

# *Implicación de LKB1 en la patogénesis y progresión del cáncer de próstata*

Memoria del trabajo experimental para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, correspondiente al Programa de Doctorado de Biología Molecular y Biomedicina de la Universidad del País Vasco. Este trabajo ha sido llevado a cabo por Patricia Zúñiga García en el Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (CIC bioGUNE) bajo la dirección de Dr. Arkaitz Carracedo

**Patricia Zúñiga García**

**2016**



# *Más libros, más libres*

*Enrique Tierno Galván*

*A mis abus, a Ama y Aita, a Ra y B...*

*Por l@s que luchan, por l@s que sueñan...*



## ABREVIATURAS

%: Porcentaje	ECAR: Extracellular Acidification Rate
µg: Microgramo	EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition
µl: Microlitro	EPAS1: Endothelial PAS domain protein 1
µm: Micra	ERG: ETS-Related Gen
♀: Hembra	ESCC: Epithelial Squamous Cell Carcinoma
♂: Macho	Esq: Esquema
17-AAG: 17-N-AllylAmino demethoxyGeldanamycin	etc: Etcétera
17-DMAG: DimethylaminoethylAmino demethoxyGeldanamycin	ETS: Erythroblast Transformation Specific
2DG: 2-desoxi-D-Glucosa	FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting
<sup>3</sup> H: Tritio	FC: Fold Change
ADC: Adenocarcinoma	g: g, unidad de centrifugación
AICAR: 5-Aminimidazole CarboxamideRibonucleotide	GAPDH: GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase
AMP: Adenosine MonoPhosphate	GEO: Gene Expression Omnibus
AMPK: AMP-activated Protein Kinase	GO: Gene Ontology
AMPK-RK: AMPK-Related Kinases	GOCC: Cellular Component Ontology
ANOVA: ANalysis Of VAriance	GOMF: Molecular Function Ontology
AP: Anterior Prostate	GOPB: Biological Process Ontology
AR: Androgen Receptor	HCC: HepatoCellular Carcinoma
ARR2: Androgen Receptor Regulator	HGPIN: High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia
ATCC: American Type Culture Collection	Hr: Hora
ATP: Adenosine TriPhosphate	HSP90: Heat-Shock Protein 90
BCA: BiCinchonini Acid	Hyp: Hypomorphic
BPH: Bening Prostatic Hyperplasia	IARC: International Agency for Research on Cancer
BrdU: 5-BRomo-2-DesoxiUridina	IC <sub>50</sub> : Inhibitory Concentration 50
BRSK: BRain Specific Kinase	IFN: Interferón
BSL2: BioSafety Level 2	IRF: Interferon Regulated transcription Factor
CAMKKβ: CALcium/calModulin-dependent protein Kinase Kinase 2	IkB: Inhibidor κB
CaP: Cáncer de Próstata	JNK: c-Jun N-terminal Kinase
CD24: Cluster of Differentiation 24	Kb: Kilobase
CK5: Cytokeratin 5	KD: Kinase Dead
Ct: Threshold Cycle	KDa: KiloDalton
DLP: DorsoLateral Prostate	
DNA: DeoxyriboNucleic Acid	
DNA-PK: DNA Protein Kinase	

KO: Knock-Out  
LGPIN: Low-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia  
LKB1: Liver Kinase B1  
LN: Linf Node  
LOH: Loss of heterozygosity  
M: Molar  
MANOVA: Multivariant ANalysis Of VAriance  
MAP: Microtubule Associated Protein  
MARK: Microtubule Associated Protein Kinase  
mg: Miligramo  
min: Minuto  
ml: Mililitro  
MLC: Miosin Light Chain  
mm: Milímetro  
mM: Milimolar  
MO25: MOuse protein 25  
mRNA: messenger RNA  
MsigDB: Molecular Signature Database  
mTORC1: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1  
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
NCBI: National Center for Biotechnology Information  
NFκB: Nuclear Factor κB  
NGF: Nerve Growth Factor  
nm: nanómetro  
nM: nanomolar  
NSCLC: Non Small Cell Lung Cancer  
NUAK: Novel Kinase  
°C: Grados centígrados  
OCR: Oxigen Comsumtion Rate  
OCT1: Organic Cationic Transporter  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
p.e: Por ejemplo  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
PCR: Polimerase Chain Reaction  
PHTS: PTEN Hamartoma Tumoral Syndrome  
PI3K: Phosphoinositol 3 Phosphate

PIN: Prostatic Intraepithelial Neoplasia  
PJS: Peutz-Jeghers Syndrome  
pRb: proteína Retinoblastoma  
PSA: Prostate Serum Antigen  
PSCC: Prostatic Squamous Cell Carcinoma  
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog  
qRTPCR: Quantitaive Real Time PCR  
RAPTOR: Regulatory Associated Protein of mTOR  
rcf: Relative Centrifugal Force  
RICTOR: Rapamycin Insensitive Companion of mammalian Target Of Rapamycin  
RIN: RNA Integrity Number  
RNA: RiboNucleic Acid  
RNAi: RNA de interferencia  
ROS: Radical Oxigen Species  
Rot/Anti: Rotenona/Antimicina A  
SCC: Squamous Cell Carcinoma  
sd: Standar Desviation  
se: Standar Error  
SFB: Suero Fetal Bovino  
shRNA: Short Hairpin RNA  
SIK: Salt Inducible Kinase  
STE20: STE-20-related ADaptor protein  
TGFβ: Transforming Growth Factor β  
TrKA: Tyrosine Kinase A  
TSC2: Tuberous Sclerosis Complex 2  
UVB: UltraViolet radiation B  
V: Voltio  
VP: Ventral prostate  
WB: Western bolt  
WHO: World Health Organization  
WT: Wild-Tipe o salvaje  
ΔCt: Delta Ct

# ÍNDICE DE FIGURAS

## *INTRODUCCIÓN*

<b>FIGURA I1</b> .....	<b>30</b>
Progresión gradual de la carcinogénesis en función de la acumulación de las alteraciones genéticas en las células	
<b>FIGURA I2</b> .....	<b>31</b>
Características del cáncer	
<b>FIGURA I3</b> .....	<b>33</b>
Anatomía e histología del aparato reproductor masculino	
<b>FIGURA I4</b> .....	<b>35</b>
Modelo de progresión tumoral en el cáncer de próstata	
<b>FIGURA I5</b> .....	<b>45</b>
Estructura y modificaciones postraduccionales de la proteína <i>Lkb1</i> de ratón	
<b>FIGURA I6</b> .....	<b>50</b>
Señalización mediada por las quinasas sustrato de LKB1 y potencialmente involucrada en la supresión tumoral	

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

<b>FIGURA M1</b> .....	<b>72</b>
Vector lentiviral de tercera generación	

## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

<b>FIGURA R1</b> .....	<b>91</b>
La inmunoreactividad de LKB1 es indetectable en el 38,64% de los casos	
<b>FIGURA R2</b> .....	<b>92</b>
El nivel de expresión transcripcional de LKB1 disminuye en tumores primarios de próstata	
<b>FIGURA R3</b> .....	<b>95</b>
El modelo murino de cáncer de próstata basado en la pérdida de <i>Pten</i> mimetiza los diferentes estadios de la enfermedad en humanos	
<b>FIGURA R4</b> .....	<b>97</b>
La pérdida de LKB1 no afecta a la supervivencia pero provoca la aparición de lesiones hiperplásicas con bajo grado de penetrancia	
<b>FIGURA R5</b> .....	<b>101</b>

La pérdida combinada de <i>Pten</i> y <i>Lkb1</i> colaboran en la progresión del cáncer de próstata dirigido por la haploinsuficiencia de <i>Pten</i>	
<b>FIGURA R6</b> .....	<b>103</b>
La pérdida de <i>Lkb1</i> y la haploinsuficiencia de <i>Pten</i> aceleran la progresión del cáncer próstata	
<b>FIGURA R7</b> .....	<b>106</b>
El nivel de expresión de LKB1 varía en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata	
<b>FIGURA R8</b> .....	<b>107</b>
La expresión de LKB1 tras su introducción en la línea celular DU145 es comparable a la expresión endógena en la línea celular 22RV1	
<b>FIGURA R9</b> .....	<b>109</b>
La presencia de LKB1 en células DU145 dicta una respuesta diferencial frente al tratamiento con fenformina durante 4 horas	
<b>FIGURA R10</b> .....	<b>111</b>
La expresión exógena de LKB1 no altera el crecimiento celular en la línea DU145	
<b>FIGURA R11</b> .....	<b>113</b>
La expresión exógena de LKB1 en células DU145 hace disminuir el número y el tamaño de las colonias formadas en agar blando	
<b>FIGURA R12</b> .....	<b>114</b>
La presencia de LKB1 reduce la capacidad de migración e invasión en la línea celular DU145	
<b>FIGURA R13</b> .....	<b>116</b>
El silenciamiento de LKB1 no disminuye la densidad celular ni la clonogenicidad de la línea celular PC3	
<b>FIGURA R14</b> .....	<b>120</b>
La presencia de LKB1 no altera el metabolismo basal en la línea celular DU145	
<b>FIGURA R15</b> .....	<b>122</b>
El análisis estadístico no supervisado de los datos derivados del microarray revela la existencia de un perfil de expresión regulado por la presencia de LKB1	
<b>FIGURA R16</b> .....	<b>123</b>
El análisis mediante microarray de RNA de la diferencias en la expresión genética entre el grupo pBABE-LKB1 y el pBABE resulta en un total de 132 genes diferencialmente expresados	
<b>FIGURA R17</b> .....	<b>124</b>
La presencia de LKB1 altera procesos biológicos integrantes de la respuesta inmune	
<b>FIGURA R18</b> .....	<b>126</b>
Selección de genes del microarray de RNA	
<b>FIGURA R19</b> .....	<b>127</b>
Las diferencias observadas en el microarray de expresión se confirman mediante qRT-PCR	
<b>FIGURA R20</b> .....	<b>129</b>
La presencia de LKB1 altera la expresión de genes relacionados con la ruta del interferón	



<b>FIGURA R21.....</b>	<b>130</b>
La expresión de LKB1 en la línea celular DU145 hace aumentar el nivel de p65 nuclear	
<b>FIGURA R22.....</b>	<b>135</b>
Las diferencias de expresión observadas para CD24 en el microarray se confirman mediante al análisis en células, ratones y pacientes. La expresión de CD24 y de LKB1 correlacionan de manera inversa	
<b>FIGURA R23.....</b>	<b>139</b>
La expresión exógena de LKB1-KD no altera el crecimiento celular en la línea DU145	
<b>FIGURA R24.....</b>	<b>141</b>
La expresión exógena de LKB1-KD influye sobre el número y sobre el tamaño de las colonias formadas en agar blando	
<b>FIGURA R25.....</b>	<b>142</b>
La presencia de LKB1 KD reduce la capacidad de migración e invasión en la línea celular DU145	
<b>FIGURA R26.....</b>	<b>145</b>
Estudio de la expresión y silenciamiento de MO25	
<b>FIGURA R27.....</b>	<b>147</b>
El silenciamiento de MO25 $\alpha$ no disminuye la agresividad en las líneas celulares DU145 y PC3	
<b>FIGURA 28.....</b>	<b>149</b>
La presencia de LKB1 KD no altera el metabolismo basal en la línea celular DU145	
<b>FIGURA R29.....</b>	<b>150</b>
El análisis estadístico no supervisado de los datos derivados del microarray revela la existencia de un perfil de expresión regulado por la presencia de LKB1 KD	
<b>FIGURA R30.....</b>	<b>151</b>
El análisis mediante microarray de RNA de las diferencias en la expresión genética entre el grupo pBABE-LKB1 KD el pBABE resulta en un total de 33 genes diferencialmente expresados	
<b>FIGURA R31.....</b>	<b>153</b>
Las diferencias de expresión observadas para EPAS1 en el microarray se confirman en células DU145, en ratones y en pacientes. La expresión de EPAS1 y de LKB1 no correlacionan	
<b>FIGURA R32.....</b>	<b>155</b>
Las diferencias de expresión observadas para CD24 en el microarray se confirman mediante al análisis por qRTPCR y por FACS en células DU145	
<b>FIGURA R33.....</b>	<b>164</b>
La expresión de LKB1 funcional reduce la sensibilidad frente al tratamiento con fenformina en la línea celular DU145	
<b>FIGURA R34.....</b>	<b>167</b>
La expresión exógena de LKB1 no varía la tasa de crecimiento celular al someter a las células DU145 a diferentes formas de estrés metabólico	
<b>FIGURA R35.....</b>	<b>169</b>

