of Activated STAT3*). Aquesta proteïna promou la sumoïlació de PKM2 i la seva conseqüent translocació nuclear (179). Sota aquests fets, podríem hipotetitzar que una alteració dels nivells de PIAS3 en les cèl·lules HTOXAR3 podrien provocar canvis en la regulació i el reciclatge de PKM2 i disminuir alhora la seva capacitat de translocació nuclear. Estudis preliminars del nostre grup han mostrat com l’expressió de PIAS3 en estat basal és el doble en les cèl·lules resistents que en les cèl·lules HT29. Curiosament, com a resposta a oxaliplatí, mentre les cèl·lules sensibles no alteren la seva expressió, les cèl·lules HTOXAR3 disminueixen fins a la meitat l’expressió de PIAS3. Tot i que aquests resultats son preliminars, obren una via per a estudiar la relació de PIAS3 amb l’oxaliplatí i la possible relació amb PKM2 o amb altres proteïnes de naturalesa similar que puguin ser regulades de la mateixa forma. Es necessiten resultats més concloents per confirmar possibles significats. Fins al moment, però,

desconeixem els mecanismes en que PKM2 participa en el nucli en resposta a oxaliplatí, obrint noves vies d'estudi en aquesta línia.

Una qüestió interessant era saber quines proteïnes alteraven la seva expressió quan es silenciava PKM2 posant de manifest una relació directa o indirecta a aquesta última. L'estudi proteic mitjançant tècnica 2D-DIGE va demostrar que la inhibició de PKM2 provoca canvis en proteïnes relacionades amb el transport intracel·lular, la síntesi d'àcids nucleics i proteïnes i el metabolisme glucídic, però també en diverses proteïnes chaperones, d'adhesió i mobilitat cel·lular i en una petita proporció d'elles implicades en la replicació i la reparació de l'ADN. Val a dir que, donat que no es van comparar els proteomes en condicions de tractament, no podem verificar amb completa certesa que aquestes proteïnes alterin la seva expressió a través de PKM2 en resposta a oxaliplatí, fet que ajudaria a comprendre amb més claredat quina funció desenvolupa PKM2 al nucli cel·lular en resposta a oxaliplatí. De totes formes, aquest estudi ens ha permès comprendre la importància de la presència de PKM2 en les diverses funcions biològiques que desenvolupa la cèl·lula tumoral.

L'anàlisi en 1 dimensió per WB ens va permetre confirmar que la manca d'expressió de PKM2 provoca la disminució d'una sèrie de proteïnes seleccionades: Ran, Importina B1, HSC70, HSP90AA i FKBP4, en les cèl·lules HT29 encara que de forma molt més modesta que la obtinguda per proteòmica comparativa. El fet d'observar canvis més significatius en els resultats de 2D-DIGE podrien ser deguts, en alguns casos, a que el punt proteic observat al gel 2D correspongui a una forma modificada (oxidada, fosforil·lada, etc.) de la proteïna però sense comportar canvis significatius en l'expressió total d'aquesta. Les proteïnes Ezrina, Plakoglobina i HSP60 no es van poder validar per WB i no

van mostrar diferències al silenciar PKM2, però sí van mostrar-se alterades a les cèl·lules HTOXAR3. Aquest fet suggereix una relació, sigui causa o conseqüència, amb els processos d'adquisició de resistència a oxaliplatí. Ezrina i Plakoglobina són proteïnes involucrades en l'adhesió cel·lular que participen en processos de transició epiteli-mesènquima. S'ha demostrat que Plakoglobina ha demostrat estar menys expressada en cèl·lules tumorals de còlon que han adquirit resistència a oxaliplatí (131). Per una altra banda, Ezrina participa en la modulació de la morfologia cel·lular i sobretot és important el seu paper en la mobilitat cel·lular, però també en la invasió i progressió tumoral i en el desenvolupament de metàstasis (180, 181). Ezrina intervé en l'activació d'apoptosi mediada per Fas en resposta a cisplatí (182). Com a hipòtesi, aquesta disminució juntament amb la de PKM2 en les cèl·lules HTOXAR3 podria conferir a aquestes cèl·lules major resistència al tractament amb agents platinats al prevenir la organització del citoesquelet i la apoptosi i afavorir la transició epiteli-mesènquima de les nostres cèl·lules facilitant, alhora, la migració i invasió a altres òrgans.

HSC70 i FKBP4 són les dues proteïnes que es van validar significativament mitjançant WB. Pel que fa a HSC70, és una molècula chaperona que es va mostrar disminuïda en les cèl·lules HT29siPKM2 i més significativament en les cèl·lules HTOXAR3 indicant una possible relació amb PKM2 i amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí. HSC70, al igual que PKM2, està més expressada a les cèl·lules tumorals però menys expressada a les cèl·lules que han adquirit resistència a oxaliplatí. Aquesta proteïna pot localitzar al nucli en cèl·lules tractades amb agents genotòxics formant part d'un complex proteic amb HMBG1, HMGB2, GAPDH i PDIA3 que s'uneix a l'ADN modificat per activar una resposta citotòxica. Val a dir que PDIA3, malgrat no haver-se validat mitjançant

WB, va ser una de les dues proteïnes identificades de l'estudi comparatiu 2D-DIGE que es van mostrar sobreexpressades en les cèl·lules a les que s'havia silenciat PKM2. Sota aquestes premisses, podríem especular que, donat que l'oxaliplatí també és capaç de generar dany genotòxic, les estructures d'ADN alterades per aquest podrien ser reconegudes per HSC70 i la resta del complex, i activar la resposta citotòxica. Per tant, la baixa presència de HSC70 i PKM2 a les cèl·lules estarien desfavorint els diversos processos cel·lulars de resposta citotòxica a oxaliplatí (183, 184). A més, la interacció entre PKM2 i HSC70 ha estat descrita recentment per Lv, L. i cols. els quals descriuen com PKM2 és acetil·lada a través d'aquesta proteïna, portant a una inhibició de la seva activitat piruvat quinasa i promovent la seva degradació per la via d'autofàgia mediada per chaperones. Aquesta degradació promou la proliferació cel·lular i el creixement tumoral (185).

Les proteïnes d'unió a FK506 són membres d'una llarga superfamília d'isomerases àmpliament distribuïdes i amb funcions diverses. Dos dels seus membres, FKBP4 i FKBP5, són proteïnes homòlogues que comparteixen un 75% de similitud. Ambdues participen en la dinàmica dels microtúbuls i competeixen per la unió a HSP90. Recentment s'ha demostrat que la disminució de l'expressió de FKBP5 en cèl·lules tumorals resulta en una hiperfosforilació d'AKT1 i una disminució de la mort cel·lular per estrés genotòxic (186). Resultats previs del nostre laboratori han demostrat que AKT1, es troba incrementada de manera significativa a les cèl·lules que han adquirit resistència a oxaliplatí (125), i en aquesta tesi doctoral hem demostrat que FKBP4 es troba disminuïda en aquestes mateixes cèl·lules. Per similitud amb l'estructura gènica i proteica amb FKBP5, podríem especular que FKBP4 podria assolir la mateixa funció que la seva homòloga afavorint l'activació d'AKT1 i per tant, repercutir en la resposta a

quimioteràpia i la proliferació cel·lular. Però també s’ha discutit la possibilitat de que aquestes dues proteïnes, malgrat mantenir certa homologia, tinguin funcions antagòniques, i s’afavoreixi la competència entre elles pels llocs d’unió a HSP90 i a microtúbuls (187).

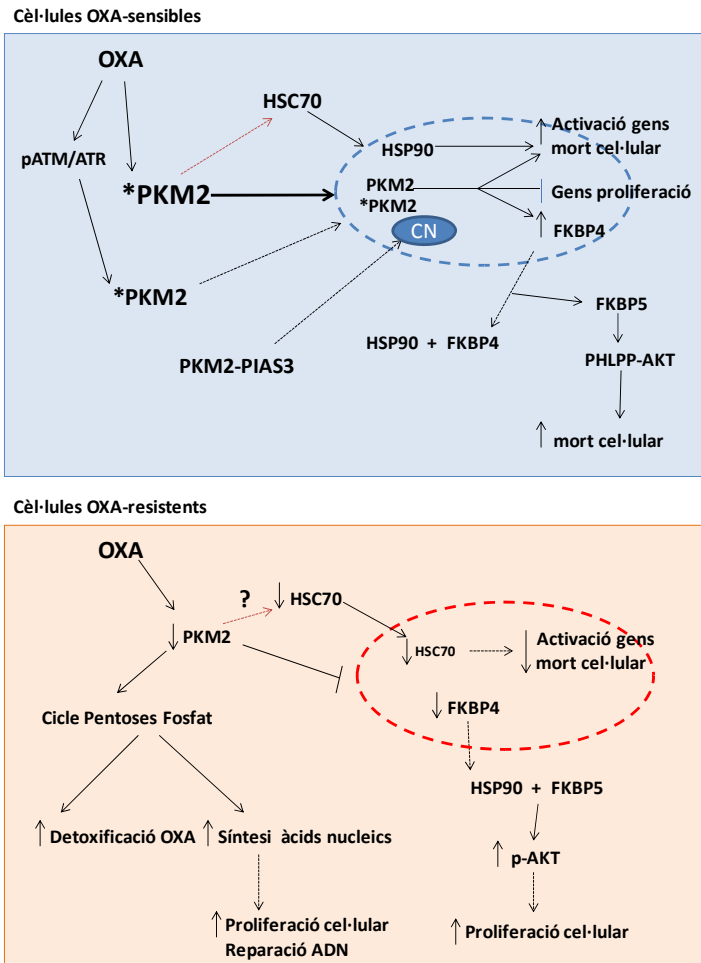


Figura 1. Model hipotètic que il·lustra els diferents papers funcionals que pot assolir PKM2 en la resposta a oxaliplatí en cèl·lules tumorals de colon humanes sensibles i resistents a aquest fàrmac. CN: cossos nuclears. OXA: oxaliplatí. *: modificacions post-traduccionals (fosforilació, acetil·lació, sumoil·lació, etc). p-proteïna: fosforilació de la proteïna.

La disminució de FKBP4, en el nostre cas, podria suposar facilitar la unió de FKBP5 amb HSP90, afavorir l'estabilització de microtúbuls i el sobrecreixement cel·lular, i al mateix temps, afectar a l'activació d'AKT1 i a la resposta a l'oxaliplatí. Caldrà estudiar amb profunditat aquestes proteïnes per tal d'elucidar els mecanismes pels quals intervenen en l'adquisició de resistència a oxaliplatí i quina és la seva relació amb PKM2.