Existe un grupo de fármacos ante los que LKB1 puede actuar como marcador de sensibilidad a la respuesta

**FIGURA R36.....170**

La presencia de LKB1 no dicta una respuesta diferencial frente al tratamiento con el inhibidor de tirosina quinasa A (TrkA) GW441756

**FIGURA R37.....172**

La presencia de LKB1 puede dictar una respuesta diferencial frente al tratamiento con inhibidores de HSP90

## ***DISCUSIÓN GENERAL***

**ESQUEMA D1.....179**

Implicación del nivel de expresión de *Lkb1* en cooperación con la haploinsuficiencia de *Pten* sobre la agresividad del cáncer de próstata murino

**ESQUEMA D2.....184**

Modelo propuesto para la regulación de la actividad dependiente e independiente de quinasa observada para LKB1

**ESQUEMA D3.....188**

Niveles de estratificación sugeridos y potenciales soluciones terapéuticas propuestas en el tratamiento de tumores de próstata deficientes para LKB1

# ÍNDICE

RESUMEN .....	25
---------------	----

## INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER .....	29
1.1. EL MODELO DE PROGRESIÓN TUMORAL .....	29
2. EL CÁNCER DE PRÓSTATA .....	31
2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA PRÓSTATA. ....	31
2.2. MODELO DE PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA .....	34
3. MODELOS MURINOS DE CÁNCER DE PRÓSTATA.....	36
3.1. MODELOS MURINOS GENERADOS PARA EL ESTUDIO DE ONCOGENES .....	37
3.1.1. Los modelos TRAMP y LADY .....	37
3.1.2. Modelos basados en la sobreexpresión de <i>c-Myc</i> .....	37
3.1.3. Modelos basados en la sobreexpresión de <i>Erg</i> .....	38
3.2. MODELOS MURINOS GENERADOS PARA EL ESTUDIO DE GENES SUPRESORES DE TUMORES.....	38
3.2.1. Modelos murinos basados en la pérdida de expresión de <i>p53 (Trp53)</i> .....	38
3.2.2. Modelos murinos basados en la pérdida de función de la proteína retinoblastoma ( <i>pRB</i> ) .....	39
3.2.3. Modelos murinos basados en la delección de <i>Nkx3.1</i> .....	39
3.2.4. Modelos murinos basados en la pérdida de <i>Pten</i> .....	39
3.2.4.1. Modelos murinos basados en la delección de <i>Pten</i> en la línea germinal .....	40
3.2.4.2. Modelos murinos basados en la delección de <i>Pten</i> de forma específica en el tejido prostático.....	41
3.2.4.2.1. Delección basada en la expresión del receptor de andrógenos ( <i>AR</i> ) .....	41
3.2.4.2.2. Delección de <i>Pten</i> en otros compartimentos celulares.....	44
4. LKB1 .....	45
4.1. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA LKB1 .....	45
4.2. EL COMPLEJO LKB1:STRAD:MO25 .....	46
4.3. LAS FUNCIONES DE LKB1 COMO QUINASA MAESTRA .....	47
4.3.1. AMPK.....	47
4.3.2. Quinasas relacionadas con AMPK .....	49
4.4. LKB1: IMPLICACIÓN EN CÁNCER .....	51
4.4.1. LKB1 en el desarrollo del cáncer en humanos .....	51
4.4.2. Modelos murinos generados mediante la delección de <i>Lkb1</i> .....	52
4.4.2.1. Modelos murinos generados mediante la delección de <i>Lkb1</i> en la línea germinal .....	52
4.4.2.2. Modelos murinos generados mediante la delección de <i>Lkb1</i> de forma específica de tejido .....	53

## OBJETIVOS

OBJETIVOS.....	59
----------------	----

### MATERIALES Y MÉTODOS

1. ENSAYOS <i>IN SILICO</i> .....	63
2. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> Y <i>EX VIVO</i> .....	64
2.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS HUMANAS.....	64
2.1.1 Especímenes.....	64
2.1.2. Construcción del microarray de tejidos y análisis inmunohistoquímico ...	64
2.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS MURINAS .....	65
2.2.1 Animales de experimentación.....	65
2.2.2 Métodos .....	66
2.2.2.1. Genotipado de ratones .....	66
2.2.2.2. Análisis de supervivencia .....	67
2.2.2.3. Caracterización de los ratones a los 6 meses de vida .....	67
2.2.2.4. Análisis patológico de tejidos murinos.....	68
2.2.2.5. Estudio de la expresión génica en la próstata murina.....	68
3. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	69
3.1 MATERIALES .....	69
3.1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	69
3.1.2 Fármacos .....	70
3.2 MÉTODOS .....	71
3.2.1. Producción de virus e infección en células diana .....	71
3.2.1.1. Transfecciones transitorias en células 293FT.....	71
3.2.1.2. Producción de retrovirus e infección en células diana .....	71
3.2.1.3. Producción de lentivirus e infección en células diana.....	72
3.2.2. Caracterización celular.....	73
3.2.2.1. Análisis de la viabilidad celular mediante de cristal violeta .....	73
3.2.2.2. Análisis de la tasa de síntesis de DNA mediante BrdU.....	74
3.2.2.3. Análisis de localización celular mediante inmunofluorescencia.....	74
3.2.2.4. Estudio de expresión de proteínas .....	75
3.2.2.4.1. Extracción de proteínas .....	75
3.2.2.4.2. Electroforesis y transferencia de proteínas.....	76
3.2.2.4.3. Inmunodetección de proteínas.....	76
3.2.2.4.4. Análisis de la expresión de proteínas de membrana mediante citometría de flujo .....	77
3.2.2.5. Estudio de expresión génica .....	78
3.2.2.5.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA .....	78
3.2.2.5.2. PCR cuantitativa en tiempo real.....	78
3.2.2.5.3. Microarray de expresión génica .....	79
3.2.2.6. Análisis del fenotipo metabólico .....	80
3.2.2.6.1. Ensayo de incorporación de glucosa .....	80
3.2.2.6.2. Ensayo de medida de la producción de lactato .....	81

3.2.2.6.3. Ensayo de medida del oxígeno consumido .....	81
3.2.2.7. Análisis de la migración e invasión celular .....	81
3.2.2.8. Análisis de la capacidad de formar colonias en condiciones independientes de anclaje .....	82
3.2.2.9. Análisis de la tasa de apoptosis: Estudio de la población SubG1 .....	82
<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>84</b>

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>1. OBJETIVO 1: EVALUAR LA IMPLICACIÓN DE LKB1 EN LA PATOGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA .....</b>	<b>87</b>
1.1. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LKB1 EN CÁNCER DE PRÓSTATA .....	89
1.1.1. Evaluación del nivel de expresión de LKB1 a nivel de proteína en cáncer de próstata .....	90
1.1.2. Evaluación del nivel de expresión transcripcional de LKB1 en cáncer de próstata.....	91
1.2. EVALUACIÓN DE LAS CONSECUENCIAS DE LA DELECCIÓN DE LKB1 DE MANERA CONDICIONAL EN LA PRÓSTATA DE RATONES .....	93
1.2.1. Evaluación de las consecuencias de la delección condicional de <i>Lkb1</i> en la próstata en modelos murinos .....	96
1.2.2. Evaluación de la cooperatividad de la pérdida combinada de <i>Lkb1</i> y <i>Pten</i> en cáncer de próstata.....	98
1.2.3. Análisis comparativo de los modelos murinos generados a tiempos tempranos.....	102
1.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPRESORA DE LKB1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA.....	104
1.3.1. Generación de un modelo celular para el estudio del mecanismo de acción de LKB1.....	105
1.3.2. Evaluación de las consecuencias de la expresión de LKB1. Efecto dependiente de su actividad quinasa.....	110
1.3.2.1. Estudio de los efectos biológicos derivados de la expresión de LKB1 .....	110
1.3.2.2. Análisis de las consecuencias del silenciamiento de LKB1 sobre la línea celular PC3.....	115
1.3.2.3. Análisis del mecanismo de acción de LKB1 en la supresión del cáncer de próstata.....	117
1.3.2.3.1. Caracterización del fenotipo metabólico regulado por LKB1	118
1.3.2.3.2. Caracterización del perfil de expresión génica regulado por LKB1 .....	120
1.3.2.3.2.1. Validación funcional del cambio de expresión observado en genes implicados en la respuesta inmune .....	127
1.3.2.3.2.2. Caracterización del nivel de expresión de CD24 en diferentes modelos de estudio. Estudio de correlación con LKB1 ....	132

1.3.3. Evaluación de las consecuencias de la expresión de un mutante de LKB1 sin actividad quinasa. Efecto independiente de la actividad quinasa.....	138
1.3.3.1. Estudio de los efectos biológicos derivados de la expresión de LKB1 KD .....	139
1.3.3.2. Análisis del mecanismo de acción de LKB1 KD en la supresión del cáncer de próstata .....	143
1.3.3.2.1. Análisis de las consecuencias del silenciamiento de MO25 sobre la línea celular deficiente (DU145) o competente (PC3) para LKB1 .....	143
1.3.3.2.2. Caracterización del fenotipo metabólico regulado por LKB1 KD .....	148
1.3.3.2.3. Caracterización del perfil de expresión génica regulado por LKB1 KD .....	149
1.3.3.2.3.1. Caracterización del nivel de expresión de EPAS1 en diferentes modelos de estudio. Estudio de correlación con LKB1 ....	152
1.3.3.2.3.2. Caracterización del nivel de expresión de CD24 en función de la presencia de LKB1 KD .....	155
<b>2. OBJETIVO 2: EXPLORAR EL POTENCIAL USO DE LKB1 COMO BIOMARCADOR TERAPÉUTICO EN CÁNCER DE PRÓSTATA .....</b>	<b>159</b>
2.1. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE LKB1 COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA FRENTE A TERAPIAS BASADAS EN EL ESTRÉS METABÓLICO .....	162
2.1.1. Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador de efectividad terapéutica frente al tratamiento con fenformina .....	162
2.1.2. Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador de efectividad terapéutica frente al estrés provocado por la restricción nutricional .....	164
2.1.2.1 Privación de suero .....	165
2.1.2.2 Inhibición de la glicólisis.....	165
2.1.2.2.1- Tratamiento con 2-Deoxy-D-glucosa .....	165
2.1.2.2.2. Crecimiento en condiciones de privación de glucosa y empleo de suero dializado.....	166
2.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE LKB1 COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA .....	168
2.2.1. Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador predictivo de sensibilidad ante la inhibición de TrkA .....	170
2.2.2. Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador predictivo de sensibilidad ante la inhibición de HSP90 .....	171

### ***DISCUSIÓN GENERAL***

LKB1 COMO SUPRESOR DE TUMORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA: ESPECULACIONES SOBRE EL MECANISMO .....	177
EFFECTO INDEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE LKB1: IMPLICACIONES Y ESPECULACIONES SOBRE EL MECANISMO .....	183

LKB1 COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA .....	186
---	-----

### ***CONCLUSIONES***

CONCLUSIONES.....	193
-------------------	-----

### ***BIBLIOGRAFÍA***

BIBLIOGRAFÍA.....	197
-------------------	-----

### ***ANEXOS***

ANEXOS.....	225
-------------	-----

- *ANEXO I:* Tablas indicativas de los genes diferencialmente expresados en el análisis del perfil transcripcional.
- *ANEXO II:* Artículos publicados durante el desarrollo de la tesis





## RESUMEN

El modelo actual de progresión tumoral es asumido como un proceso secuencial en el cual, mediante la acumulación de alteraciones (genéticas, epigenéticas, de la expresión, de la señalización, metabólicas, etc.), las células cancerosas adquieren habilidades capacitadoras. Las quinasas maestras, reguladoras de la señalización celular, constituyen un potencial mecanismo mediante el cual un único evento genético podría reflejarse en múltiples alteraciones en diversas rutas de señalización. LKB1 es una quinasa maestra que ejerce sus funciones sobre la regulación del metabolismo, la proliferación y la polaridad celular. La hipótesis formulada en esta tesis doctoral plantea que LKB1 actúa como un gen supresor de tumores en el cáncer de próstata. Con el objetivo de contrastarla se han empleado especímenes humanos de cáncer de próstata, bases de datos públicas de expresión génica en esta enfermedad, modelos murinos modificados genéticamente y líneas celulares. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que LKB1 es un gen supresor de tumores en el tejido prostático. Mediante un estudio inmunohistoquímico y transcripcional, identificamos un grupo de tumores de próstata en los que la expresión de LKB1 se encuentra reducida. El modelo transgénico condicional de próstata muestra que mientras que LKB1 como única delección génica no es suficiente para promover el desarrollo tumoral en la próstata, su eliminación en el contexto de la heterocigosidad del supresor de tumores *Pten* da lugar a cáncer metastático letal. La pérdida bialélica de *Lkb1* en este contexto da lugar a cáncer de células escamosas con total penetrancia. El desarrollo de un sistema de estudio *in vitro* nos permitió demostrar que LKB1 inhibe la migración, invasión y el crecimiento independiente de anclaje. Este fenotipo resultó ser independiente de la actividad quinasa de LKB1 y coherente con la regulación negativa del oncogén CD24, que corroboramos en muestras murinas y en análisis correlativos en biopsias de pacientes. Por último, nos propusimos definir estrategias terapéuticas eficaces en tumores de próstata deficientes en LKB1. Nuestros resultados confirman el potencial de la fenformina en este contexto y revelan adicionalmente la selectividad de inhibidores de la chaperona HSP90 en células LKB1 negativas. En resumen, los resultados obtenidos demuestran la implicación causal de LKB1 en la supresión del cáncer de próstata y abren nuevas estrategias terapéuticas para aplicar medicina de precisión en base a la expresión de la quinasa.



# Introducción





# 1. EL CÁNCER

Cáncer es un término genérico que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas que pueden afectar a cualquier parte del organismo. En todos los tipos de cáncer una característica común es la proliferación anormal e incontrolada de las células tumorales transformadas (*Hanahan and Weinberg, 2011*).

Esta enfermedad representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, del inglés “*The International Agency for Research on Cancer*”), en el último informe Globocan del 2012, estimó una incidencia aproximada de 14 millones de casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (*Ferlay et al., 2013*) (*Bashir, 2015*). Este informe prevé además un incremento del 70% en el número de nuevos casos en los próximos 20 años, lo cual pone de relevancia la importancia de la investigación al respecto. Los tres tipos de cáncer que presentan mayor incidencia en la población mundial son el de pulmón, el de mama y el de próstata, según datos de la OMS (*Ferlay et al., 2013*).

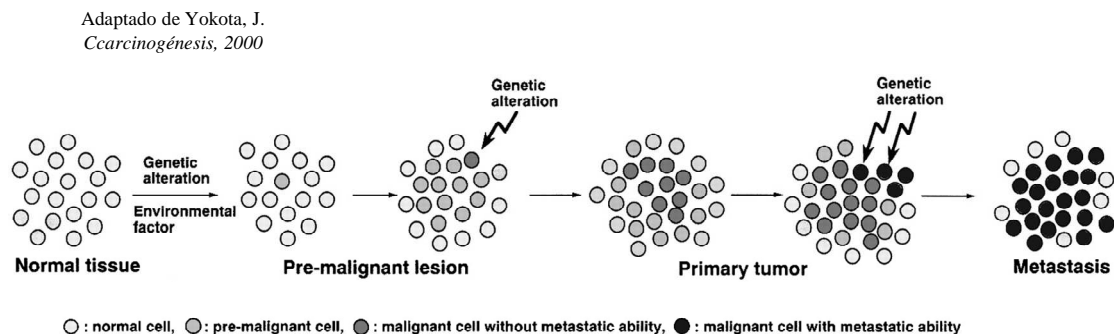
## 1.1. EL MODELO DE PROGRESIÓN TUMORAL

La investigación oncológica ha revelado que el desarrollo del cáncer es un proceso secuencial y complejo que implica la sucesiva acumulación de mutaciones en genes clave para la correcta función de la célula. Los conocimientos actuales han permitido describir el desarrollo tumoral como un proceso que se produce en múltiples etapas mediado por la sucesión de alteraciones genéticas y epigenéticas que provocan cambios permisores de la transformación maligna (*Foulds, 1958*) (*Vogelstein and Kinzler, 1993*) (*Vogelstein and Kinzler, 2004*). A consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas una o varias células premalignas pueden transformarse en células malignas de origen clonal y dar lugar a un tumor primario. La sucesiva acumulación de mutaciones en un tumor origina un estado de diversidad con diferentes clones de células tumorales que presentan una variedad de capacidades. De esta heterogeneidad clonal se pueden originar células tumorales con capacidad de diseminarse y establecer un nuevo tumor en un tejido distante (metástasis) (*Yokota, 2000*) (**Fig. II**).

El modelo que explica la progresión del cáncer se ha basado en el descubrimiento de oncogenes con mutaciones que provocan una ganancia de función dominante y genes supresores de tumores con mutaciones de pérdida de función recesiva. Ambas clases de genes han sido identificados a través de su repetida alteración en cánceres humanos y animales y por su implicación en los fenotipos tumorales descritos en modelos animales (*Hahn and Weinberg, 2002*). El desarrollo del cáncer en humanos implica una compleja sucesión de eventos que pueden llegar a acumularse

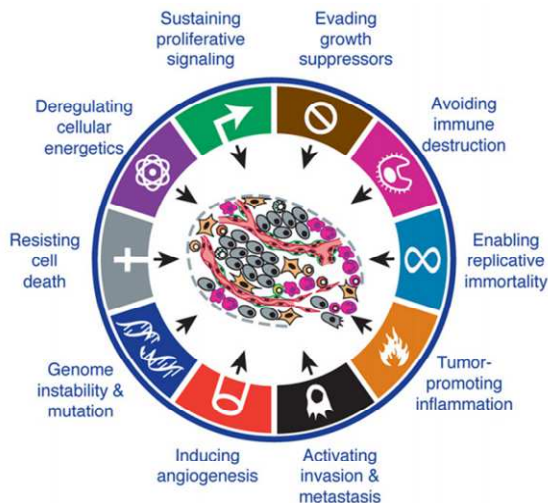
## Introducción

durante décadas hasta dar lugar a un tumor (Yokota, 2000). Durante este proceso el genoma de las incipientes células tumorales adquieren mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. Se ha mostrado una gran heterogeneidad en la combinación de mutaciones presentes en diferentes tipos de cáncer, incluyendo los confinados a un tejido específico o entre células de un mismo tumor, poniendo de manifiesto la diversidad genética del cáncer (Golub *et al.*, 1999).



**FIGURA 11. Progresión gradual de la carcinogénesis en función de la acumulación de las alteraciones genéticas en las células**

La heterogeneidad del cáncer hace necesario el establecimiento de criterios que nos permitan identificar las reglas generales que dirigen la transformación celular en nuestro organismo. En base a este razonamiento Hanahan y Weinberg sugirieron en un primer estudio que el amplio catálogo de genotipos oncogénicos se manifiesta en seis alteraciones producidas en la fisiología celular y que en conjunto son responsables de la progresión tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000). Las alteraciones que identifican son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad ante las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la muerte celular programada, capacidad de replicación sin límite, inducción de la angiogénesis, e invasión tisular y metástasis (**Fig. I2**). Los autores proponen que cada uno de estos cambios fisiológicos (definido como *hallmark*) es una nueva capacidad adquirida durante el desarrollo tumoral, siendo muchas de estas características compartidas por la mayoría de células cancerosas, y quizá por todos los tipos de cánceres humanos. La actualización de este estudio incluye además de los mencionados anteriormente dos nuevos cambios fisiológicos propios de las células tumorales, provocados por la adquisición de dos características emergentes: la desregulación de metabolismo energético celular y la evasión de la respuesta inmune (Hanahan and Weinberg, 2011). Los autores sugieren que a medida que las células normales evolucionan a un estado neoplásico adquieren las mencionadas características capacitadoras mediante un proceso secuencial que les permite convertirse en tumorogénicas y en última instancia en células malignas (**Fig. I2**).



Adaptado de Hanahan and Weinberg  
*Cell*, 2011

**FIGURA I2. Características del cáncer**  
Hanahan y Weinberg sugieren que la mayoría de los cánceres, si no todos, han adquirido las mismas capacitaciones funcionales durante su desarrollo a través de diferentes estrategias. (Hanahan and Weinberg, 2011).

## 2. EL CÁNCER DE PRÓSTATA

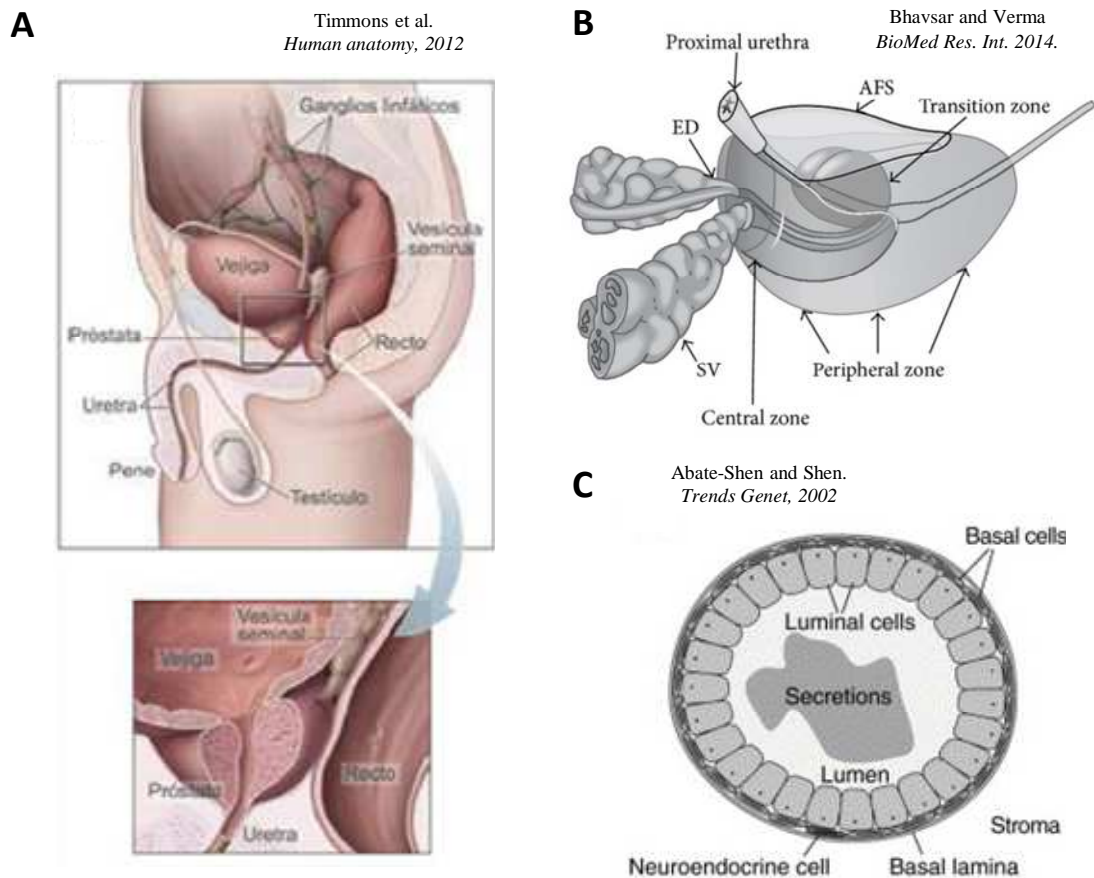
### 2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA PRÓSTATA.

La próstata es la mayor glándula accesoria del sistema reproductor masculino. Segrega un fluido ligeramente alcalino que forma parte del líquido seminal. (Knoblauch and True, 2012). Históricamente descrita como con forma de nuez, la glándula prostática tiene forma de pirámide invertida y rodea la uretra proximal en la salida de la vejiga (Timmons et al., 2012) (Fig. I3A).

La próstata se divide en cuatro zonas: la zona central que rodea la uretra, zona transicional situada en su mayor parte en la zona anterior de la uretra, la zona periférica y el estroma fibromuscular anterior que separa la zona periférica del recto (Bhavsar and Verma, 2014) (Fig. I3B). Histológicamente, la próstata está formada por glándulas túbulo-acinares ramificadas (o *acini*) comunicadas entre sí por ductos, a través de los cuales se vierten las secreciones a la uretra (Fig. I3A). Estas glándulas están contenidas en un estroma fibromuscular. Las glándulas y los ductos están tapizados por células epiteliales. Este epitelio suele ser cilíndrico simple o pseudo-estratificado, con forma entre cuboidal y columnar y está compuesto por 3 tipos de células epiteliales con inmunofenotipos específicos: células basales, células secretoras o exocrinas y células neuroendocrinas (Abate-Shen and Shen, 2002) (Fig. I3C). Las zonas de la próstata son anatómicamente reconocibles, tienen diferentes características histológicas, diferentes orígenes embriológicos y también presentan diferente predisposición a la carcinogénesis. En la zona central, derivada del conducto de Wolff, se ha encontrado una incidencia muy baja de cáncer de próstata. Las lesiones tumorales se localizan principalmente en la zona de transición y periférica, ambas derivadas del sinus urogenital. La hiperplasia benigna de próstata se desarrolla predominantemente de la

## Introducción

zona de transición que además presenta una incidencia de cáncer de próstata del 25%. La mayoría de los carcinomas de próstata, aproximadamente el 70%, derivan de la zona periférica (Bhavsar and Verma, 2014) (Shappell et al., 2004).