PKM2 és una proteïna altament expressada en molts tipus tumorals. Per aquest motiu s'ha proposat que la determinació dels nivells circulants de PKM2 tumoral en pacients portadors de diversos tumors sòlids com per exemple els de pulmó, mama, o els tumors colorectals, podria ser utilitzada per a discriminar entre malaltia benigna i maligna, així com, per informar de l'estadi tumoral i de la resposta a quimioteràpia (188-199). Tot i això, l'any 2006 Staib P. i cols. va concloure que els nivells de PKM2 en plasma no podien ser utilitzats com a marcador en malalties hematològiques ni en tumors sòlids per l'elevat nombre de falsos positius detectats en pacients control (200). En canvi, l'any 2008 el grup de Hardt P.D. va defensar que la determinació de PKM2 tumoral en plasma permet obtenir la mateixa sensibilitat que altres marcadors tumorals i que, en combinació amb els marcadors establerts, pot ser una eina útil de diagnòstic de la malaltia gastrointestinal (201). Els estudis publicats en el darrer any han demostrat que la determinació dels nivells de PKM2 en sèrum de pacients amb CCR pot ser una eina útil d'estadiatge de la malaltia, convertint-se en una eina d'elevat valor diagnòstic de la malaltia que pot ser utilitzat com a eficient test de detecció primària del CCR (202, 203). La proposta de la detecció de PKM2 fecal en CCR va aparèixer com a prometedora eina de diagnòstic però son diversos els treballs que posen en dubte la seva validesa com a biomarcador específic (190, 204-208).

En el darrer any també s'ha posat en dubte que PKM2 s'expressi exclusivament en teixit tumoral, ja que també pot ser trobada en teixit normal co-expressant-se ambdues isoformes (PKM1 i PKM2) (143). De confirmar-se aquests resultats, PKM2 podria perdre valor com a marcador tumoral. Pel que fa a aquesta tesi doctoral, hem cregut important conèixer no el valor diagnòstic si no el possible paper com a factor predictiu de la resposta a quimioteràpia basada en oxaliplatí en el CCR avançat. En concordança amb els resultats *in vitro* de la primera part d'aquest estudi, hem observat que els baixos nivells de PKM2 en malalts de CCRa correlacionen amb una menor resposta a la quimioteràpia basada en oxaliplatí, essent un factor de risc independent. Aquests resultats donen peu a proposar PKM2 com a marcador tumoral de progressió de malaltia i de resposta a oxaliplatí. Recentment, s'ha proposat que la determinació dels nivells de PKM2 nuclear mitjançant tècnica d'immunohistoquímica, pot ser una eina útil per determinar grau de malignitat i pronòstic en pacients amb glioblastoma (169). En el nostre cas no hem observat la localització nuclear de PKM2 en condicions basals en els adenocarcinomes de colon estudiats. La localització de PKM2 tant mitjançant l'estudi *in vitro* de translocació nuclear, com d'immunohistoquímica en tumors de pacients amb CCRa ha sigut sempre citoplasmàtica.

D'altra banda és interessant mencionar els resultats obtinguts en que els pacients amb baixa expressió de PKM2 i p53 mutada, foren els que mostraren pitjors respostes al tractament. Tal i com també es desprèn dels nostres resultats *in vitro* amb les línies HCT116 i HT29, es podria elucubrar sobre una possible relació de l'estat mutacional de p53, l'expressió de PKM2 i la resposta a quimioteràpia amb oxaliplatí. Valdria la pena aprofundir en el coneixement d'aquestes relacions i en el paper regulador de p53 sobre PKM2.

Per resumir, la majoria de treballs realitzats s'han centrat en l'estudi de PKM2 i la seva complexa regulació en els diferents tipus tumorals, molt pocs han investigat la seva relació amb la resposta i resistència a fàrmacs antineoplàsics i cap amb la resposta a oxaliplatí ni a nivell *in vitro* ni en cap estudi amb pacients, per determinar el seu valor predictiu. En aquesta tesi doctoral hem demostrat que PKM2 disminueix els seus nivells com a resposta a oxaliplatí, que és capaç de participar en l'efecte citostàtic, i de forma secundària en l'efecte citotòxic, en cèl·lules tumorals procedents d'adenocarcinoma de colon depenent de l'estatus mutacional de p53. Hem observat que PKM2 és capaç de translocar al nucli de les cèl·lules sensibles a aquest platí al llarg de 72 hores de tractament continu però no en les cèl·lules derivades resistents. També hem descobert que la seva inhibició provoca l'alteració de diverses proteïnes amb funció chaperona i de proteïnes que participen en processos de reparació d'ADN i d'adhesió i motilitat cel·lular, algunes d'elles alterades de la mateixa forma en el nostre model d'adquisició de resistència. Finalment, hem observat que els pacients amb els nivells més baixos de PKM2 mostraren pitjor resposta a quimioteràpia basada en oxaliplatí i que aquesta resposta també pot venir donada al mateix temps per l'estat mutacional de p53 en aquests pacients.

Malgrat PKM2 ha estat un enzim clau relacionat amb l'efecte *Warburg* i estretament associat amb la proliferació cel·lular, els nostres resultats es troben en consonància amb els del treball d'Stetak, A. (147). Aquests resultats contradiuen la proposta d'alguns autors d'inhibir la seva expressió amb objectius terapèutics, ja que de confirmar-se les nostres dades, aquesta proteïna estaria també participant en la resposta al dany. Proposem per tant, modular la seva funció de diferents formes, com també proposen Anastasious, D. i cols, per

interferir amb el major èxit possible amb el metabolisme de la cèl·lula tumoral i millorar les respostes al tractament quimioterapèutic (140).

Aquesta tesi doctoral pot obrir també noves línies d'estudi sobre el paper de PKM2 en el nucli sota un estímul genotòxic, sobre les vies alternatives de mort cel·lular en que s'intueix que pot estar implicada així com en el complicat control del metabolisme de les cèl·lules tumorals. Però també, sobre la influència que pot tenir PKM2 i altres enzims metabòlics en la resposta als diferents tipus d'agents antitumorals, tant els agents clàssics com l'oxaliplatí com a les noves molècules del futur. Sempre amb el principal objectiu de poder apropar-nos més a conèixer els mecanismes pels quals els pacients deixen de respondre a la quimioteràpia, i poder ajudar a millorar el tractament dels pacients afectats de càncer colorectal avançat.

6. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

D'acord amb els resultats obtinguts, les conclusions d'aquesta tesi doctoral són:

1. L'adquisició de resistència a oxaliplatí provoca canvis en el patró proteic de les cèl·lules HT29. S'han identificat 5 proteïnes relacionades a l'adquisició de resistència a oxaliplatí: Enolasa 1, HSC70, HSP60, hnRNPC1 i PKM2.
2. PKM2 i HSP60 es troben menys expressades en les cèl·lules resistents a oxaliplatí a nivell proteic i únicament PKM2 també a nivell transcripcional. Els nivells d'ARNm de PKM2 correlacionen negativament amb la sensibilitat a oxaliplatí en un panell de 8 línies cel·lulars humanes de CCR.
3. El tractament amb oxaliplatí produeix una davallada dels nivells de PKM2 a partir de les 24 hores d'exposició a aquest tant en HT29 com en HTOXAR3, sent més marcada en les cèl·lules sensibles a oxaliplatí, fet que indica un possible paper en la resposta cel·lular al tractament.
4. La transfecció de siRNAs específics per a PKM2 produeixen una inhibició de PKM2 de més del 93% tant a nivell de ARNm com a nivell proteic. El silenciament de PKM2 incrementa la sensibilitat a oxaliplatí en les cèl·lules HCTT16 (p53 wt) i la resistència en les cèl·lules HT29 (p53 mutada) en aproximadament un 50% respectivament.
5. Les cèl·lules HCT116 mantenen detingudes les cèl·lules en fase G1 i G2/M al llarg de la exposició a oxaliplatí. Les cèl·lules HT29 mantenen les

cèl·lules retingudes en fase S i G2/M, saltant el primer punt de control com a conseqüència de les mutacions en p53. La inhibició de l'expressió de PKM2 en HCT116 no sembla tenir un efecte significatiu en l'arrest del cicle cel·lular com a resposta al fàrmac. El silenciament de PKM2 en les cèl·lules HT29 altera la capacitat citostàtica de l'oxaliplatí afavorint la proliferació cel·lular.

6. L'activació de mort programada per apoptosi no és la via principal de mort cel·lular provocada per oxaliplatí a les cèl·lules HT29. El silenciament de PKM2 no té un efecte significatiu en l'activació de mort cel·lular.

7. PKM2 transloca al nucli de les cèl·lules HCT116 i HT29 en resposta a oxaliplatí de manera dosi i temps dependent. A les cèl·lules HTOXAR3, PKM2 no és capaç de translocar en resposta a diferents dosis del fàrmac al llarg del temps d'exposició a aquest. D'aquesta manera, sembla que la implicació de PKM2 en la sensibilitat a oxaliplatí està relacionada amb la seva translocació nuclear en resposta al tractament. PKM2 podria tenir diferents funcions a les cèl·lules amb resistència adquirida a oxaliplatí de les que pot tenir a les cèl·lules inicialment sensibles a aquest agent platinat.

8. Mitjançant l'estudi amb proteòmica comparativa 2D-DIGE, s'han determinat 35 proteïnes amb expressió depenent directa o indirectament de l'expressió de PKM2. La majoria d'elles estan relacionades amb activitat chaperona, replicació i reparació de l'ADN, metabolisme energètic així com proteïnes relacionades amb la mobilitat cel·lular i la transició epiteli-mesènquima.

9. Entre les proteïnes validades per Western Blot, HSP90AA1, HSC70, FKBP4, Plakoglobina, Ran i Importina B1, malgrat no mostrar els mateixos nivells de down-regulació que per 2D-DIGE, es troben en menor quantitat al silenciar PKM2 i a les cèl·lules HTOXAR3. En especial, la proteïna HSC70 mostra una infraexpressió significativa tant en la línia amb PKM2 silenciada com a les cèl·lules HTOXAR3, posant de manifest un possible paper en l'adquisició de resistència juntament amb PKM2.

10. Es pot confirmar una connexió entre els resultats *in vitro* i *in vivo*: la baixa expressió de PKM2 es correlaciona amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí i amb una pitjor resposta al tractament en els malalts estudiats amb adenocarcinoma colorectal tractats en primera línia amb oxaliplatí/5FU.

11. Dels resultats obtinguts podem proposar PKM2 com a marcador predictiu de resposta a teràpia basada en oxaliplatí en pacients amb càncer colorectal avançat.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Abad A. Protocolos en oncología. In: GlaxoSmithKline, editor. Protocolos en oncología. Madrid; 2009.
2. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer. Lancet 2010 Mar 20;375(9719):1030-47.
3. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. Lancet 2005 Jan 8-14;365(9454):153-65.
4. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management? Rev Esp Enferm Dig 2011 Jan;103(1):29-35.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990 Jun 1;61(5):759-67.
6. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 1997 Apr 24;386(6627):761, 3.
7. Michor F, Iwasa Y, Rajagopalan H, Lengauer C, Nowak MA. Linear model of colon cancer initiation. Cell Cycle 2004 Mar;3(3):358-62.
8. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science 2006 Oct 13;314(5797):268-74.
9. Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science 2007 Nov 16;318(5853):1108-13.
10. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. Nat Rev Cancer 2009 Jul;9(7):489-99.
11. Deininger P. Genetic instability in cancer: caretaker and gatekeeper genes. Ochsner J 1999 Oct;1(4):206-9.
12. Harrison S, Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. Surgeon 2011 Aug;9(4):200-10.
13. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppede F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. Journal of biomedicine & biotechnology 2011;2011:792362.
14. Michor F, Iwasa Y, Nowak MA. Dynamics of cancer progression. Nat Rev Cancer 2004 Mar;4(3):197-205.