### FIGURA 13. Anatomía e histología del aparato reproductor masculino

A. Localización de la próstata en el sistema reproductor masculino (Timmons et al., 2012)

B. Anatomía zonal de la próstata (Bhavsar and Verma, 2014).

ED: Ductos eyaculadores; SV: Vesículas seminales; AFS: Estroma fibromuscular anterior.

C. Histología de la próstata: Tipos celulares del epitelio prostático (Abate-Shen and Shen, 2002)

En el tejido prostático las lesiones precancerosas se localizan típicamente en hombres de entre 20 y 30 años, aunque el desarrollo del cáncer clínicamente detectable no se produce hasta los 60 (Bostwick et al., 2004). Esta lenta progresión clínica hace pensar que el proceso de transformación maligna en la próstata puede involucrar múltiples eventos genéticos y epigenéticos, dificultando el estudio de los mecanismos moleculares. Se ha observado también que las biopsias humanas contienen a menudo múltiples focos de lesiones cancerosas y precancerosas independientes. Estas lesiones localizadas en un único espécimen a menudo son genéticamente heterogéneas, apoyando el concepto de que el cáncer de próstata se origina como una enfermedad multifocal (Bastacky et al., 1995). Debido a la lenta progresión clínica, a la naturaleza heterogénea y multifocal observada y a las dificultades para acceder a muestras que representen los primeros estadios del cáncer de próstata, los modelos murinos nos



pueden facilitar ventajas significativas para el estudio de los mecanismos moleculares que permiten la progresión tumoral (*Abate-Shen and Shen, 2002*). La próstata humana y la del ratón presentan diferentes características anatómicas. La próstata del ratón se encuentra envuelta en una membrana y está dividida en cuatro lóbulos diferentes: anterior, dorsal, ventral y lateral. El lóbulo dorsal y el lateral a menudo se agrupan juntos como el lóbulo dorsolateral. La próstata se compone de cuatro pares de lóbulos localizados circunferencialmente alrededor de la uretra y de forma caudal a la vejiga urinaria (*Valkenburg et al., 2011*).

El cáncer de próstata es altamente frecuente, siendo en los hombres el segundo más común, según datos de la OMS/IARC. La incidencia mundial del cáncer de próstata en el informe Globocan 2012 se estimó en 1,1 millones de casos y la mortalidad en 307.000 casos, lo cual le convierte en el quinto tipo de cáncer en provocar letalidad en los hombres. En la Unión Europea se estimó una incidencia de 354.000 casos y una mortalidad de 72.000, siendo el cáncer más frecuente entre los hombres en estos países. El cáncer de próstata se espera que siga siendo el cáncer de mayor incidencia en la población masculina en Europa (*Ferlay et al., 2013*). Las previsiones indican que 1 de cada 3 hombres desarrollará lesiones precancerosas en la próstata y 1 de cada 9 carcinoma (*Abate-Shen and Shen, 2000*). El principal riesgo del cáncer de próstata es la edad, y se estima que el 95% de los hombres con más de 70 años presentan lesiones hiperplásicas en la próstata (*Berry et al., 1984*).

El diagnóstico del cáncer de próstata se realiza mediante el tacto digital rectal y la determinación de los niveles del antígeno prostático específico (PSA) en sangre. La vigilancia activa es una opción, especialmente para pacientes que se encuentran por encima de 75 años, que han desarrollado una enfermedad indolente y que puede que no se beneficien del tratamiento intenso (*Chamie et al., 2015*). La terapia a aplicar generalmente se decide en función del estadio tumoral y del grado de Gleason, determinados a partir de muestras obtenidas mediante biopsia. El grado de Gleason es una herramienta que estima la agresividad del cáncer mediante la clasificación histopatológica zonal de la muestra (*Gleason and Mellinger, 1974*).

Existen cuatro tratamientos para el cáncer de próstata, pudiéndose combinar para obtener mayor eficacia:

- Terapia de privación de andrógenos (o castración química)
- Radioterapia (Braquiterapia)
- Quimioterapia
- Prostatectomía radical

En nuestro sistema sanitario la Prostatectomía o la braquiterapia suelen ser las aproximaciones terapéuticas iniciales. Si el cáncer recurre tras el tratamiento se aplica la terapia de privación de andrógenos ya que las células tumorales de la próstata dependen en gran medida de estos para crecer y proliferar (*Basu and Tindall, 2010*). Los tumores recidivados generalmente tienen un alto grado de Gleason y pueden ser metastáticos y/o

refractarios a la terapia de privación de andrógenos (*Grossmann et al., 2001*). La metástasis ósea es la mayor causa de morbilidad y de mortalidad en el cáncer de próstata (*Singh and Figg, 2005*), llegando a detectar en el 90% de los pacientes que mueren a causa del tumor (*Bubendorf et al., 2000*).

La mayoría de los tumores de próstata, aproximadamente el 90-95% de los casos, se desarrollan en las células epiteliales de la glándula. Se denominan adenocarcinomas prostáticos y se caracterizan por presentar un fenotipo luminal asociado a la pérdida de células basales diferenciadas (*Wang et al., 2009*). Las variantes no acinares corresponden al restante 5-10% de tumores primarios de próstata. De acuerdo con la WHO, estas variantes histológicas o tipos, incluyen el carcinoma sarcomatoide, el adenocarcinoma ductal, el carcinoma urotelial, el carcinoma de células escamosas, el carcinoma adenoescamoso, el carcinoma de células basales, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células claras (*Humphrey, 2012*). Por su relevancia en los resultados derivados de la presente tesis doctoral describiremos más ampliamente el cáncer de próstata de células escamosas.

El cáncer de células escamosas de la próstata (PSCC) es un tumor raro que supone entre el 0,5-1% de los carcinomas de la próstata. Se describe típicamente como un cáncer agresivo con una media de supervivencia de 14 meses tras el diagnóstico (*Malik et al., 2011*). El criterio aceptado empleado para definir las características histológicas del PSCC incluye: i) una lesión neoplásica claramente maligna, con características de invasión, crecimiento desordenado y anaplasia celular ii) características escamosas definidas, tales como queratinización aparición de perlas de queratina, y/o numerosos puentes intercelulares iii) pérdida de cualquier patrón acinar o glandular iv) no haber empleado previamente terapia de estrógeno y la ausencia de PSCC en ningún otro lugar, particularmente en la vejiga (*Mott, 1979*). Clínicamente el PSCC es diferente del más común adenocarcinoma de próstata (ADC). Los síntomas presentados son a menudo similares a los del ADC avanzado incluyendo síntomas de las vías urinarias bajas y metástasis óseas. Debido a que el SCC presenta una ocurrencia reducida no existe ninguna modalidad de tratamiento ampliamente aceptada. El tratamiento quirúrgico y las terapias multimodales son los tratamientos más comúnmente empleados con un grado de éxito variable (*Malik et al., 2011*).

## 2.2. MODELO DE PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata progresa a través de diferentes estadios que comprenden desde la hiperplasia atípica, una lesión común y precoz, hasta el cáncer metastático en fases avanzadas de la enfermedad. Pese a que las próstatas humanas y murinas difieren estructuralmente, la progresión del cáncer de este tejido sucede de una manera muy similar (*Nardella et al., 2010*). A la hiperplasia epitelial le puede seguir una lesión neoplásica. La hiperplasia benigna de próstata (BPH, del inglés “Prostate Benign Hyperplasia”) se caracteriza por un aumento en la proliferación de las células del

estroma, provocado por la adquisición de mutaciones, mientras que la neoplasia intraepitelial de próstata (PIN, del inglés “Prostatic Intraepithelial Neoplasia”) se caracteriza por la aparición de focos de displasia en células ductales y acinares. El desarrollo de estas lesiones es un evento diagnosticado en uno de cada tres hombres que superan los 45 años, aunque la mayoría de estas PIN no progresan a tumores clínicamente detectables (Isaacs *et al.*, 2002). La PIN de alto grado, (HGPIIN, del inglés, “High Grade PIN”) se considera como el primer estadio de adenocarcinoma de próstata invasivo. A medida que la lesión se transforma en más neoplásica y agresiva el epitelio prostático invade a través de la membrana basal el estroma circundante estableciendo de esta manera un adenocarcinoma invasivo localizado (Marandola *et al.*, 2004). A partir de este punto se puede desarrollar como un tumor localmente confinado o como un tumor localmente avanzado, para eventualmente progresar y desarrollar cáncer de próstata metastático (Fig. I4).

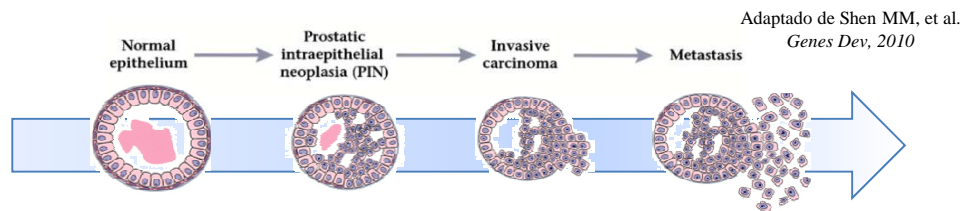


FIGURA I4. Modelo de progresión tumoral en el cáncer de próstata.

La progresión metastática ha sido descrita como un proceso complejo consistente en una serie de eventos biológicos discretos. A lo largo de este proceso las células tumorales adquieren las capacidades necesarias para invadir el tejido circundante, extravasarse al sistema circulatorio y sobrevivir en este ambiente, extravasarse en un nuevo tejido, proliferar en sitios secundarios y de desarrollar un sistema vascular que mantenga el crecimiento de la metástasis (Le *et al.*, 2004). Para metastatizar de manera eficaz, las células tumorales tienen que adquirir la capacidad de sobrevivir sin estar sujetas a la matriz extracelular o en contacto con las células adyacentes. La evasión de la *anoikis*, definida como el tipo de muerte celular provocada por la ausencia de contacto (Paoli *et al.*, 2013), permitirá a la célula en transformación maligna la separación del tejido de origen, la supervivencia en el sistema circulatorio y la colonización de un nuevo tejido diana. La capacidad clonogénica de las células migradas será también determinante en el éxito de la formación de metástasis en tejidos secundarios (Fornaro *et al.*, 2001). Cabe destacar que en los últimos años sea postulado que las células tumorales podrían preparar el nicho metastático del tejido diana mediante la producción de proteínas o vesículas a la circulación (Hoshino *et al.*, 2015). La metástasis de la próstata muestra un tropismo preferencial por el hueso aunque también es detectable en pulmón e hígado (Abate-Shen and Shen, 2002).

### 3. MODELOS MURINOS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Los modelos animales, a través de la introducción de modificaciones genéticas que emulan a las observadas en cáncer humano, permiten evaluar la potencial contribución de genes individuales al proceso oncogénico así como la cooperación entre diversas lesiones genéticas observadas en un único tumor. De esta manera se logra estudiar *in vivo* un tumor que surge en el contexto histológico y genético seleccionado. Esto proporciona un recurso crítico para validar el papel de las lesiones genéticas candidatas en la progresión del cáncer y facilitar la comprensión de su mecanismo de supresión tumoral (revisado en *(Parisotto and Metzger, 2013)*). Los modelos murinos también son empleados para la evaluación preclínica de estrategias de intervención terapéutica *(Langdon, 2012)*.

En los últimos años se ha producido un importante avance en el desarrollo de modelos de ratones transgénicos que emulan el proceso de transformación maligna lo que ha permitido confirmar el alto grado de conservación presente en las vías alteradas en el cáncer originado espontánea o experimentalmente en humanos y roedores respectivamente *(Cunningham and You, 2015)*. El lóbulo dorsolateral murino ha sido descrito como el más similar a la zona periférica humana, que es la zona que presenta mayor incidencia de cáncer de próstata en humanos *(Powell et al., 2003)*, pero la opinión consensuada del “Bar Harbor Pathology Panel” es que no hay relación directa entre ninguno de los lóbulos murinos con las zonas de la próstata humana *(Shappell et al., 2004)*. Las diferencias observadas a nivel anatómico entre la próstata del ratón y la humana históricamente han ocasionado controversia acerca de la validez del modelo murino como sistema biológico apto para el estudio del cáncer de próstata humano. Sin embargo, diversos estudios han arrojado luz sobre esta cuestión, revelando las amplias similitudes existentes entre los mecanismos moleculares responsables de la progresión del cáncer de próstata en ratones y humanos (revisado en *(Huss et al., 2001)*).

La generación de modelos murinos modificados genéticamente se realiza mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética que permiten introducir por recombinación homóloga alteraciones genéticas dirigidas en células madre embrionarias *(Sakamoto et al., 2014)*. La implantación de estas células en blastocistos puede dar lugar a ratones que presentan la mutación en su línea germinal y la pueden transmitir a su descendencia. Estas lesiones pueden consistir en la pérdida de un único gen (líneas murinas *knock-out*) o en la inserción de copias adicionales (líneas murinas transgénicas), lo que permite estudiar el papel de potenciales genes supresores de tumores y oncogenes en la progresión del cáncer *(Nawijn et al., 2008)*. Con el objetivo de permitir el control experimental sobre la pérdida de la expresión génica o la inducción de la expresión del transgen se han generado modelos murinos mutantes condicionales. Para ello se han empleado las enzimas recombinasas específicas de secuencia las cuales catalizan eficientemente la recombinación de un segmento de DNA

flanqueado por sitios de reconocimiento (Nagy, 2000). Uno de los sistemas más empleados se basa en la Cre recombinasa del bacteriófago P1 que reconoce los elementos de DNA denominados sitios LoxP e induce la recombinación entre dos de ellos (Sternberg and Hamilton, 1981). La delección condicional de un gen se logra flanqueando uno o varios exones de interés con sitios LoxP y mediante el control de la expresión de la enzima Cre bajo promotores adecuados que permiten su expresión en función del tejido y del momento del desarrollo. De esta manera, la escisión de los exones flanqueados puede ser controlada espacial y temporalmente (Gu et al., 1994).

## 3.1. MODELOS MURINOS GENERADOS PARA EL ESTUDIO DE ONCOGENES

### 3.1.1. Los modelos TRAMP y LADY

El modelo de adenocarcinoma transgénico de la próstata murina (TRAMP) empleó la expresión de oncogenes virales en el epitelio prostático (Gingrich and Greenberg, 1996) (Gingrich et al., 1997). En este modelo la expresión de los antígenos tumorales grande y pequeño (T/tag) del virus símico SV40 se encuentra regulada por el promotor de la probasina de rata específico de próstata (PB) (Greenberg et al., 1995). Los animales TRAMP hemocigotos muestran PIN a las 12 semanas de vida y adenocarcinoma a las 24 (Greenberg et al., 1995).

El modelo murino LADY muestra una patología similar al modelo TRAMP. El promotor PB se empleó para expresar el antígeno T grande revelando el desarrollo de hiperplasia glandular y PIN a la edad de 10 semanas seguido de HGPIIN y adenocarcinoma escasamente diferenciado a la edad de 20 semanas (Kasper et al., 1998) (Masumori et al., 2001)

### 3.1.2. Modelos basados en la sobreexpresión de *c-Myc*

El oncogen *Myc* aumenta la proliferación celular y su amplificación y/o sobreexpresión se detecta en un 30% de los tumores de próstata (Koh et al., 2010). Se han desarrollado diferentes modelos que expresan el transgen *Myc* a diferentes niveles dependiendo del promotor en el cual estén integrados. El transgen *Myc* controlado por el promotor PB presenta niveles bajos de expresión, mientras que el transgen *Myc* controlado por un promotor PB reconstruido por regiones de respuesta a andrógenos (ARR<sub>2</sub>PB) presenta niveles altos de expresión (Ellwood-Yen et al., 2003). Se detectan lesiones PIN a las 2 semanas en los animales que expresan niveles altos de *Myc* y a las 4 en los que expresan niveles bajos. Estas lesiones progresan a adenocarcinoma invasivo a la edad de 3-6 meses y 10-12 meses respectivamente según los modelos citados (Zhang et al., 2000).

### 3.1.3. Modelos basados en la sobreexpresión de *Erg*

ERG (del inglés, “*ETS-related gen*”) es un oncogén perteneciente a la familia de factores de transcripción ETS (del inglés, “*erythroblast transforamtion specific*”). El gen ERG se encuentra cercano al gen TMPRSS2 en el cromosoma 21 de manera que la translocación génica de ERG provoca que este se sobre-exprese bajo el control de TMPRSS2, que tiene una regulación dependiente de andrógenos (*Jhavar et al., 2008*). Se ha observado que la fusión génica TMPRSS2:ERG se detecta frecuentemente (hasta en un 50% de los casos) en cánceres de próstata (*Burdova et al., 2014*), especialmente en los refractarios a hormonas (*Yu et al., 2010*). La sobreexpresión de ERG en líneas celulares de próstata aumenta la invasión celular, mientras que en células luminales del epitelio prostático de ratones transgénicos provoca la aparición de lesiones PIN (*Klezovitch et al., 2008*). Otros estudios han mostrado que las líneas murinas transgénicas en las que *Erg* se encuentra sobreexpresado desarrollan cáncer invasivo únicamente cuando esta línea murina se cruza con animales heterocigotos para *Pten* (*Tomlins et al., 2008*) (*Carver et al., 2009*). Se ha observado además que especímenes de cáncer de próstata ( $\approx 40\%$ ) que presentan la translocación TMPRSS2:ERG se encuentran enriquecidos en referencia a la pérdida de PTEN (*Carver et al., 2009*). Este dato implica que la pérdida de PTEN y la translocación de ERG son eventos asociados que cooperan en la promoción de progresión del cáncer de próstata.

## 3.2. MODELOS MURINOS GENERADOS PARA EL ESTUDIO DE GENES SUPRESORES DE TUMORES

### 3.2.1. Modelos murinos basados en la pérdida de expresión de *p53* (*Trp53*)

La modificación de la expresión de *p53* en para el estudio del cáncer de próstata se ha realizado tanto mediante mutación como mediante la pérdida de una copia del gen *p53*. Para estudiar el papel de las mutaciones se ha introducido un transgen que codifica un mutante de *p53* en bajo el control del promotor PB. Este modelo presenta lesiones HGPIN a las 52 semanas de vida (*Elgavish et al., 2004*). La inactivación de *p53* de forma condicional en el epitelio prostático desarrolla lesiones tipo PIN a los 20 meses de vida (*Zhou et al., 2006*). Sin embargo el modelo murino heterocigotos para su expresión en todos sus tejidos no muestran ninguna patología en la próstata (*Donehower et al., 1992*), lo cual puede llevar a pensar en descalificar a *p53* como un supresor de tumores relevante en el cáncer de próstata. Sin embargo, es posible que el papel de la vía de *p53* en el cáncer de próstata se observe únicamente ante la pérdida concomitante con PTEN (*Chen et al., 2005*), tal como desarrollaremos en el apartado 3.2.4.2 de la presente introducción.

### 3.2.2. Modelos murinos basados en la pérdida de función de la proteína retinoblastoma (*pRB*)

El gen que codifica para la proteína retinoblastoma (*Rb*) también ha sido asociado con el cáncer de próstata y sus mutaciones pueden ser eventos tempranos en la progresión tumoral de la próstata (*Uchida, 2012*). Se ha generado un modelo murino transgénico que presenta la delección del gen *Rb* de forma específica en el tejido prostático. La inactivación de la familia de proteínas pRB (*Rb/p107/p130*) en el epitelio prostático es suficiente para desarrollar lesiones PIN que progresan a adenocarcinoma en un 100% de los casos (*Hill et al., 2005*).

### 3.2.3. Modelos murinos basados en la delección de *Nkx3.1*

NKX3.1 es un gen supresor de tumores de próstata que codifica para un factor de transcripción esencial para la función normal de la próstata y para la regulación negativa de la proliferación del epitelio prostático (*He et al., 1997*) (*Zhang et al., 2010*). Las mutaciones en el gen NKX3.1 se detectan en el 60-80% de los tumores de próstata (*Bowen et al., 2000*). Los modelos murinos *knock-out* para *Nkx3.1*, tanto los convencionales y como los condicionales, muestran hiperplasia epitelial y PIN cuya incidencia incrementa con la edad (*Kim et al., 2002*) (*Abdulkadir et al., 2002*). La delección en bialélica de *Nkx3.1* se asocia con características neoplásicas, pero los mutantes no desarrollan carcinoma invasivo (*Abate-Shen et al., 2008*).

### 3.2.4. Modelos murinos basados en la pérdida de *Pten*

PTEN (del inglés “*Phosphatase and tensin homologue*”) es un gen supresor de tumores bien establecido y uno de los más frecuentemente mutado en tumores humanos (*Chalhoub and Baker, 2009*). En referencia al cáncer de próstata se ha detectado su pérdida de función en el 35% de los cánceres primarios y en el 63% de los metastáticos (*Dahia, 2000*) (*Suzuki et al., 1998*).

PTEN puede actuar como fosfatasa sobre lípidos y proteínas (*Song et al., 2012*) y se ha descrito que ejerce funciones independientes de su actividad catalítica (*Song et al., 2011*). Su actividad como fosfatasa lipídica se opone a acción de la enzima PI3K y regula negativamente la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR (*Hollander et al., 2011*). La vía PI3K-AKT-mTOR está conservada evolutivamente desde levaduras a humanos y en organismos eucariotas regula gran variedad de procesos celulares incluyendo proliferación, apoptosis, crecimiento, metabolismo, supervivencia y migración (*Chalhoub and Baker, 2009*), habiéndose observado que la actividad de PTEN como supresor tumoral depende de la regulación de la misma (*Cantley and Neel, 1999*). Mediante el control sobre la vía PI3K PTEN incide sobre una plétora de procesos celulares tales como la progresión del ciclo celular, proliferación celular, senescencia, supervivencia, metabolismo energético, apoptosis, envejecimiento, contracción

muscular, respuesta ante el daño al DNA, angiogénesis, motilidad y polaridad celular (Worby and Dixon, 2014). En línea con su papel en la regulación de múltiples procesos celulares PTEN presenta una función en la patogénesis de numerosas enfermedades tales como la diabetes, autismo y cáncer (Nardella et al., 2010) (Ortega-Molina and Serrano, 2013). La importancia de PTEN como supresor de tumores se basa en que las mutaciones de PTEN en la línea germinal en humanos pueden derivar en el desarrollo de síndromes autosomales dominantes, denominados comúnmente síndromes tumorales hamartomatosos PTEN (PHTS) (Hollander et al., 2011). De entre ellos el más estudiado es el síndrome de Cowden (Cauchin et al., 2015). Los PHTS se caracterizan por presentar defectos en el desarrollo, defectos neurológicos, hamartomas en varios tejidos y predisposición a padecer cáncer de pecho, tiroides y endometrial (Liaw et al., 1997) (Zhou et al., 2002).

La trascendencia de PTEN como supresor de tumores ha derivado en la generación de diversos modelos murinos con el objetivo de estudiar las consecuencias de su pérdida. A continuación escribiremos brevemente los más relevantes para este estudio.

### 3.2.4.1. Modelos murinos basados en la delección de *Pten* en la línea germinal

Los modelos PTEN homocigotos son letales durante la fase embrionaria y se caracterizan por presentar defectos en el desarrollo de las 3 capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) (Di Cristofano et al., 1998).

Los modelos heterocigotos han permitido describir varias de las características observadas en los síndromes hereditarios humanos dependientes de PTEN. Los animales *Pten*<sup>+/-</sup> desarrollan tumores en múltiples tejidos incluyendo, sistema linfático, tiroides, colon, mama, endometrio y próstata, lo cual es similar al patrón de predisposición al cáncer observado en el síndrome de Cowden (Di Cristofano et al., 1998) (Suzuki et al., 1998).

La generación de modelos murinos mutantes en los que se alteran dos genes permite evaluar la interacción funcional entre lesiones genéticas individuales en el proceso de transformación. El desarrollo de estos modelos ha permitido revelar que la pérdida de expresión de *p27* colabora con la heterocigosis sistémica de *Pten* en la progresión del cáncer de próstata. Los animales *Pten*<sup>+/-</sup>;*p27*<sup>-/-</sup> desarrollan en la próstata adenocarcinomas de completa penetrancia a la edad de 3 meses (Di Cristofano et al., 2001). También se ha observado que la expresión de *Erg* en la línea germinal de animales *Pten*<sup>+/-</sup> promueve el desarrollo de adenocarcinomas, mientras que el fenotipo derivado de la haploinsuficiencia de *Pten* es característico del desarrollo de PIN (Carver et al., 2009). La pérdida sistémica de *Nkx3.1* y de *Pten* también colaboran en la progresión del cáncer de próstata observándose con la pérdida simultánea una



aceleración del fenotipo tumoral (*Kim et al., 2002*). Este modelo desarrolla adenocarcinoma de próstata con presencia de metástasis en los nódulos linfáticos (*Abate-Shen et al., 2003*).