15. Fan F, Schimming A, Jaeger D, Podar K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J Oncol* 2012;2012:281261.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
17. Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* 2007 Oct 3;99(19):1441-54.
18. Crea F, Nobili S, Paolicchi E, et al. Epigenetics and chemoresistance in colorectal cancer: an opportunity for treatment tailoring and novel therapeutic strategies. *Drug Resist Updat* 2011 Dec;14(6):280-96.
19. Lopez-Serra P, Esteller M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* 2012 Aug 22.
20. Conti JA, Kemeny NE, Saltz LB, et al. Irinotecan is an active agent in untreated patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996 Mar;14(3):709-15.
21. Diaz-Rubio E, Tabernero J, Gomez-Espana A, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final report of the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors Trial. *J Clin Oncol* 2007 Sep 20;25(27):4224-30.
22. Porschen R, Arkenau HT, Kubicka S, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol* 2007 Sep 20;25(27):4217-23.
23. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 2005 Aug 1;23(22):4866-75.
24. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007 May 1;25(13):1670-6.
25. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008 Apr 20;26(12):2013-9.

26. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011 Jun 18;377(9783):2103-14.
27. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 Jul 22;351(4):337-45.
28. Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 Feb 5;360(6):563-72.
29. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
30. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010 Nov 1;28(31):4697-705.
31. Patiyl S, Alberts SR. Metastatic colorectal cancer: Therapeutic options. *Curr Treat Options Oncol* 2006 Sep;7(5):389-98.
32. Guo Y, Kotova E, Chen ZS, et al. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem* 2003 Aug 8;278(32):29509-14.
33. Martinez-Balibrea E, Manzano JL, Martinez-Cardus A, et al. Combined analysis of genetic polymorphisms in thymidylate synthase, uridine diphosphate glucuronosyltransferase and X-ray cross complementing factor 1 genes as a prognostic factor in advanced colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil plus oxaliplatin or irinotecan. *Oncol Rep* 2007 Mar;17(3):637-45.
34. Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Musulen E, et al. Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int J Cancer* 2009 Jun 15;124(12):2905-10.
35. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

36. Fodale V, Pierobon M, Liotta L, Petricoin E. Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer J* 2011 Mar-Apr;17(2):89-95.
37. Chuthapisith S, Eremin J, El-Sheemey M, Eremin O. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol* 2010 Mar;19(1):27-32.
38. Perona R, Lopez-Ayllon BD, de Castro Carpeno J, Belda-Iniesta C. A role for cancer stem cells in drug resistance and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 2011 May;13(5):289-93.
39. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976 Nov 11;455(1):152-62.
40. Gillet JP, Efferth T, Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta* 2007 Jun;1775(2):237-62.
41. Gillet JP, Wang J, Calcagno AM, et al. Clinical Relevance of Multidrug Resistance Gene Expression in Ovarian Serous Carcinoma Effusions. *Mol Pharm* 2011 Jul 15.
42. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005 May 1;204(3):216-37.
43. Huang MY, Chen MJ, Tsai HL, et al. Prospective analysis of KRAS wild-type patients with metastatic colorectal cancer using cetuximab plus FOLFIRI or FOLFOX4 treatment regimens. *Genet Mol Res* 2011 Oct 3;10(4).
44. Martinez-Balibrea E, Abad A, Aranda E, et al. Pharmacogenetic approach for capecitabine or 5-fluorouracil selection to be combined with oxaliplatin as first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2008 Jun;44(9):1229-37.
45. Martinez-Balibrea E, Abad A, Martinez-Cardus A, et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br J Cancer* 2010 Aug 10;103(4):581-9.
46. Monzo M, Moreno I, Navarro A, et al. Single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes XPA, XPD, XPG and ERCC1 in advanced colorectal cancer patients treated with first-line oxaliplatin/fluoropyrimidine. *Oncology* 2007;72(5-6):364-70.

47. Pare L, Marcuello E, Altes A, et al. Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *Br J Cancer* 2008 Oct 7;99(7):1050-5.
48. Yin M, Yan J, Martinez-Balibrea E, et al. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2011 Mar 15;17(6):1632-40.
49. Aiello M, Vella N, Cannavo C, et al. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy (Review). *Mol Med Report* 2011 Mar-Apr;4(2):203-8.
50. Braun MS, Richman SD, Quirke P, et al. Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2008 Jun 1;26(16):2690-8.
51. Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 2010 Mar;7(3):543-66.
52. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 1998 Oct;9(10):1053-71.
53. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 1998 Apr;25(2 Suppl 5):4-12.
54. Soulie P, Bensmaine A, Garrino C, et al. Oxaliplatin/cisplatin (L-OHP/CDDP) combination in heavily pretreated ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1997 Aug;33(9):1400-6.
55. Soulie P, Garrino C, Bensmaine MA, et al. Antitumoral activity of oxaliplatin/cisplatin-based combination therapy in cisplatin-refractory germ cell cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999 Dec;125(12):707-11.
56. Soulie P, Raymond E, Brienza S, Cvitkovic E. [Oxaliplatin: the first DACH platinum in clinical practice]. *Bull Cancer* 1997 Jun;84(6):665-73.
57. Andre T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009 Jul 1;27(19):3109-16.

58. Sharif S, O'Connell MJ, Yothers G, Lopa S, Wolmark N. FOLFOX and FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer. *Cancer Invest* 2008 Nov;26(9):956-63.
59. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002 Jan;1(3):227-35.
60. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol* 2011 Jan;18(1):18-25.
61. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007 Feb;33(1):9-23.
62. Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 2009;1(4):280-91.
63. Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell Mol Life Sci* 2002 Nov;59(11):1914-27.
64. Chiu SJ, Lee YJ, Hsu TS, Chen WS. Oxaliplatin-induced gamma-H2AX activation via both p53-dependent and -independent pathways but is not associated with cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* 2009 Dec 10;182(2-3):173-82.
65. Wilson TR, Longley DB, Johnston PG. Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol* 2006 Sep;17 Suppl 10:x315-24.
66. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2004 Nov 29;91(11):1931-46.
67. William-Faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G. Cell cycle arrest by oxaliplatin on cancer cells. *Fundam Clin Pharmacol* 2007 Apr;21(2):165-72.
68. Volland C, Bord A, Peleraux A, et al. Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006 Sep;5(9):2149-57.
69. Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Apr;9(4):297-308.
70. Afzal S, Jensen SA, Sorensen JB, Henriksen T, Weimann A, Poulsen HE. Oxidative damage to guanine nucleosides following combination chemotherapy with 5-

- fluorouracil and oxaliplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012 Feb;69(2):301-7.
71. Kopetz S, Lesslie DP, Dallas NA, et al. Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res* 2009 May 1;69(9):3842-9.
 72. Waly MI, Al Moundhri MS, Ali BH. Effect of curcumin on cisplatin- and oxaliplatin-induced oxidative stress in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. *Ren Fail* 2011;33(5):518-23.
 73. Preston TJ, Henderson JT, McCallum GP, Wells PG. Base excision repair of reactive oxygen species-initiated 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine inhibits the cytotoxicity of platinum anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2009 Jul;8(7):2015-26.
 74. Zhu G, Chang P, Lippard SJ. Recognition of platinum-DNA damage by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 2010 Jul 27;49(29):6177-83.
 75. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev* 2008 Jul-Aug;129(7-8):391-407.
 76. Ura K, Hayes JJ. Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur J Biochem* 2002 May;269(9):2288-93.
 77. de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1999 Apr 1;13(7):768-85.
 78. Marchetti P, Galla DA, Russo FP, et al. Apoptosis induced by oxaliplatin in human colon cancer HCT15 cell line. *Anticancer Res* 2004 Jan-Feb;24(1):219-26.
 79. El Fajoui Z, Toscano F, Jacquemin G, et al. Oxaliplatin sensitizes human colon cancer cells to TRAIL through JNK-dependent phosphorylation of Bcl-xL. *Gastroenterology* 2011 Aug;141(2):663-73.
 80. Chiu SJ, Chao JI, Lee YJ, Hsu TS. Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells. *Toxicol Lett* 2008 Jun 30;179(2):63-70.
 81. Liu HF, Hu HC, Chao JI. Oxaliplatin down-regulates survivin by p38 MAP kinase and proteasome in human colon cancer cells. *Chem Biol Interact* 2010 Dec 5;188(3):535-45.

82. Ngan CY, Yamamoto H, Takagi A, et al. Oxaliplatin induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells. *Cancer Sci* 2008 Jan;99(1):129-39.
83. Zhou S, Zhao L, Kuang M, et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett* 2012 Oct 28;323(2):115-27.
84. Liu JJ, Lin M, Yu JY, Liu B, Bao JK. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett* 2011 Jan 28;300(2):105-14.
85. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Sep;8(9):741-52.
86. Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, et al. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 2008 Aug;4(6):810-4.
87. Ding ZB, Hui B, Shi YH, et al. Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clin Cancer Res* 2011 Oct 1;17(19):6229-38.
88. Du H, Yang W, Chen L, et al. Role of autophagy in resistance to oxaliplatin in hepatocellular carcinoma cells. *Oncology reports* 2012 Jan;27(1):143-50.
89. Dobson PD, Lanthaler K, Oliver SG, Kell DB. Implications of the dominant role of transporters in drug uptake by cells. *Curr Top Med Chem* 2009;9(2):163-81.
90. Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RH, Wiemer EA. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat* 2011 Feb;14(1):22-34.
91. Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, et al. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res* 2006 Sep 1;66(17):8847-57.
92. Larson CA, Blair BG, Safaei R, Howell SB. The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol Pharmacol* 2009 Feb;75(2):324-30.
93. Burger H, Zoumaro-Djayoon A, Boersma AW, et al. Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *British journal of pharmacology* 2010 Feb;159(4):898-908.
94. Samimi G, Katano K, Holzer AK, Safaei R, Howell SB. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol* 2004 Jul;66(1):25-32.

95. Plasencia C, Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Quinn DI, Abad A, Neamati N. Expression analysis of genes involved in oxaliplatin response and development of oxaliplatin-resistant HT29 colon cancer cells. *Int J Oncol* 2006 Jul;29(1):225-35.
96. Gnoni A, Russo A, Silvestris N, et al. Pharmacokinetic and Metabolism Determinants of Fluoropyrimidines and Oxaliplatin Activity in Treatment of Colorectal Patients. *Curr Drug Metab* 2011 Jul 25.
97. Noda E, Maeda K, Inoue T, et al. Predictive Value of Expression of ERCC 1 and GST-p for 5-Fluorouracil/Oxaliplatin Chemotherapy in Advanced Colorectal Cancer. *Hepato-gastroenterology* 2012 Jul 29;59(113).
98. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindault-Goebel F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010 Jan;69(1):58-66.
99. Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lorient MA. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006 May 15;12(10):3050-6.
100. Stoehmacher J, Ghaderi V, Iobal S, et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001 Jul-Aug;21(4B):3075-9.
101. Fink D, Nebel S, Aebi S, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 1996 Nov 1;56(21):4881-6.
102. Vaisman A, Varchenko M, Umar A, et al. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* 1998 Aug 15;58(16):3579-85.
103. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 1998 Jan;4(1):1-6.
104. Bohanes P, Labonte MJ, Lenz HJ. A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011 Sep;10(3):157-64.
105. Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 2003 Jan;39(1):112-9.

106. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001 Dec 1;19(23):4298-304.
107. Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, Hamilton TC. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 2003 Mar 15;63(6):1311-6.
108. Harradine KA, Kassner M, Chow D, et al. Functional genomics reveals diverse cellular processes that modulate tumor cell response to oxaliplatin. *Mol Cancer Res* 2011 Feb;9(2):173-82.
109. Hector S, Bolanowska-Higdon W, Zdanowicz J, Hitt S, Pendyala L. In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001 Nov;48(5):398-406.
110. Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001 Dec 15;61(24):8654-8.
111. Mishima M, Samimi G, Kondo A, Lin X, Howell SB. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance. *Eur J Cancer* 2002 Jul;38(10):1405-12.
112. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994 Sep;22(17):3551-5.
113. Toscano F, Parmentier B, Fajoui ZE, et al. p53 dependent and independent sensitivity to oxaliplatin of colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007 Aug 1;74(3):392-406.
114. Petit T, Bearss DJ, Troyer DA, Munoz RM, Windle JJ. p53-independent response to cisplatin and oxaliplatin in MMTV-ras mouse salivary tumors. *Mol Cancer Ther* 2003 Feb;2(2):165-71.
115. Seo YR, Chen EI, Smith ML. Sensitivity of p53-deficient cells to oxaliplatin and thio-TEPA (N, N', N'' triethylenethiophosphoramidate). *Breast Cancer Res Treat* 2002 Apr;72(3):255-63.
116. Wang Z, Zhou J, Fan J, et al. Oxaliplatin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Expert Opin Investig Drugs* 2009 Nov;18(11):1595-604.

117. Gourdier I, Crabbe L, Andreau K, Pau B, Kroemer G. Oxaliplatin-induced mitochondrial apoptotic response of colon carcinoma cells does not require nuclear DNA. *Oncogene* 2004 Sep 30;23(45):7449-57.
118. Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI. Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Mol Cancer Ther* 2004 Feb;3(2):169-78.
119. Bousserouel S, Kauntz H, Gosse F, et al. Identification of gene expression profiles correlated to tumor progression in a preclinical model of colon carcinogenesis. *International journal of oncology* 2010 Jun;36(6):1485-90.
120. Li H, Fan X, Stoicov C, et al. Human and mouse colon cancer utilizes CD95 signaling for local growth and metastatic spread to liver. *Gastroenterology* 2009 Sep;137(3):934-44, 44 e1-4.
121. Almendro V, Ametller E, Garcia-Recio S, et al. The role of MMP7 and its cross-talk with the FAS/FASL system during the acquisition of chemoresistance to oxaliplatin. *PLoS One* 2009;4(3):e4728.
122. Ryu BK, Lee MG, Chi SG, Kim YW, Park JH. Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma. *J Pathol* 2001 May;194(1):15-9.
123. Longley DB, Wilson TR, McEwan M, et al. c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death. *Oncogene* 2006 Feb 9;25(6):838-48.
124. Park SJ, Kim YY, Ju JW, Han BG, Park SI, Park BJ. Alternative splicing variants of c-FLIP transduce the differential signal through the Raf or TRAF2 in TNF-induced cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Dec 21;289(5):1205-10.
125. Martinez-Cardus A, Martinez-Balibrea E, Bandres E, et al. Pharmacogenomic approach for the identification of novel determinants of acquired resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2009 Jan;8(1):194-202.
126. Sureda M, Matinez-Cardús A, Ginés A, Ruiz de Porras V, Abad A, Martinez-Balibrea E. Role of cyclin-dependent kinase 5 in oxaliplatin resistance. ASEICA annual meeting, abs 1783; 2011; Salamanca; 2011.
127. Ruiz de Porras V, Alcon, C., Martinez-Cardús, A., Ginés, A., Musulén, E., Manzano, JL., Abad, A. and Martinez-Balibrea, E. CDK5 is involved in oxaliplatin response and resistance acquisition through regulation of STAT3 transcription

- factor. European Association for Research in Cancer (EARC), annual meeting abstract num 1001; 2012; Barcelona; 2012.
128. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999 Dec;23(4):387-8.
 129. Zaffaroni N, Daidone MG. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resist Updat* 2002 Apr;5(2):65-72.
 130. Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, et al. The autophagic tumor stroma model of cancer or "battery-operated tumor growth": A simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle* 2010 Nov 1;9(21):4297-306.
 131. Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4147-53.
 132. Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 1986 Oct 15;261(29):13807-12.
 133. David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 2010 Jan 21;463(7279):364-8.
 134. Takenaka M, Noguchi T, Sadahiro S, et al. Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene. *European journal of biochemistry / FEBS* 1991 May 23;198(1):101-6.
 135. Yamada K, Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *The Biochemical journal* 1999 Jan 1;337 (Pt 1):1-11.
 136. Warburg OH. On the origin of cancer cells. *Science* 1956(123):309-14.
 137. Warburg OHW, F.; Negelein, E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927;8:519-30.
 138. Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 2008 Mar 13;452(7184):181-6.
 139. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008 Mar 13;452(7184):230-3.

140. Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 2011 Dec 2;334(6060):1278-83.
141. Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, et al. Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Science signaling* 2009;2(97):ra73.
142. Chaneton B, Gottlieb E. Rocking cell metabolism: revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer. *Trends Biochem Sci* 2012 Aug;37(8):309-16.
143. Bluemlein K, Gruning NM, Feichtinger RG, Lehrach H, Kofler B, Ralser M. No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget* 2011 May;2(5):393-400.
144. Lee J, Kim HK, Han YM, Kim J. Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(5):1043-54.
145. Hoshino A, Hirst JA, Fujii H. Regulation of cell proliferation by interleukin-3-induced nuclear translocation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 2007 Jun 15;282(24):17706-11.
146. Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell* 2012 Mar 9;45(5):598-609.
147. Stetak A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A. Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. *Cancer Res* 2007 Feb 15;67(4):1602-8.
148. Duan HF, Hu XW, Chen JL, et al. Antitumor activities of TEM8-Fc: an engineered antibody-like molecule targeting tumor endothelial marker 8. *Journal of the National Cancer Institute* 2007 Oct 17;99(20):1551-5.
149. Guo W, Zhang Y, Chen T, et al. Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011 Jan;137(1):65-72.
150. Yoo BC, Ku JL, Hong SH, et al. Decreased pyruvate kinase M2 activity linked to cisplatin resistance in human gastric carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2004 Feb 10;108(4):532-9.
151. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

152. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005 Jun;6(4):279-84.
153. Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997 Oct;18(11):2071-7.
154. Martinez-Balibrea E, Plasencia C, Gines A, et al. A proteomic approach links decreased pyruvate kinase M2 expression to oxaliplatin resistance in patients with colorectal cancer and in human cell lines. *Molecular cancer therapeutics* 2009 Apr;8(4):771-8.
155. Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2007 Jun 1;73(11):1715-26.
156. Mi H, Lazareva-Ulitsky B, Loo R, et al. The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res* 2005 Jan 1;33(Database issue):D284-8.
157. Thomas PD, Kejariwal A, Campbell MJ, et al. PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res* 2003 Jan 1;31(1):334-41.
158. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* 2011 Jan;39(Database issue):D561-8.
159. Chandra D, Choy G, Tang DG. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *J Biol Chem* 2007 Oct 26;282(43):31289-301.
160. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, et al. Hsp60 accelerates the maturation of procaspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J* 1999 Apr 15;18(8):2049-56.
161. Sakai A, Otani M, Miyamoto A, Yoshida H, Furuya E, Tanigawa N. Identification of phosphorylated serine-15 and -82 residues of HSPB1 in 5-fluorouracil-resistant colorectal cancer cells by proteomics. *J Proteomics* 2012 Jan 4;75(3):806-18.
162. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011 Jul;43(7):969-80.

163. Panasyuk G, Espeillac C, Chauvin C, et al. PPARgamma contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat Commun* 2012;3:672.
164. Schafer D, Hamm-Kunzelmann B, Brand K. Glucose regulates the promoter activity of aldolase A and pyruvate kinase M2 via dephosphorylation of Sp1. *FEBS letters* 1997 Nov 17;417(3):325-8.
165. Schafer D, Hamm-Kunzelmann B, Hermfisse U, Brand K. Differences in DNA-binding efficiency of Sp1 to aldolase and pyruvate kinase promoter correlate with altered redox states in resting and proliferating rat thymocytes. *FEBS Lett* 1996 Aug 5;391(1-2):35-8.
166. Zhou R, Vander Heiden MG, Rudin CM. Genotoxic exposure is associated with alterations in glucose uptake and metabolism. *Cancer Res* 2002 Jun 15;62(12):3515-20.
167. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 2010 Apr;22(2):263-8.
168. Fujie Y, Yamamoto H, Ngan CY, et al. Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. *Jpn J Clin Oncol* 2005 Aug;35(8):453-63.
169. Yang W, Xia Y, Ji H, et al. Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 2011 Dec 1;480(7375):118-22.
170. Luo W, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget* 2011 Jul;2(7):551-6.
171. Luo W, Hu H, Chang R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011 May 27;145(5):732-44.
172. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 2007 May 25;316(5828):1160-6.
173. Dastoor Z, Dreyer JL. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci* 2001 May;114(Pt 9):1643-53.
174. Ronai Z. Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int J Biochem* 1993 Jul;25(7):1073-6.

175. Shashidharan P, Chalmers-Redman RM, Carlile GW, et al. Nuclear translocation of GAPDH-GFP fusion protein during apoptosis. *Neuroreport* 1999 Apr 6;10(5):1149-53.
176. Shimada N, Shinagawa T, Ishii S. Modulation of M2-type pyruvate kinase activity by the cytoplasmic PML tumor suppressor protein. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2008 Mar;13(3):245-54.
177. Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 1990 Dec;10(12):6565-77.
178. Komlodi-Pasztor E, Trostel S, Sackett D, Poruchynsky M, Fojo T. Impaired p53 binding to importin: a novel mechanism of cytoplasmic sequestration identified in oxaliplatin-resistant cells. *Oncogene* 2009 Sep 3;28(35):3111-20.
179. Spoden GA, Morandell D, Eehalt D, et al. The SUMO-E3 ligase PIAS3 targets pyruvate kinase M2. *Journal of cellular biochemistry* 2009 May 15;107(2):293-302.
180. Croft DR, Sahai E, Mavria G, et al. Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis. *Cancer Res* 2004 Dec 15;64(24):8994-9001.
181. Martin M, Simon-Assmann P, Keding M, Mangeat P, Real FX, Fabre M. DCC regulates cell adhesion in human colon cancer derived HT-29 cells and associates with ezrin. *Eur J Cell Biol* 2006 Aug;85(8):769-83.
182. Rebillard A, Jouan-Lanhouet S, Jouan E, et al. Cisplatin-induced apoptosis involves a Fas-ROCK-ezrin-dependent actin remodelling in human colon cancer cells. *Eur J Cancer* 2010 May;46(8):1445-55.
183. Liu T, Daniels CK, Cao S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2012 Aug 29.
184. Krynetski EY, Krynetskaia NF, Bianchi ME, Evans WE. A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues. *Cancer Res* 2003 Jan 1;63(1):100-6.