### 3.2.4.2. Modelos murinos basados en la delección de *Pten* de forma específica en el tejido prostático

Con el objetivo de analizar las consecuencias de la pérdida de PTEN en un contexto tisular específico se han desarrollado diversos modelos murinos condicionales (*revisado en Nardella et al., 2010*). Describiremos a continuación algunos de los modelos murinos condicionales de próstata generados en base a la delección de *Pten*.

#### 3.2.4.2.1. Delección basada en la expresión del receptor de andrógenos (AR)

Los modelos murinos que describiremos en este apartado consiguen la delección específica de tejido de *Pten* mediante el cruce de animales *Pten*<sup>loxP/loxP</sup> con animales transgénicos Probasin-Cre (PB-Cre). Los animales transgénicos PB-Cre expresan la enzima Cre recombinasa abajo el control del promotor dependiente de andrógenos ARR2 probasina. La expresión de Cre se produce específicamente en el epitelio prostático tras la pubertad (*Wu et al., 2001*).

La generación de modelos murinos en los que la única alteración genética es la pérdida de *Pten* en el epitelio prostático ha permitido poner de manifiesto su relevancia y su potencial mecanismo en la supresión de tumores de este tejido. Los animales *Pten*<sup>pc-/-</sup> presentan a las 9 semanas lesiones HGPIN con un 50-60% de penetrancia, mostrando un rápido establecimiento del tumor tras la escisión de *Pten* (*Chen et al., 2005*). Este modelo ha permitido describir que la delección aguda de *Pten* por debajo del umbral de la heterocigosidad da lugar a una respuesta celular senescente (denominada PICS, *Pten-induced cellular senescence*), lo cual podría explicar porque en el cáncer de próstata humano en fases iniciales no selecciona la pérdida completa de PTEN (*Dahia, 2000*). Estudios posteriores han revelado parcialmente el mecanismo, la relevancia y la implicación terapéutica de la activación de esta respuesta celular (*Chen et al., 2009*) (*Alimonti et al., 2010*) (*Di Mitri et al., 2014*). Tras evadir la senescencia, las lesiones HGPIN progresan a adenocarcinoma invasivo con penetrancia completa a los 6 meses de edad (*Chen et al., 2005*).

El empleo de modelos murinos modificados genéticamente ha permitido mostrar la relevancia de *Pten* y las consecuencias de la alteración en su dosis en el desarrollo del cáncer de próstata. El análisis de una serie de ratones mutantes condicionales hipomórficos para *Pten* (*Pten* heterocigoto, *Pten* hipomórfico y *Pten* knock-out) ha revelado que cambios mínimos en sus niveles impactan en el fenotipo tumoral desarrollado (*Trotman et al., 2003*). La pérdida de un alelo de *Pten* se asocia con el

desarrollo de HGPIIN con penetrancia incompleta tras una larga latencia (9 meses), mientras que la reducción de los niveles de *Pten* hasta el 30% (modelo hipomórfico) permite el desarrollo de adenocarcinoma invasivo de próstata de penetrancia incompleta (Trotman *et al.*, 2003). Este resultado además pone de manifiesto el mecanismo de haploinsuficiencia ejecutado por PTEN en la supresión del cáncer de próstata. La observación de la haploinsuficiencia de PTEN en el desarrollo tumoral ha llevado a proponer que este gen ejecuta un mecanismo de supresión tumoral continuo. El modelo de supresión tumoral continuo se contrapone al modelo de dos eventos (“two hit hypothesis”), en el que con el objetivo de permitir la progresión tumoral el gen tiene que perder ambos alelos (Carracedo *et al.*, 2011) (Berger and Pandolfi, 2011) (Santarosa and Ashworth, 2004).

En otros modelos generados con diferente fondo genético se ha observado que la inactivación condicional de *Pten* en la próstata murina promueve el desarrollo de cáncer de próstata invasivo que progresa y desarrolla metástasis en el pulmón (Wang *et al.*, 2003), cuestión que no se ha observado en otros modelos (Chen *et al.*, 2005) (Abate-Shen *et al.*, 2003). Esta diferencia puede ser debida a la diferencia en el fondo genético, que se ha demostrado influye sobre el fenotipo tumoral dirigido por la pérdida de *Pten* (Freeman *et al.*, 2006).

Por otra parte, también se han generado diversos modelos murinos en los que se han introducido lesiones genéticas adicionales con el objetivo de estudiar su potencial cooperación con la pérdida de *Pten* en la supresión del cáncer de próstata. En la mayoría de estos modelos se observa que la introducción de una lesión genética adicional incrementa la agresividad del fenotipo tumoral (Ittmann *et al.*, 2013). Describiremos a continuación las combinaciones genéticas y los fenotipos observados.

La sobre-expresión de *Erg* en un modelo murino deficiente para *Pten* acelera la progresión del cáncer de próstata dirigido por la pérdida de *Pten*. El examen de estos tumores detecta la presencia de adenocarcinomas a las 12-15 semanas y adenocarcinomas invasivos y carcinomas sarcomatoides a las 25-30 semanas (Chen *et al.*, 2013). También se han generado animales transgénicos *Erg* mediante el empleo de un cromosoma de bacteria artificial (BAC) recombinante que incorpora el promotor TMPRSS2. Estos animales cruzados con animales *Pb-Cre4; Pten<sup>flox/flox</sup>* generan una descendencia *TMPRSS2-ERG;Pten<sup>pc+/-</sup>*, característicos por desarrollar lesiones PIN muy similares en número y severidad a las desarrolladas por animales del genotipo *Pten<sup>pc+/-</sup>* (Casey *et al.*, 2012).

La pérdida de *Pten* y la sobreexpresión de *Sox9* condicionales de la próstata colaboran en la progresión del cáncer de este tejido (Thomsen *et al.*, 2010). La pérdida de un alelo de *Pten* junto con la sobreexpresión de *Sox9* provocan el desarrollo de adenocarcinomas invasivos a las 52 semanas mientras que la pérdida bialélica de *Pten*

asociada con la sobreexpresión de Sox9 acelera este fenotipo, llegando a desarrollar adenocarcinomas altamente invasivos a la edad de 12 semanas (Thomsen et al., 2010).

La pérdida completa de *Pten* junto con la sobre-expresión de MYC provoca el desarrollo de lesiones neoplásicas de características muy similares a las desarrolladas por los animales deficientes para *Pten* en la próstata observándose lesiones microinvasivas (Clegg et al., 2011)

La expresión del mutante *K-ras* G12D/WT) en conjunto con la delección en homocigosis de *Pten* en la próstata demuestra la cooperación entre estos genes. Mientras que la activación de *RAS* no es suficiente para promover la transformación maligna en la próstata, la combinación de la delección de *Pten* y la activación de *RAS* promueve la aceleración de la progresión del cáncer de próstata derivado de la pérdida de *Pten* (Thomsen et al., 2010). Los animales presentan adenocarcinoma a las 10 semanas que progresa hasta desarrollar cáncer metastático en los pulmones con una penetrancia total (Thomsen et al., 2010).

*p53* es uno de los genes supresores de tumores más habitualmente mutado en cánceres humanos, sin embargo la delección de *p53* como única alteración genética no da lugar al desarrollo de ningún fenotipo tumoral en la próstata (Chen et al., 2005). Sin embargo la pérdida completa de *p53* en concomitancia con la pérdida completa de *Pten* deriva en la aparición de cáncer de próstata invasivo a la edad de 2 semanas tras la delección. Este modelo (*Pten*<sup>pc/-</sup>; *Trp53*<sup>pc/-</sup>) se caracteriza por presentar adenocarcinoma invasivo letal a los 7 meses de vida. En el contexto genético de la pérdida completa de *Pten* se observa que se reduce la supervivencia de los animales en función de la dosis de *p53* perdida (Chen et al., 2005). Se han generado otros modelos que presentan simultáneamente la delección en homocigosis de *Pten* y *p53* (Martin et al., 2011). Este simultáneamente la delección en homocigosis de *Pten* y *p53*. Este modelo, en línea con el descrito anteriormente, desarrolla adenocarcinomas que provocan la letalidad a los 6 meses (Martin et al., 2011).

La delección en homocigosis *Smad4* y *Pten* en la próstata murina deriva en el desarrollo de cáncer de próstata metastático y letal de total penetrancia con metástasis regionales en los nódulos linfáticos y pulmones (Ding et al., 2011).

La generación de animales con la delección en homocigosis del factor de transcripción *Lrf* (*Pokemon*) y *Pten* ha permitido observar que los animales dobles *knock-out* presentan una dramática aceleración del fenotipo tumoral observado tras la pérdida de *Pten* (Wang et al., 2013a). La inactivación de *Lrf* en el contexto de la pérdida de *Pten* promueve la evasión de la respuesta de senescencia y desarrolla tumores invasivos de próstata letales a los 11 meses (Wang et al., 2013).

Los animales empleados en el presente trabajo derivan del laboratorio del Doctor Pier Paolo Pandolfi. El modelo empleado se ha generado sobre un fondo genético 129sv/C57Bl6, donde la expresión de la enzima Cre recombinasa, bajo el control del promotor de probasina (ARR2), se refleja en la escisión de los exones 4-5 de los alelos del gen *Pten* (Chen *et al.*, 2005). El empleo de este promotor limita la expresión de Cre a los tres lóbulos prostáticos (próstata anterior (AP), próstata ventral (VP) y próstata dorsolateral (DLP)), con una tasa de recombinación mínima en las vesículas seminales (Wu *et al.*, 2001).

### 3.2.4.2.2. Deleción de *Pten* en otros compartimentos celulares

También se han desarrollado otros modelos murinos condicionales de próstata en los que la deleción de *Pten* no depende de la expresión de andrógenos. A continuación describiremos brevemente algunos de ellos.

La deleción de *Pten* se ha empleado para estudiar el origen celular del cáncer de próstata en modelos murinos. Con este objetivo se ha generado un modelo murino en el que la expresión de la enzima Cre recombinasa, inducible por tamoxifen, se encuentra bajo el control del promotor de Nkx3.1 (Nkx3.1<sup>CreERT2</sup>), limitando su expresión a las células luminales del epitelio prostático (Wang *et al.*, 2009). La deleción bialélica de *Pten* bajo el control este promotor promueve el desarrollo de adenocarcinoma microinvasivo a los 3 meses. El empleo del promotor CK5 permite la deleción específica en las células luminales. La deleción de *Pten* inducible por tamoxifen bajo este promotor (CK5<sup>CreERT2</sup>) muestra la presencia de adenocarcinoma invasivo a los 6 meses (Wang *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que tanto células basales como epiteliales pueden ser el origen del cáncer de próstata.

La inactivación simultanea de *Nkx3.1* y *Pten* bajo el promotor Nkx3.1<sup>CreERT2</sup> promueve la aparición de HGPIN con adenocarcinoma a los 20 meses de vida, sin embargo la castración en este modelo provoca la aparición a los 17 meses de lesiones de adenocarcinoma con diferenciación escamosa focal (Floc'h *et al.*, 2012). La adición en este modelo de un alelo oncogénico BRAF<sup>V600E</sup> inducible por la expresión de Cre ha mostrado la cooperación entre la pérdida de *Pten* y la sobreexpresión de *Braf* en la progresión del cáncer de próstata. La convergencia de ambas alteraciones genéticas promueve el desarrollo de adenocarcinomas a las 35 semanas, de los cuales el 30% progresarán a cánceres metastáticos (Wang *et al.*, 2012).

## 4. LKB1

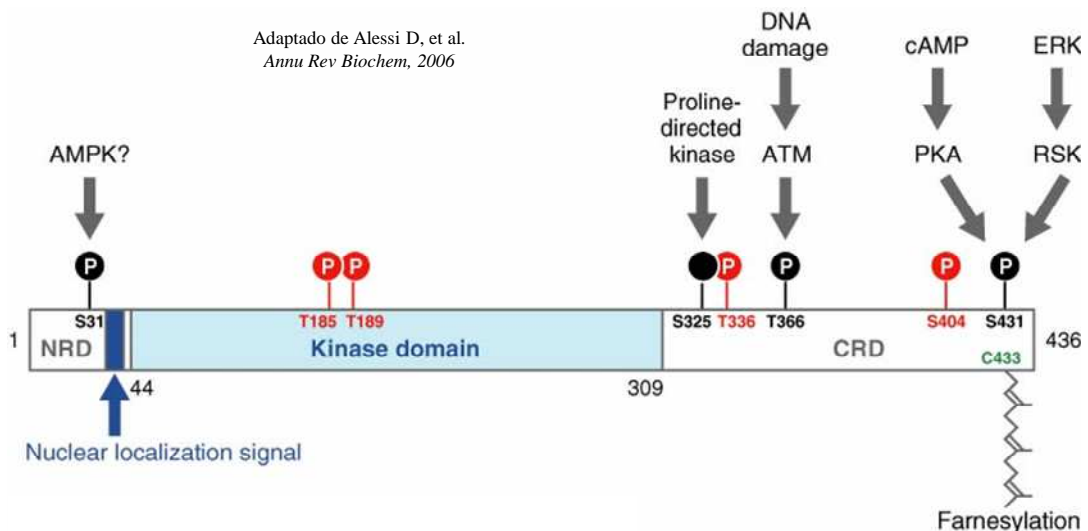
### 4.1. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA LKB1

El gen LKB1/STK11 (del inglés, “*Serine Threonine Kinase 11*”) se encuentra localizado en la región cromosómica 19p13.3 (Hemminki *et al.*, 1997). Existe una única isoforma de LKB1 en el genoma que se expande a lo largo de 23 kb y se compone de 10 exones, 9 de ellos codificantes (Jansen *et al.*, 2009). El gen codifica un RNA mensajero de  $\approx 2,4$  kb que se transcribe en dirección telómero-centrómero y da lugar a una proteína de 433 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 48 kDa (Fan *et al.*, 2009). Estudios de alineación génica han mostrado que LKB1 no tiene correlación cercana con otras quinasas del genoma humano, pero sí que se ha detectado similitud con los genomas de *M. Musculus*, *D. melanogaster* y *C. elegans* (Jansen *et al.*, 2009). LKB1 se expresa, a diferentes niveles en todos los tejidos humanos, durante el desarrollo y en adultos (Hemminki *et al.*, 1998) (Jenne *et al.*, 1998).

La proteína, que presenta actividad serina-treonina quinasa, se compone del dominio no catalítico N-terminal, el dominio quinasa (residuos 44-309) y un dominio no catalítico C-terminal (**Fig. 15**). El dominio N-terminal contiene dos secuencias de localización nuclear (NLS, del inglés “*Nuclear Localization Signals*”). De hecho LKB1, tanto la proteína endógena como la sobrepresada, se puede localizar tanto en el núcleo como en el citoplasma (Jansen *et al.*, 2009). Hay una serie de residuos que son tanto autofosforilados (Thr185, Thr189, Thr336 Ser404) como fosforilados por otras quinasas (Ser31, Ser325, Thr366 y Ser431) y los residuos cercanos están altamente conservados en *D. melanogaster*, *X. laevis* y mamíferos (Alessi *et al.*, 2006). La región C-terminal contiene una secuencia consenso caja-CAAX que es un lugar de prenilación (Cys433). La adición de dos grupos farnesil en este punto permite la inserción en la membrana plasmática. Se ha descrito que LKB1 se encuentra prenilada en células en cultivo y, al menos en sistemas invertebrados, se ha mostrado anclada a la membrana citoplasmática (Collins *et al.*, 2000) (Sapkota *et al.*, 2001).

En la próstata de ratón se ha descrito la existencia de una variante de *splicing* más corta para LKB1, la cual presenta el extremo C-terminal en el residuo 39. Se ha descrito que esta variante desempeña un papel en la espermiogénesis *in vivo* (Denison *et al.*, 2009).

Adaptado de Alessi D, et al.  
*Annu Rev Biochem*, 2006



**FIGURA 15. Estructura y modificaciones postraduccionales de la proteína *Lkb1* de ratón.** Los sitios de autofosforilación están marcados en rojo y los fosforilados por otras dianas en negro. El lugar de farnesilación está marcado en verde. Los residuos Thr366, Ser404, Ser431 y Cys433 de la proteína del ratón corresponden con los residuos Thr366, Ser402, Ser428 y Cys430 de la humana.

## 4.2. EL COMPLEJO LKB1:STRAD:MO25

LKB1 ha sido hallada en mamíferos en un complejo junto con otras dos proteínas denominadas STRAD (del inglés “*STE-20-related ADaptor protein*”) y MO25 (del inglés “*MOuse protein 25*”) (Boudeau et al., 2003) (Baas et al., 2003). El genoma humano codifica dos isoformas de STRAD denominadas STRAD $\alpha$  y STRAD $\beta$  (Alessi et al., 2006), ambas se han clasificado como “pseudoquinasas” ya que carecen de ciertos residuos clave para la actividad catalítica (Rajakulendran and Sicheri, 2010). STRAD $\alpha$  no se autofosforila ni fosforila ningún sustrato probado (Baas et al., 2003). El dominio pseudoquinasa de STRAD se une directamente al dominio quinasa de LKB1, aumentando la actividad catalítica alrededor de 100 veces (Boudeau et al., 2004) (Boudeau et al., 2003). También MO25 tiene dos isoformas conocidas como MO25 $\alpha$  y MO25 $\beta$  (Alessi et al., 2006) (Boudeau et al., 2003). Las isoformas de MO25 interactúan con el motivo C-terminal WEF (Trp-Glu-Phe) de STRAD estabilizando la interacción entre LKB1 y STRAD (Boudeau et al., 2003). Al contrario que la mayoría de quinasas, LKB1 no se activa mediante la fosforilación de su *T-loop* de activación por parte de una quinasa. En su lugar, LKB1 se activa tras la unión con STRAD (Baas et al., 2003).

Los complejos LKB1:STRAD:MO25 se pueden aislar de células de mamíferos en los cuales los tres componentes se encuentran en una estequiometría similar. Tras su sobreexpresión en células de mamífero LKB1 se localiza en el núcleo, aunque una pequeña fracción se detecta en el citoplasma de manera reproducible (Nezu et al., 1999) (Tiainen et al., 2002). Sin embargo se relocaliza en el citoplasma si se co-expresa con MO25 y STRAD (Baas et al., 2003) (Baas et al., 2004).

### 4.3. LAS FUNCIONES DE LKB1 COMO QUINASA MAESTRA

AMPK fue el primer sustrato directo de LKB1 identificado (*Hawley et al., 2003*) (*Woods et al., 2003*). La activación de AMPK se produce en respuesta a la bajada de niveles de ATP intracelulares con el objetivo de restablecer la homeóstasis energética (*Shackelford and Shaw, 2009*). LKB1 activa también otros 13 miembros (BRSK 1 y 2; NUAK 1, 2 y 3; SIK 1, 2 y 3; MARK 1, 2, 3 y 4; SRNK) de la familia de quinasas AMPK-RK (del inglés, “AMPK-Related Kinases”) (*Lizcano et al., 2004*) (*Jaleel et al., 2005*). La familia AMPK-RK está compuesta por AMPK y por una serie de proteínas que fueron identificadas por primera vez a través de su homología con la secuencia del dominio quinasa de AMPK (*Manning et al., 2002*). Estos hallazgos sugieren que LKB1 actúa como una quinasa maestra que activa diversos miembros de la subfamilia AMPK-RK que potencialmente podrían mediar en multitud de efectos fisiológicos (*Alessi et al., 2006*).

#### 4.3.1. AMPK

AMPK (del inglés “AMP-activated protein kinase”) es un heterotrímero compuesto de una subunidad catalítica (AMPK $\alpha$ ) y dos subunidades reguladoras (AMPK $\beta$  y AMPK $\gamma$ ) (*Shackelford and Shaw, 2009*). El AMP activa el complejo AMPK mediante la unión a los dominios CBS situados en la subunidad AMPK $\gamma$  (*Scott et al., 2004*). La unión provoca un cambio alostérico que estimula la fosforilación del residuo treonina 172 (Thr172) localizado en el *T-loop* de activación en ambas subunidades catalíticas de AMPK $\alpha$  en mamíferos, AMPK $\alpha$ 1 y AMPK $\alpha$ 2 (*Hardie, 2004*) (*Carling, 2004*). Se ha demostrado que LKB1 es la principal quinasa que fosforila el *T-loop* de activación de AMPK $\alpha$  en condiciones de estrés energético tanto en *C. elegans* como en *D. Melanogaster* y *M. Musculus* (*Carling et al., 2008*). La activación de AMPK por AMP sucede a través de dos mecanismos. EL AMP activa AMPK directamente por un mecanismo alostérico en el cual la unión a la subunidad  $\gamma$  reguladora activa el cambio conformacional, y de manera indirecta mediante la reducción de la desfosforilación del residuo Thr172 por proteínas fosfatasas no descritas. La combinación de ambos mecanismos deriva en un incremento de más de 1000 veces en la actividad quinasa (*Suter et al., 2006*).

AMPK se activa en situaciones en las que se reduce el nivel celular de ATP, lo cual se produce en respuesta al estrés celular producido por situaciones tales como la hipoxia/isquemia, la privación de nutrientes o la contracción muscular/ejercicio. La activación de AMPK recupera los niveles energéticos a través de la estimulación de rutas metabólicas catabólicas, como la fosforilación oxidativa, la glicolisis y la oxidación de ácidos grasos, a la vez que inhibe procesos anabólicos consumidores de energía, como la síntesis de proteínas (*Hardie et al., 2012*) (**Fig. I6**). La activación de AMPK tiene diversos efectos en el metabolismo celular (*Mihaylova and Shaw, 2011*). Los efectos agudos incluyen el incremento del transporte de glucosa y la activación de la oxidación de ácidos grasos mediante la fosforilación de reguladores metabólicos

(Jansen *et al.*, 2009). La activación repetida o prolongada de AMPK se asocia con un incremento en la expresión de enzimas involucradas en la oxidación de la glucosa y de los lípidos y en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Jansen *et al.*, 2009).

La activación de AMPK por LKB1 se ha asociado al control del metabolismo y del crecimiento a través de la regulación negativa del complejo 1 de señalización mTOR (mTORC1) (Shackelford, 2013). mTORC1 es un integrador central de los estímulos provenientes de las variaciones en los niveles nutricionales y en los factores de crecimiento disponibles, mediante este mecanismo controla la proliferación y el fenotipo metabólico celular en todos los eucariotas, encontrándose desregulado en la mayoría de los cánceres humanos (revisado en (Dibble and Manning, 2013)). El complejo mTOR se presenta en dos subcomplejos funcionalmente independientes que responden a diferentes estímulos, mTORC1 y mTORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006). El complejo mTORC1 incluye la subunidad RAPTOR, que actúa como proteína de anclaje reclutando los sustratos sobre los que actúa mTORC1, tales como el factor de iniciación de la traducción 4E-BP1 y la quinasa ribosomal S6, que contribuyen a una eficiente regulación de la traducción de proteínas (Holz *et al.*, 2005) y (revisado en Laplante and Sabatini, 2012) (**Fig. I6**) (**Fig. R9**). AMPK inhibe mTORC1 a través de la fosforilación directa del complejo TSC2 y a través de la proteína de anclaje de mTORC1 RAPTOR (no marcado en la Fig. I6) resultando en un descenso de la señalización de la vía que controla el fenotipo metabólico y el crecimiento celular (**Fig. I6**) (**Fig. R9**).

En contrapartida, se ha observado que la ausencia de LKB1 sensibiliza a las células ante activación de AMPK. Se ha postulado que en condiciones de estrés energético las células carentes de LKB1 no son capaces de detectar el descenso en los niveles de ATP lo que deriva en un estado de crisis metabólica y en la activación de las vías apoptóticas (Shaw *et al.*, 2004). Estos resultados han hecho pensar que la activación farmacológica de AMPK podría tener un efecto proapoptótico en el tratamiento de los tumores deficientes en LKB1, tal como se ha demostrado para la fenformina (Shackelford *et al.*, 2013)

En el contexto del cáncer, estudios realizados en linfoma han demostrado que AMPK es un regulador negativo del efecto Warburg y que suprime el crecimiento tumoral *in vivo* (Faubert *et al.*, 2013). En 1924, Otto Warburg observó que las células tumorales consumen unas cantidades de glucosa mucho mayores que las células normales y la metabolizan predominantemente a través de la glicólisis, produciendo por lo tanto, altos niveles de lactato incluso en presencia de oxígeno (Warburg *et al.*, 1927)(Warburg, 1956). Este mecanismo, que se denomina glicólisis aeróbica y se caracteriza por la conversión de glucosa a lactato incluso en presencia del suficiente oxígeno para soportar el catabolismo de la glucosa vía el ciclo de los ácidos tricarboxílicos con oxidación fosforilativa, no es exclusivo de células del cáncer. Muchas células no transformadas también muestran glicólisis aeróbica durante periodos de rápida proliferación como en fases de desarrollo embrionario y durante la curación de heridas (Lunt and Vander Heiden, 2011).