185. Lv L, Li D, Zhao D, et al. Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol Cell* 2011 Jun 24;42(6):719-30.
186. Pei H, Li L, Fridley BL, et al. FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt. *Cancer Cell* 2009 Sep 8;16(3):259-66.
187. Cioffi DL, Hubler TR, Scammell JG. Organization and function of the FKBP52 and FKBP51 genes. *Curr Opin Pharmacol* 2011 Aug;11(4):308-13.
188. Cerwenka H. Tumor M2-pyruvate kinase and pancreatic cancer. *Pancreas* 2008 Aug;37(2):221-2; author reply 2.
189. Cerwenka H, Aigner R, Bacher H, et al. TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2), CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions. *Anticancer research* 1999 Jan-Feb;19(1B):849-51.
190. Hardt PD, Mazurek S, Toepler M, et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004 Aug 31;91(5):980-4.
191. Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, Schnell-Kretschmer H, Kloer HU. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer. *Anticancer research* 2000 Nov-Dec;20(6D):4965-8.
192. Hardt PD, Toepler M, Ngoumou B, Rupp J, Kloer HU. Measurement of fecal pyruvate kinase type M2 (tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls. *Anticancer research* 2003 Mar-Apr;23(2A):851-3.
193. Kaura B, Bagga R, Patel FD. Evaluation of the Pyruvate Kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2004 Jun;30(3):193-6.
194. Oremek GM, Teigelkamp S, Kramer W, Eigenbrodt E, Usadel KH. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma. *Anticancer research* 1999 Jul-Aug;19(4A):2599-601.
195. Roigas J, Deger S, Schroeder J, et al. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in metastatic renal cell carcinoma. *Urological research* 2003 Dec;31(6):358-62.
196. Roigas J, Schulze G, Raytarowski S, Jung K, Schnorr D, Loening SA. [Tumor M2 pyruvate kinase in renal cell carcinoma. Studies of plasma in patients]. *Der Urologe Ausg A* 2000 Nov;39(6):554-6.

197. Schneider J, Neu K, Grimm H, Velcovsky HG, Weisse G, Eigenbrodt E. Tumor M2-pyruvate kinase in lung cancer patients: immunohistochemical detection and disease monitoring. *Anticancer research* 2002 Jan-Feb;22(1A):311-8.
198. Schneider J, Neu K, Velcovsky HG, Morr H, Eigenbrodt E. Tumor M2-pyruvate kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study. *Cancer Lett* 2003 Apr 10;193(1):91-8.
199. Ventrucci M, Cipolla A, Racchini C, Casadei R, Simoni P, Gullo L. Tumor M2-pyruvate kinase, a new metabolic marker for pancreatic cancer. *Digestive diseases and sciences* 2004 Aug;49(7-8):1149-55.
200. Staib P, Hoffmann M, Schinkothe T. Plasma levels of tumor M2-pyruvate kinase should not be used as a tumor marker for hematological malignancies and solid tumors. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2006;44(1):28-31.
201. Hardt PD, Ewald N. Tumor M2 pyruvate kinase: a tumor marker and its clinical application in gastrointestinal malignancy. *Expert review of molecular diagnostics* 2008 Sep;8(5):579-85.
202. Fatela-Cantillo D, Fernandez-Suarez A, Moreno MA, Gutierrez JJ, Iglesias JM. Prognostic value of plasmatic tumor M2 pyruvate kinase and carcinoembryonic antigen in the survival of colorectal cancer patients. *Tumour Biol* 2012 Jun;33(3):825-32.
203. Meng W, Zhu HH, Xu ZF, et al. Serum M2-pyruvate kinase: A promising non-invasive biomarker for colorectal cancer mass screening. *World J Gastrointest Oncol* 2012 Jun 15;4(6):145-51.
204. Ewald N, Schaller M, Bayer M, et al. Fecal pyruvate kinase-M2 (tumor M2-PK) measurement: a new screening concept for colorectal cancer. *Anticancer research* 2007 Jul-Aug;27(4A):1949-52.
205. Li R, Liu J, Xue H, Huang G. Diagnostic value of fecal tumor M2-pyruvate kinase for CRC screening: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2012 Oct 15;131(8):1837-45.
206. Shastri YM, Loitsch S, Hoepffner N, et al. Comparison of an established simple office-based immunological FOBT with fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) for colorectal cancer screening: prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2008 Jun;103(6):1496-504.

207. Shastri YM, Stein J. Fecal tumor M2 pyruvate kinase is not a specific biomarker for colorectal cancer screening. *World journal of gastroenterology* : WJG 2007 May 21;13(19):2768-9.
208. Shastri YM, Stein JM. Faecal tumour pyruvate kinase M2: not a good marker for the detection of colorectal adenomas. *Br J Cancer* 2008 Oct 21;99(8):1366; author reply 7.

ANNEX

A proteomic approach links decreased pyruvate kinase M2 expression to oxaliplatin resistance in patients with colorectal cancer and in human cell lines

Eva Martínez-Balibrea,^{1,3} Carmen Plasencia,³ Alba Ginés,¹ Anna Martínez-Cardús,¹ Eva Musulén,² Rodrigo Aguilera,³ José Luis Manzano,¹ Nouri Neamati,³ and Albert Abad¹

¹Medical Oncology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut Català Oncologia and ²Department of Pathology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain; and ³Department of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Southern California, Los Angeles, California

Abstract

We aimed to gain further understanding of the molecular mechanisms involved in oxaliplatin resistance in colorectal cancer by using a proteomic approach. A 5-fold oxaliplatin-resistant cell line, HTOXAR3, was compared with its parental cell line, HT29, using two-dimensional PAGE. Mass spectrometry, Western blot, and real-time quantitative PCR confirmed the down-regulation of pyruvate kinase M2 (PK-M2) in HTOXAR3 cells. In a panel of eight colorectal cancer cell lines, we found a negative correlation between oxaliplatin resistance and PK-M2 mRNA levels (Spearman $r = -0.846$, $P = 0.008$). Oxaliplatin exposure in both HT29 and HTOXAR3 led to PK-M2 mRNA up-regulation. PK-M2 mRNA levels were measured by real-time quantitative PCR in 41 tumors treated with oxaliplatin/5-fluorouracil. Tumors with the lowest PK-M2 levels attained the lowest response rates (20% versus 64.5%, $P = 0.026$). High PK-M2 levels were associated with high p53 levels ($P = 0.032$). In conclusion, the data provided clearly link PK-M2 expression and oxaliplatin resistance mechanisms and further implicate PK-M2 as a

predictive marker of response in patients with oxaliplatin-treated colorectal cancer. [Mol Cancer Ther 2009;8(4): 771–8]

Introduction

Colorectal carcinoma remains the second most common cause of cancer death in developed countries. Oxaliplatin, a diaminecyclohexane platinum, has shown activity against colorectal cancer in both chemotherapy-naïve patients and patients whose disease has progressed on 5-fluorouracil (5FU)-based therapy. In fact, the addition of oxaliplatin to 5FU/folinic acid regimens has increased objective response rates to >40% in patients with colorectal cancer. Still, major obstacles in the therapeutic use of platinum analogues are intrinsic or acquired resistance (1). Recently, there has been an increase in the understanding of the factors involved in these phenomena. Resistance is a multifactorial process that may include alteration in transport (uptake and efflux), drug detoxification, DNA repair, tolerance to DNA damage, and apoptosis (2–4). In addition, there are still major gaps in our understanding of the relationships among factors contributing to platinum resistance and their application in the clinic.

Proteomics studies allow the characterization and identification of potentially all the proteins in a cell as well as protein isoforms, modifications, and interactions (5). This approach may provide a better understanding of the molecular mechanisms involved in platinum resistance. This understanding is of paramount importance in devising future strategies to circumvent oxaliplatin resistance with the aim of increasing response rate and decreasing severe toxicities. In the present study, we sought to gain further insight into the mechanisms underlying oxaliplatin resistance. We established an oxaliplatin-resistant human colon cancer cell line and used both parental and resistant cells in comparative proteomics studies. Among the different proteins identified, we focused our attention on the down-regulation of pyruvate kinase isoform M2 (PK-M2) in resistant cells because it has recently been associated with the activation of apoptotic processes after cellular stress induction (6). We evaluated the potential role of PK-M2, not only related to the emergence of the oxaliplatin-resistant phenotype in HT29 cells, but also with its involvement in the clinical response of patients with colorectal cancer to 5FU plus oxaliplatin as first-line chemotherapy.

Materials and Methods

Cell Lines

Human colorectal carcinoma cell lines LS411N, LS513, and SW48 were obtained from American Type Culture

Received 9/15/08; revised 12/18/08; accepted 1/26/09.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: Current address for C. Plasencia: Applied Research using Omic Sciences, S.L. (A05-B05), Parc Científic de Barcelona, Edifici Satèl·lit iit; Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain.

Current address for R. Aguilera: Applied Biosystems, 25 avenue de la Baltique, 91943 Courtaboeuf, France.

Requests for reprints: Albert Abad, Medical Oncology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut Català Oncologia, Badalona 08916, Barcelona, Spain. Phone: 34-497-8925; Fax: 34-497-8950. E-mail: aabade@seom.org and Nouri Neamati, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Southern California, Los Angeles, CA 90033. E-mail: neamati@usc.edu

Copyright © 2009 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0882

Collection. SW480, HCT116, LS174T, SW1417, and SW1116 cell lines were kindly provided by Dr. Francesc X. Real. Human tumor-derived colorectal cancer HT29 cells (American Type Culture Collection) were used as the parental cells to obtain the oxaliplatin-resistant subline HTOXAR3. HTOXAR3 was established as a result of continuous exposure to increasing concentrations of oxaliplatin as described previously (7). Cell lines were grown as monolayers in DMEM (HT29 and HTOXAR3; Invitrogen) or RPMI (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen), 400 units/mL of penicillin, 40 µg/mL of gentamicin, and 2 mmol/L of L-glutamine (Sigma) and cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were routinely checked for *Mycoplasma* contamination using a PCR-based assay (Stratagene). Resistant cells were stably resistant and maintained in oxaliplatin-free medium over a month previous to all experiments.

Drugs

Oxaliplatin, cisplatin, and SN-38 were prepared in water (10 mmol/L), physiologic serum (3 mg/mL), or DMSO (10 mmol/L), respectively, as stock solutions, and stored at -20°C. Further dilutions of each drug were made in culture medium to final concentrations before use.

Cell Viability Assay

The cytotoxicity of all drugs was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (8). Cancer cells were seeded at a density of 2,000 cells per well in 96-well microtiter plates and allowed to attach. Cells were treated with continuous exposure to a corresponding drug for 24 h. Subsequently, the drug was removed and fresh medium was added to each well. Cells were allowed to grow for 72 h. MTT (Roche Diagnostics) was then added and doses for each fraction of survival (ranging from 10% to 90% of cell viability) were determined in each cell line by the median-effect line method. The data reported represent the mean ± SD of a minimum of three independent experiments done with eight wells at each drug concentration tested.

Patient Samples

Eligible patients were older than 18 years with histologically confirmed metastatic colorectal adenocarcinoma; performance status ≥2; and adequate bone marrow, renal, and hepatic functions. Previous cytotoxic chemotherapy was not permitted except for adjuvant treatment completed 12 mo before study enrollment. Response assessments were obtained according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors standards. Patients received oxaliplatin biweekly at

85 mg/m², i.v., 2 h, plus 48 h weekly continuous infusion of 5FU at 2,250 mg/m² (TTD schedule) with a maximum of 12 cycles. Treatment was continued until progressive disease, unacceptable toxicity, or consent withdrawal. The study protocol was approved by the local ethics committee and all subjects gave informed consent before inclusion in the study.

Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analysis

Cells were harvested and allowed to reach ~60% confluence in culture flasks. They were then collected, washed in PBS, and pelleted. Proteins were extracted using ReadyPrep Sequential extraction kit (Bio-Rad) according to the instructions of the manufacturer. Two fractions of different solubilities were obtained. The protein content of each fraction was determined using the Bradford method. Protein samples were stored at -80°C until used. A total of 150 µg of proteins from each fraction were suspended in 0.3 mL of rehydration buffer [8 mol/L urea, 2% (w/v) CHAPS, 50 mmol/L DTT, 0.2% (w/v) Bio-Lyte 3/10 ampholyte, and traces of bromophenol blue] and loaded over dry IPG strips (17 cm, pH 3–10; Bio-Rad). The rehydration was done at 50 V, 20°C, for 12 to 16 h in a focusing tray (Bio-Rad). The focusing conditions were as follows: 10,000 V end voltage, 40,000 to 60,000 V/h (rapid ramp), 20°C. The focused strips were equilibrated as follows: 10 min in equilibration buffer I [6 mol/L urea, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl (pH 8.8), 2% (w/v) DTT, and 20% glycerol] followed by a 10-min incubation in equilibration buffer II [6 mol/L urea, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl (pH 8.8), 2.5% (w/v) iodoacetamide, and 20% glycerol]. For the second-dimension gel electrophoresis, the equilibrated strips were aligned on the top of a 12% polyacrylamide gel and sealed with 0.5% low-melting agarose. Protein separation was done at 16 mA/gel for 1 h followed by 24 mA/gel for 5 to 6 h. At the end of the run, gels were removed, washed in distilled water, and stained either with the SYPRO-Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad) or with silver stain (Bio-Rad) according to the protocols provided by the manufacturer. The gels were scanned using Typhoon 8610 (GE Healthcare) and the resulting images were processed using PDQuest 7.0 (Bio-Rad) to identify protein alterations in resistant/parental cell pairs. At least three independent experiments were done.

Protein Identification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Protein spots from SDS-PAGE were excised using biopsy punches (Acuderm). Silver-stained bands were destained prior to an in-gel tryptic digest that was carried out using trypsin, which has been reductively methylated to reduce

Table 1 Antibodies, suppliers, dilutions, and techniques used for immunohistochemistry and variables evaluated

Antibody	Source	Dilution	Technique	Variables evaluated
Anti-human p53 protein (clone DO7), mouse monoclonal antibody	Novocastra	1:500	Dako Autostainer	Percentage
Anti-human bcl-2 oncoprotein, mouse monoclonal antibody	Dako	1:350	Ventana, Nexes	Immunoreactivity vs negative
Anti-human ki-67 (clone MIB-1), mouse monoclonal antibody	Dako	1:600	Dako Autostainer	Percentage

Table 2 Cytotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and SN-38 in HT29 and HTOXAR3

Cell line	OXA ($\mu\text{mol/L}$)		CDDP ($\mu\text{mol/L}$)		SN-38 (nmol/L)		5FU ($\mu\text{mol/L}$)	
	IC ₅₀ \pm SD	RI	IC ₅₀ \pm SD	RI	IC ₅₀ \pm SD	RI	IC ₅₀ \pm SD	RI
HT29	6.96 \pm 0.85	4.71	4.70 \pm 0.6	0.6	9.68 \pm 0.07	1.07	13.02 \pm 0.4	0.87
HTOXAR3	32.78 \pm 5.32		2.70 \pm 0.23		10.31 \pm 0.52		12.59 \pm 2.09	

Abbreviations: OXA, oxaliplatin; CDDP, cisplatin; RI, resistance index (IC₅₀ resistant cells/IC₅₀ sensitive cells).

autolysis (Promega). Prior to digestion, samples were reduced with DTT and alkylated with iodoacetamide. The digestion reaction was carried out overnight at 37°C. Chromatographic separation of the tryptic peptides was achieved using a ThermoFinnigan Surveyor MS-Pump in conjunction with a BioBasic-18 100 mm \times 0.18 mm reverse phase capillary column (ThermoFinnigan). Mass analysis was done using a ThermoFinnigan LCQ Deca XP Plus ion trap mass spectrometer equipped with a nanospray ion source (ThermoFinnigan). The columns were equilibrated for 5 min at 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ with 95% solution A (0.1% acetic acid in water) and 5% solution B (0.1% formic acid in acetonitrile) prior to sample injection. Mass spectra were acquired in the m/z 400 to 1,800 range. Protein identification was done using the tandem mass spectrometry search software Mascot (Matrix Science) with confirmatory or complementary analyses using TurboSequest (Bioworks Browser v. 3.2). The National Center for Biotechnology Information human genome database server complemented with the National Center for Biotechnology Information nonredundant protein database were used for searching.

Western Blotting

Cells were homogenized in NP40 buffer [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 137 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 1% NP40, and 2 mmol/L EDTA] containing protease inhibitors (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin, and pepstatin as well as 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aprotinin). Protein concentration homogenates were estimated by using the BCA kit (Pierce) with bovine serum albumin as standard. Ten micrograms of protein were loaded and subjected to SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore), which were then blocked by incubating for 2 h at room temperature in 0.1% Tween 20-TBS containing 10% nonfat dry milk. Membranes were then incubated for 1 h at room temperature in continuous agitation with diluted primary antibodies against either PK-M2 (Abcam) or actin (Sigma). After washing in Tween 20-TBS, membranes were incubated with diluted horseradish peroxidase-containing secondary antibodies (Cell Signaling) for 1 h at room temperature. Membranes were washed and incubated with Immobilon Western chemiluminescence reagent (Millipore) for the appropriate times and exposed to film (Fujifilm, Super RX). Protein band densities were calculated by using ImageJ software v1.37 (NIH).⁴

⁴ <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Quantitative Real-time PCR

We examined *PKM2* gene expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from 41 primary colorectal adenocarcinomas following a method, optimized for mRNA quantification in these kinds of samples, that has previously been described (9). The primer and probe sets for actin were designed using Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems) and were as follows: forward 5'-TGAGCGCGGCTACAGCTT-3', reverse 5'-TCCTTAATGT-CACGCACGATTT-3', probe 5'-ACCACCACGGCC-GAGCGG-3'. Quantification of gene expression was done using the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primers and probes for PK-M2 mRNA expression analysis were purchased predesigned from Applied Biosystems (assay no. Hs00762869_s1). The PCR product size generated with these primers was 62 bp. Relative gene expression quantification was calculated according to the comparative Ct method as described elsewhere and using β -actin as an endogenous control and commercial RNA controls (Stratagene) as calibrators. In all experiments, only triplicates with a Ct value of 0.20 SD were accepted. In addition, for each sample analyzed, a retrotranscriptase minus control was run in the same plate to assure the absence of genomic DNA contamination. Gene expression analysis was also done on RNA from cells. Total RNA was obtained by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and retrotranscribed as described above.

Tissue Microarray

The H&E-stained slides of all tumors were reviewed to identify the most well-preserved areas. Tissues corresponding to these areas were randomly sampled from paraffin blocks, with no special preference for the different parts of the tumor (e.g., superficial zone versus infiltrating border). Three cylindrical cores, each measuring 0.6 mm in diameter, were obtained from every donor block using a tissue microarray workstation MTA-1 (Beecher Instruments).

Antibodies and Immunohistochemical Studies

Five-micrometer-thick sections were deparaffinized, hydrated, immersed in buffered citrate, and autoclaved. Afterwards, sections were incubated for 30 min in rabbit serum. Incubations with primary antibodies (Table 1) were carried out for 22 h at room temperature. Slides were washed and incubated with biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin antibodies at a 1:700 dilution and then incubated in PBS/6% hydrogen peroxide for 15 min at room temperature before the addition of an avidin-biotin peroxidase complex (Dakopatts). The

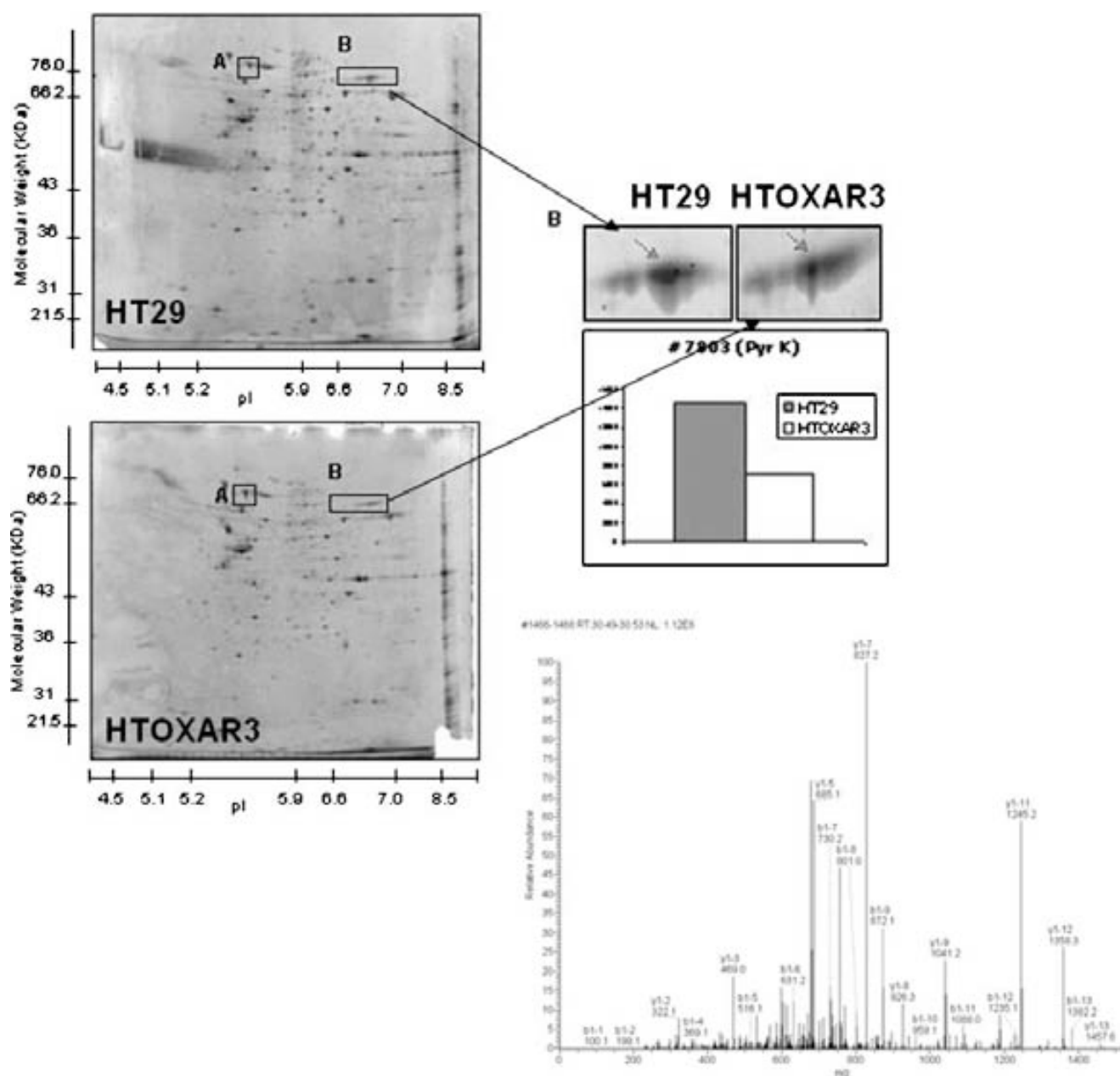


Figure 1 PK-M2 is differentially expressed in oxaliplatin-resistant human colorectal cancer HTOXAR3 cell lines. Two-dimensional gels of protein extracts from HT29 and its oxaliplatin-resistant derivative cell line as well as enlarged partial two-dimensional images showing the different protein patterns in oxaliplatin-resistant cell extracts. Liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the protein spot differentially expressed in HTOXAR3 oxaliplatin-resistant cells (*bottom*).

chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (Serva) was applied, and counterstaining was done with Harris hematoxylin. A nonimmune mouse serum was used as a negative control. Quantification of the results was adapted to the staining patterns of each antibody. For p53 and ki-67, the percentage of positive cells was evaluated as follows: 0, <10%; 1, 10% to 25%; 2, 26% to 50%; or 3, >50%. For bcl-2, tumors were evaluated as positive or negative.

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS software v11.5 (SPSS, Inc.). Contingency tables, χ^2 , and Fisher's exact tests were used to correlate response and either PK-M2 mRNA expression or clinical variables. The immunohistochemical expression of each marker was assessed in the tissue microarray (three cylinders for each case) and the results were averaged. Differences between groups were considered to be statistically significant at $P < 0.05$. Fisher's exact

test was used to determine the statistical significance of differences between proportions in binary transformed variables (the latter were those variables for which a statistically significant difference or trend was found; they were subsequently recorded). A logistic regression model was established for analysis of the response to chemotherapy as a dummy variable adjusted for PK-M2, p53, bcl-2, and ki-67 as categorical covariates. Covariates of the final model were defined using a block entry methodology. The Spearman test and its associated r coefficient were used to assess the correlation between PK-M2 levels and oxaliplatin cytotoxicity in a panel of human colorectal cancer cell lines. The differences were considered statistically significant when two-sided P values were less than 0.05.

Results

The isolation of cells resistant to oxaliplatin was previously described (7). Briefly, the isolation was started with an initial continuous exposure of HT29 cells to 2 $\mu\text{mol/L}$ of oxaliplatin. After a period of high mortality, 20% to 30% of cells survived (data not shown). In the following passages, the cell number increased in the presence of oxaliplatin until cells showed doubling times (26–28 hours) equivalent to untreated parental cells (22–24 hours). The growth curve stabilized and no more net mortality occurred after confluence. A similar sequence of events followed with increasing con-

centrations. The maximum concentration reached was 14 $\mu\text{mol/L}$ of oxaliplatin. The IC_{50} for oxaliplatin was almost 5-fold higher in resistant cells compared with parental cells. Moreover, HTOXAR3 did not exhibit cross-resistance to 5FU, cisplatin, or SN-38 (Table 2). The oxaliplatin-resistant sublines were developed over a 10-month period. These cells were used for the *in vitro* study.

In the pH range 3 to 10, conventional two-dimensional PAGE of HT29 and HTOXAR3 yielded $\sim 1,000$ spots for each cell line per fraction (soluble and insoluble). Representative gels and electropherogram are shown in Fig. 1. Using PDQuest software, spots corresponding to proteins overexpressed or down-regulated by 4-fold in the resistant cells compared with sensitive cells were identified. Surprisingly, only a few spots were abundant enough at baseline to be efficiently and unequivocally detected after mass spectrometry and database searches. A SWISS-PROT database search identified one of these proteins as PK-M2 isozyme (molecular weight, 60 kDa; pI 7; SWISS-PROT no. P14786). The coverage percentage of the polypeptidic sequence was $>30\%$, and at least 10 peptides were used for identification in the protein database. The PK-M2 protein was identified in the insoluble fraction as differentially down-regulated in HTOXAR3 cells (Fig. 1). PK-M2 expression was measured in HT29 and HTOXAR3 cells by Western blot analysis. When normalized to actin levels, PK-M2 protein expression was found to be significantly decreased in HTOXAR3,

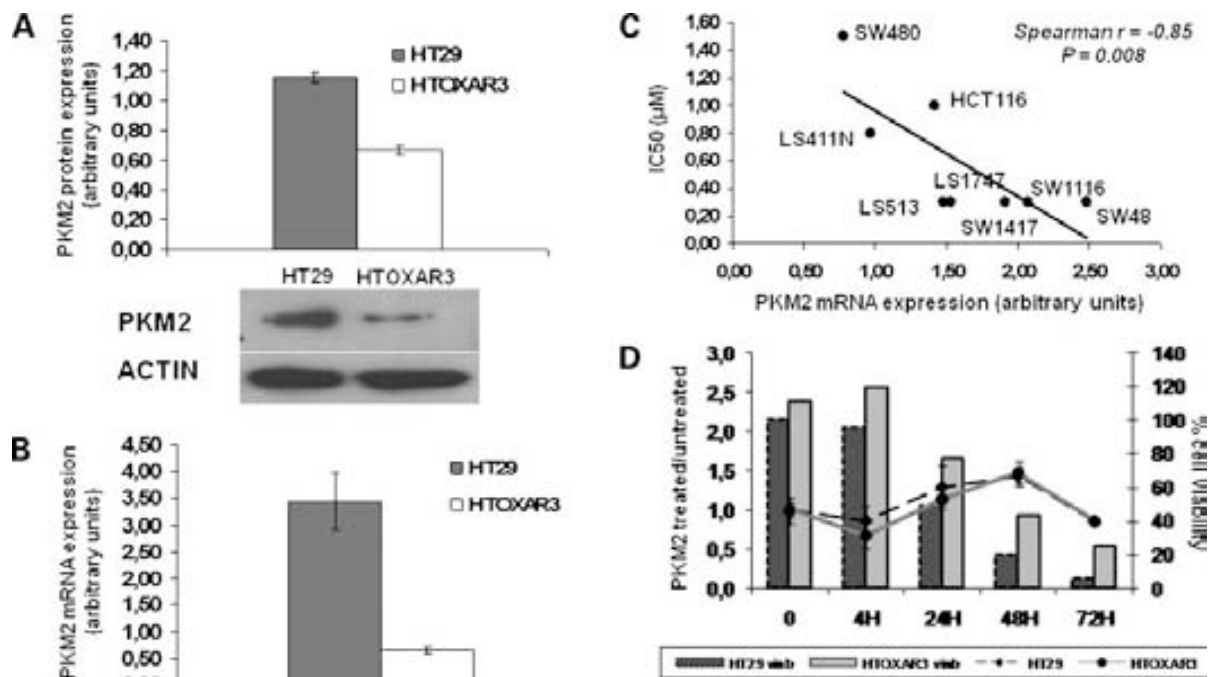


Figure 2 **A**, basal PK-M2 protein levels measured by Western blotting in HT29 and HTOXAR3 cells. Actin was used as an endogenous control. **B**, basal mRNA PK-M2 levels measured by real-time quantitative PCR in HT29 and HTOXAR3 cells. **C**, correlation between PK-M2 mRNA levels and oxaliplatin sensitivity in a panel of eight colorectal cancer cell lines. As HT29 and HTOXAR3 cells exhibited outlying IC_{50} values compared with the rest of the cell lines, we did not include them in the analysis. **D**, PK-M2 mRNA levels (treated/untreated ratio) in response to oxaliplatin-induced damage in HT29 and HTOXAR3 cells. Cells were harvested and treated or untreated with 15 $\mu\text{mol/L}$ of oxaliplatin from 4 to 72 h, the times at which PK-M2 mRNA levels (points) and percentage of cell viability (columns) were measured.

Table 3 Patients' profiles according to PK-M2 mRNA expression levels

	PK-M2 mRNA expression		P
	<0.49	>0.49	
Age, median (range)	59.5 (45–74)	67 (46–81)	
Tumor location			
Colon	6 (60%)	22 (71%)	0.2*
Rectum	4 (40%)	9 (29%)	
Gender			
Male	6 (60%)	17 (55%)	1 [†]
Female	4 (40%)	14 (45%)	
Previous adjuvant CT			
5FU	3 (30%)	9 (29%)	1 [†]
No	7 (70%)	22 (71%)	
Metastatic site			
Liver	7 (70%)	19 (61%)	0.85*
Lung	1 (10%)	3 (10%)	
Other	2 (20%)	9 (29%)	
OR			
Response (CR + PR)	2 (20%)	20 (65%)	0.026 [†]
No response (SD + PD)	8 (80%)	11 (35%)	

Abbreviations: CT, chemotherapy; OR, overall response; CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease.

* χ^2 test *P* value.

[†]Fisher's exact test *P* value.

thus confirming the results found by proteomic analysis (Fig. 2A).

We further investigated PK-M2 mRNA levels by real-time quantitative PCR. Down-regulation at the transcriptional level was also confirmed in HTOXAR3 cells (Fig. 2B). Indeed, differences between sensitive and resistant cells were higher at the transcriptional level (5-fold) than at the protein level. Moreover, a significant negative correlation between PK-M2 mRNA levels and oxaliplatin sensitivity (Spearman $r = -0.846$, $P = 0.008$) was found in a panel of eight colorectal cancer cell lines (Fig. 2C). To understand the effect of oxaliplatin on PKM2 gene expression levels, sensitive and resistant cells were treated with 15 $\mu\text{mol/L}$ of oxaliplatin, which corresponds to the IC_{70} and IC_{30} for HT29 and HTOXAR3, respectively, in a 24-hour oxaliplatin exposure experiment. Cells were seeded and left to attach for 24 hours. Then, they were treated with 15 $\mu\text{mol/L}$ of oxaliplatin for 24 hours; the drug-containing medium was removed and changed to a fresh medium. Cells were collected at 0, 4, 24, 48, and 72 hours posttreatment, and PK-M2 mRNA levels, as well as cell viability, were measured. As shown in Fig. 2D, a slight up-regulation of PK-M2 mRNA levels was observed after 4 hours of exposure in both sensitive and resistant cells, indicating a possible role of PK-M2 in oxaliplatin response. After 4 hours of treatment, a decrease in cell viability was also observed. Although PK-M2 basal levels were lower at all times in HTOXAR3 cells (data not shown), the same behavior was observed in both sensitive/resistant pairs. To translate these results into the clinical setting, we studied PK-M2 mRNA expression in 41 colorectal adenocarcinomas from patients

who had been treated with oxaliplatin plus 5FU as first-line chemotherapy. PK-M2 protein analysis through immunohistochemistry was difficult to evaluate because its expression was highly abundant in all tumor samples (data not shown). Because we found a correlation between protein and mRNA expression patterns in cell lines, we decided to assess PK-M2 expression at the transcriptional level in tumors. To provide an easily interpretable evaluation of the effect of PK-M2 mRNA expression, gene expression values were divided into quartiles. PK-M2 was detected in all tumors, with values relative to the β -actin internal control ranging 8.36-fold, from 0.25 to 2.09, with a median of 0.67. No differences in clinical features were observed according to PK-M2 mRNA expression levels, but we observed that patients in the bottom quartile (PK-M2 expression < 0.49) had statistically significant lower response rates (Table 3). We chose to validate our results by analyzing three widely used, tumor-associated markers (bcl-2, p53, and ki-67) in a tissue microarray by immunohistochemistry and correlating them with response to chemotherapy as well as with PK-M2 expression. P53 is an important checkpoint of cell cycle regulation that, in part, controls events leading to cell cycle arrest and apoptosis. In contrast, bcl-2 participates in cell cycle regulation, displaying antiapoptotic activity. Ki-67 is an important marker of cell proliferation. As shown in Table 4, 90% of tumors with the lowest PK-M2 mRNA expression (bottom quartile) overexpressed p53 (>25% of cells positive), whereas in the remaining tumors, the percentage showing p53 expression only reached 50% ($P = 0.032$). We did not find any association between bcl-2 or ki-67 protein expression and PK-M2 mRNA levels or clinical features. No association between either of the markers and clinical response was observed (Table 4). In addition, a logistic regression model, including p53, bcl-2, ki-67, and PK-M2 expression as covariates, was established to evaluate the effect of these markers in response to chemotherapy (dependent variable). As shown in Table 5, low PK-M2 expression level was an independent risk factor for no response ($P = 0.015$; odds ratio, 11.09; 95% confidence interval, 1.6–76.73).

Discussion

Oxaliplatin is one of the standard drugs used in colorectal cancer treatment. It is administered in combination with fluoropyrimidines (5FU or capecitabine) in the adjuvant and metastatic setting, and its introduction has achieved response rates over 40% of patients (1). However, typical tumor resistance processes are the main reasons for treatment failure (2). Thus, it is of paramount importance to understand these resistance mechanisms to avoid unnecessary toxicities and increase the response rates. Although several studies have focused on platinum resistance, the majority of them are centered on cisplatin (2) and, in consequence, the mechanisms underlying oxaliplatin resistance remain poorly understood. In the present study, we used a comparative proteomics approach comparing sensitive and oxaliplatin-resistant colorectal cancer cell lines to identify

proteins associated with drug resistance. One such protein was PK-M2, which showed (a) a decrease in protein and mRNA levels in HTOXR3 cells, (b) an involvement in oxaliplatin response in sensitive and oxaliplatin-resistant cells, and (c) an association with clinical response to oxaliplatin plus 5FU in patients with colorectal cancer. Also, it is worth mentioning that this is one of the few studies in which pre-clinical results are linked to clinical outcomes.

Pyruvate kinase is a key enzyme in the process of glycolysis, converting phosphoenolpyruvate to pyruvate accompanied by ADP to ATP conversion. In mammals, pyruvate kinase exists as four isozymes designated M1, M2, L, and R. These isoforms are differentially expressed in different cell types (10, 11). The M2 type (PK-M2) is predominantly expressed in the fetus, in neoplastic tissues, and in adult stem cells. It can exist as tetrameric or dimeric forms, although the latter is the predominant isoform in tumors. The dimeric form is characterized by a low phosphoenolpyruvate affinity and, indeed, at physiologic phosphoenolpyruvate concentrations, the dimeric form is nearly inactive (11). Besides its role in glycolysis, other functions have been reported for PK-M2. For example, it can influence microtubule stability and interact with phospholipids (12). Recently, it has been reported that, like other glycolytic enzymes (13–16), nuclear translocation of PK-M2 is sufficient and necessary for the induction of apoptosis after treatment with somatostatin analogues or DNA-damaging agents such as H₂O₂ or UV irradiation, and that its kinase activity is not required for this purpose (6). As oxaliplatin is a DNA-damaging agent, similar mechanisms are probably occurring after exposure to this drug. Hoshino and colleagues also showed a role for PK-M2 in cell proliferation regulation via interleukin-3-induced nuclear translocation (17). We report that oxaliplatin-resistant cells had lower basal protein PK-M2 and mRNA levels compared with the parental HT29 cell line. Previous work showed that acquired resistance to cisplatin in gastric carcinoma cell lines is associated with a decrease in PK-M2 levels (18). HTOXR3 cells were not cross-resistant to cisplatin although the down-regulation in PK-M2 observed in our oxaliplatin-resistant cells may not be sufficient to induce resistance to cisplatin. To our knowledge, this is the first report linking acquired resistance to oxaliplatin with PK-M2 protein and mRNA levels in colo-

rectal cancer. The decreased PK-M2 levels found in resistant cells could be important to avoiding programmed cell death after oxaliplatin exposure. It is well known that adequate ATP levels are necessary for the initiation and progression of apoptosis (19, 20). Therefore, the decreased levels of proteins involved in glycolytic generation of ATP may play a role in the protection of HTOXR3 from the activation of apoptotic pathways in response to oxaliplatin treatment. It is worth mentioning that α -enolase, another glycolytic enzyme, was also found to be down-regulated in HTOXR3 cells (data not shown). On the other hand, nuclear translocation of PK-M2 is sufficient to induce cell death that is caspase independent, isoform specific, and independent of its enzymatic activity (6). Therefore, down-regulation of PK-M2 in HTOXR3 indicates that this is a mechanism that may impart protection from oxaliplatin-induced cell death. Similarly, HEK293 cells stably overexpressing PK-M2 showed an increased sensitivity to TT-232 (a somatostatin analogue) when compared with HEK293 cells (6). We also report a negative correlation between PK-M2 mRNA levels and oxaliplatin IC₅₀ in a panel of eight colorectal cancer cell lines. We observed an increase in PK-M2 mRNA levels after exposure to 15 μ mol/L of oxaliplatin in both sensitive and resistant cells, possibly indicating a positive transcriptional regulation of PK-M2 as a consequence of oxaliplatin-induced DNA damage. However, the maintenance of PK-M2 up-regulation in the resistant cell line in the presence of oxaliplatin somehow corroborates that a decrease in PK-M2 levels is enough to affect its apoptotic capacity. Our results are in line with previous studies in the literature demonstrating that the silenced expression of the *PKM2* gene has a direct involvement in cisplatin resistance (18). Further studies including PK-M2 overexpression and/or silencing in these cell lines and their correlation with response to oxaliplatin could further clarify this point. Our study, for the first time, shows the prognostic value of PK-M2 expression as a marker of response to oxaliplatin-based therapy. It is important to note that 80% of the patients whose primary tumors had lower PK-M2 mRNA basal levels did not respond to first-line chemotherapy treatment with oxaliplatin/5FU regimen. Taking into account that our oxaliplatin-resistant cells did not exhibit cross-resistance to 5FU, PK-M2 could be considered as a predictive

Table 4 Association of p53, ki-67, and bcl-2 protein expression with PK-M2 mRNA levels and response to therapy

	Bcl-2		<i>P</i>	p53			Ki-67		
	Present	Absent		<50%	>50%	<i>P</i>	<50%	>50%	<i>P</i>
PK-M2									
<0.49	4 (40%)	6 (60%)	1*	1 (10%)	9 (90%)	0.032*	1 (10%)	9 (90%)	1*
>0.49	13 (42%)	18 (58%)		15 (50%)	15 (50%)		4 (13%)	27 (87%)	
OR									
R	8 (47%)	14 (58%)	0.54*	10 (62.5%)	12 (50%)	0.54 [†]	4 (80%)	18 (50%)	0.35 [†]
NR	9 (53%)	10 (42%)		6 (37.5%)	12 (50%)		1 (20%)	18 (50%)	

Abbreviations: OR, overall response; R, response; NR, no response.

*Fisher's exact test-associated *P* value.

[†] χ^2 test-associated *P* value.

Table 5 Logistic regression model for response to chemotherapy

Marker	OR (95% CI)	P
PK-M2 >0.49	11.09 (1.6–76.72)	0.015
P53 <50%	1.65 (0.34–7.99)	0.53
Ki-67 <50%	0.2 (0.013–3.23)	0.26
Bcl-2 negative	0.52 (0.12–2.22)	0.38

Abbreviations: OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

factor for oxaliplatin-based treatment. In these patients, high p53 levels were associated with low levels of PK-M2. Although these two factors would have a negative additive effect on response, high p53 levels did not predict for a worse response in our patient cohort. Indeed, in a logistic regression model, only PK-M2 levels were identified to be an independent risk factor. Therefore, our results agree with those showing that p53 is not a useful marker for monitoring chemotherapy response in colorectal cancer (21). On the other hand, no association was found with bcl-2, which is in accordance with Steták et al., who reported a PK-M2–induced bcl-2–independent cell death (6).

Although caution is needed when interpreting these results due to the small number of patients evaluated, our data suggest that the molecular profile of the primary tumor could be used as a marker for clinical outcome in patients with colon adenocarcinomas treated with oxaliplatin plus 5FU. It is important to note that drug resistance is a multifactorial process and that other proteins were also found to be altered in HTOXAR3 cells. Even so, to our knowledge, this is the first translational study correlating PK-M2 expression and response to oxaliplatin-based chemotherapy. In the light of recent results demonstrating that the M2 isoform of pyruvate kinase protein is critical for rapid tumor growth (22), and necessary for aerobic glycolysis and tumorigenesis (23), further studies are warranted to elucidate the molecular mechanisms underlying PK-M2 expression in oxaliplatin response and resistance.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

- Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:573–84.
- Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9–23.
- Martinez-Balibrea E, Abad A, Aranda E, et al. Pharmacogenetic ap-

proach for capecitabine or 5-fluorouracil selection to be combined with oxaliplatin as first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2008;44:1229–37.

4. Martinez-Cardús A, Martinez-Balibrea E, Bandrés E, et al. Pharmacogenomic approach for the identification of novel determinants of resistance to oxaliplatin in colon cancer. *Mol Cancer* 2009;8:194–202.

5. Plebani M. Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? *Clin Chim Acta* 2005;357:113–22.

6. Steták A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A. Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. *Cancer Res* 2007;67:1602–8.

7. Plasencia C, Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardús A, Quinn DI, Abad A, Neamati N. Expression analysis of genes involved in oxaliplatin response and development of oxaliplatin-resistant HT29 colon cancer cells. *Int J Oncol* 2006;29:225–35.

8. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988;48:589–601.

9. Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004;13:2443–9.

10. Tanaka T, Harano Y, Sue F, Morimura H. Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. *J Biochem (Tokyo)* 1967;62:71–91.

11. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 2005;15:300–8.

12. Vertessy BG, Bankfalvi D, Kovacs J, Low P, Lehotzky A, Ovadi J. Pyruvate kinase as a microtubule destabilizing factor *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:430–5.

13. Dastoor Z, Dreyer JL. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci* 2001;114:1643–53.

14. Sawa A, Khan AA, Hester LD, Snyder SH. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11669–74.

15. Ronai Z. Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int J Biochem* 1993;25:1073–6.

16. Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 2007;26:2606–20.

17. Hoshino A, Hirst JA, Fujii H. Regulation of cell proliferation by interleukin-3-induced nuclear translocation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 2007;282:17706–11.

18. Yoo BC, Ku JL, Hong SH, et al. Decreased pyruvate kinase M2 activity linked to cisplatin resistance in human gastric carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2004;108:532–9.

19. Nicotera P, Leist M. Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells. *Cell Death Differ* 1997;4:435–42.

20. Nicotera P, Leist M. Mitochondrial signals and energy requirement in cell death. *Cell Death Differ* 1997;4:516.

21. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007;43:1348–60.

22. Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 2008;452:181–6.

23. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008;452:230–3.