La glicólisis aeróbica ha sido observada en una amplia variedad de tumores originarios de diferentes tipos celulares. Sin embargo, la mayoría de las células normales en los tejidos adultos de las que derivan las células del cáncer generalmente no presentan este fenotipo metabólico. Por lo tanto, las células tumorales revierten su metabolismo hacia uno característico de las células que proliferan rápidamente, lo cual sugiere que este mecanismo debe facilitar ventajas para la proliferación (*Vander Heiden et al., 2009*). La glicólisis aeróbica es un modo ineficiente de generar ATP ya que genera únicamente 4 moles de ATP/mol de glucosa, al contrario que la oxidación fosforilativa que genera 36 moles de ATP/mol de glucosa. Se ha propuesto que el metabolismo de las células tumorales, y de hecho, de todas las células que proliferan rápidamente, se ha adaptado para facilitar la incorporación de nutrientes (nucleótidos, amino ácidos y lípidos) en la biomasa necesaria para producir una nueva célula (*Vander Heiden et al., 2009*). De todas maneras, se ha demostrado que la glicólisis aeróbica es únicamente uno de los componentes de la transformación metabólica células que permite una alta tasa de proliferación (*DeBerardinis et al., 2008*). Estas investigaciones han permitido poner de relevancia el papel de otras rutas metabólicas en la progresión tumoral, tales como la anaplerosis dependiente de glutamina y la síntesis *de novo* de lípidos (*DeBerardinis et al., 2008*).

### 4.3.2. Quinasas relacionadas con AMPK

Se ha demostrado que LKB1 fosforila otros 13 miembros (BRSK 1 y 2; NUAK 1, 2 y 3; SIK 1, 2 y 3; MARK 1, 2, 3 y 4 y SNRK) de la familia de quinasas AMPK-RK (*Lizcano et al., 2004*) (*Jaleel et al., 2005*). Muchas de estas proteínas han sido implicadas en procesos de polaridad celular, tal como indicaremos a continuación mediante varios ejemplos. En algunos casos, la desregulación de estas funciones ha sido relacionada con la progresión tumoral (**Fig. I6**).

Los 4 miembros de la subfamilia MARK constituyen un grupo de proteínas evolutivamente conservadas e involucradas en la regulación de la polaridad celular a través de su capacidad para disociar las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP) de los mismos, promoviendo la desestabilización de la red (*Drewes et al., 1997*) (*Biernat et al., 2002*) (**Fig. I6**).

Las proteínas BRSK1 y 2 se expresan en el cerebro y se ejercen su función en la regulación de la polaridad neuronal (*Kishi et al., 2005*). LKB1, a través de la activación de las BRSK, controla el establecimiento de la especificación axonal, en concreto la conversión a axón cortical (*Barnes et al., 2007*). Por otra parte, BRSK1 y SIK2 en células de mamíferos son necesarias para la duplicación y separación de los centrosomas respectivamente (*Alvarado-Kristensson et al., 2009*) y (*Ahmed et al., 2010*) (**Fig. I6**).



fenformina o el incremento del calcio intracelular mediado por la contracción, no incrementan el grado de activación de las mismas (*Lizcano et al., 2004*) (*Sakamoto et al., 2004*), lo que indica que la regulación de las proteínas relacionadas es diferente a la regulación de AMPK. También se ha observado que CAMKK $\beta$  no es capaz de activar BRSK1 ni BRSK2 en respuesta al incremento en el calcio intracelular (*Bright et al., 2008*), tal como hace con AMPK, apoyando la idea de que las AMPK-RK se regulan de manera independiente a cómo lo hace AMPK.

## 4.4. LKB1: IMPLICACIÓN EN CÁNCER

### 4.4.1. LKB1 en el desarrollo del cáncer en humanos

El gen STK11 fue clonado por primera vez como resultado de un análisis de hibridación de genómica comparativa en pacientes que padecían el síndrome de Peutz-Jeghers (PJS, del inglés “*Peutz-Jeghers Syndrome*”) (*Hemminki et al., 1997*). El síndrome se caracteriza por un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer (*Hemminki et al., 1998*), lo cual dio lugar a la identificación de LKB1 como gen supresor de tumores (*Hemminki et al., 1997*). Este síndrome se hereda de manera autosómica dominante, y se caracteriza por la aparición de hiperpigmentación mucocutánea y por el desarrollo de hamartomas gastrointestinales (*Georgescu et al., 2008*). Los pólipos tienen bajo potencial maligno y raramente muestran características de displasia (*Stojcev et al., 2013*). Sin embargo, los pacientes con PJS presentan predisposición al cáncer, desarrollando principalmente cánceres gástricos, de mama y ginecológicos (*van Lier et al., 2010*) y (*Riegert-Johnson et al., 2012*). Se ha observado que el 93% de los pacientes con PJS desarrollan tumores malignos para la edad de 65 años (*Hearle et al., 2006*).

En el contexto del cáncer de próstata estudios de secuenciación demuestran que el gen se encuentra mutado en una de las 5 líneas celulares de cáncer de próstata analizadas (*Ikedobi et al., 2006*). Los autores detectan que la línea celular DU145 presenta una delección de 5 nucleótidos (p.K178fs\*86) que da lugar al desplazamiento del marco de lectura e impide la expresión de la proteína, apuntando la relevancia de la pérdida de LKB1 en cánceres humanos. Por otra parte, mediante un estudio de secuenciación del genoma completo se ha identificado una asociación entre la agresividad en este tipo de cáncer y los segmentos cromosómicos 19q12-q13.11 (*Neville et al., 2003*), entre los cuales se localiza el gen LKB1 (19q13.3) (*Hemminki et al., 1997*).

La incidencia de tumores de próstata en pacientes con PJS es un evento raro (*van Lier et al., 2010*), posiblemente influenciado por la edad de aparición de la enfermedad, ya que este cáncer se diagnostica típicamente alrededor de la séptima década de vida mientras que los pacientes con PJS tienen esperanza de vida media de 57 años (*Yoo et al., 2002*).

### 4.4.2. Modelos murinos generados mediante la delección de *Lkb1*

Con el objetivo de estudiar el papel de LKB1 en la supresión tumoral se han generado diversos modelos murinos, describiremos a continuación los más significativos para nuestro estudio.

#### 4.4.2.1. Modelos murinos generados mediante la delección de *Lkb1* en la línea germinal

La generación de ratones *knock-out* constitutivos para *Lkb1* (*Lkb1*<sup>-/-</sup>) ha revelado que *Lkb1* es esencial para la embriogénesis. El modelo homocigoto es letal en la fase embrionaria (Ylikorkala et al., 2001). Los ratones heterocigotos generados por diferentes laboratorios (*Lkb1*<sup>+/-</sup>) sin viables y están predispuestos a padecer poliposis intestinal severa a los 8 meses de vida, desarrollando pólipos que mimetizan a los humanos (Rossi et al., 2002) (Miyoshi et al., 2002) (Bardeesy et al., 2002). Los pólipos murinos aparecen a los 4-6 meses de vida y dan lugar a letalidad a los 11 meses debido principalmente a obstrucciones. Los pólipos se caracterizan por presentar baja malignidad y son resistentes a la transformación inducida por oncogenes y a la senescencia replicativa (Bardeesy et al., 2002). El empleo de modelos murinos ha permitido demostrar que LKB1 es un gen haploinsuficiente para el desarrollo de síndromes hamartomatosos ya que los tanto los pólipos humanos (Sato et al., 2001) como los murinos (Rossi et al., 2002) (Miyoshi et al., 2002) (Bardeesy et al., 2002) retienen la expresión del alelo salvaje.

Tal como hemos indicado, el PJS está altamente asociado al riesgo de padecer cáncer, especialmente en el tracto intestinal, pancreático de mama y ginecológicos (Giardiello et al., 1987) (Hearle et al., 2006). Sin embargo los modelos *Lkb1*<sup>+/-</sup> presentan un incremento en la frecuencia de cáncer en tejido hepático (Nakau et al., 2002), óseo (Robinson et al., 2008) y endometrial (Contreras et al., 2008).

Por otra parte se ha observado que la pérdida de expresión de *p53* colabora con la heterocigosidad de *Lkb1* en el desarrollo tumoral. La pérdida sistémica combinada de *Lkb1* y *p53* reduce la supervivencia y acelera la progresión tumoral en función de la dosis de *p53* (Wei et al., 2005) (Takeda et al., 2006).

Se ha observado que los animales heterocigotos para *Lkb1* en todos sus tejidos desarrollan carcinoma hepatocelular (HCC) de manera espontánea a las 50 semanas de vida, mostrando una penetrancia del 70% en machos y 20% en hembras (Nakau et al., 2002). El análisis de los tumores ha permitido confirmar la pérdida de heterocigosidad en el 100% de los tumores examinados, lo cual apunta la posibilidad de que *Lkb1* podría tener que perder ambos alelos para permitir la transformación celular en este contexto genético (Nakau et al., 2002). Este modelo también ha permitido comprobar que la

activación adicional de  $\beta$ -catenina de forma condicional en el tejido hepático acelera la progresión tumoral. Los tumores desarrollados por estos animales también muestran la pérdida de heterocigosidad en el locus de *Lkb1* (Miyoshi et al., 2009), así como los descritos tumores hepáticos examinados los animales del genotipo *Lkb1*<sup>+/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> (Takeda et al., 2006). Estas observaciones apuntan la posibilidad de que la pérdida bialélica de LKB1 puede representar la adquisición de capacidades oncogénicas necesarias para la progresión tumoral.

Los modelos murinos también han permitido estudiar la colaboración de la pérdida sistémica de *Lkb1* con otros insultos oncogénicos en la progresión tumoral. Se ha observado que la pérdida de *Lkb1* sensibiliza a las células ante la acción de carcinógenos (Gurumurthy et al., 2008). La convergencia de ambos factores coopera en la progresión tumoral dando lugar a cáncer de células escamosas de en la piel y en los pulmones. En línea con el estudio descrito anteriormente (Miyoshi et al., 2009), este modelo también muestra la pérdida del alelo salvaje de LKB1 en los tumores examinados (Gurumurthy et al., 2008). La reparación del daño producido en el DNA por la incidencia de radiaciones solares (UVB) también se ve afectada por la deficiencia de *Lkb1*. Los animales pertenecientes al genotipo *Lkb1*<sup>+/-</sup> son hipersensibles al desarrollo de cáncer de piel provocado por la exposición a rayos ultravioleta. Se ha observado que la pérdida de *Lkb1* colabora con la radiación UVB en la progresión del cáncer de piel, dando lugar al desarrollo de cáncer epitelial de células escamosas (ESCC) (Esteve-Puig et al., 2014). Estos modelos ponen de manifiesto la relevancia de la pérdida de LKB1 como factor de riesgo ante el desarrollo de cáncer favorecido por agentes ambientales.

#### **4.4.2.2. Modelos murinos generados mediante la delección de *Lkb1* de forma específica de tejido**

Por otra parte, se han generado diversos modelos murinos condicionales de tejido. Describiremos brevemente a continuación los más relevantes para este estudio.

En el tejido pulmonar se ha observado que la pérdida completa de *Lkb1* no es capaz de iniciar la progresión tumoral. Sin embargo la pérdida, de uno o dos alelos de *Lkb1*, en combinación con la activación de *K-ras*, favorece la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis (Ji et al., 2007). En este caso la haploinsuficiencia de *Lkb1* es suficiente para promover el desarrollo tumoral en este contexto. Los tumores pulmonares presentes en este modelo se corresponden en su mayoría a cáncer de células escamosas, por lo que los autores sugieren que *Lkb1* podría tener un papel en la diferenciación tumoral (Ji et al., 2007). También se ha observado que la concurrencia de la expresión BRAF<sup>V600E</sup> y la delección condicional de *Lkb1* incrementa la frecuencia de aparición de tumores y acelera la progresión a adenomas (González-Sánchez et al., 2013). En este tejido también se ha descrito la cooperatividad con la pérdida de *Pten*. El

modelo doble *knock-out* desarrolla carcinoma de células escamosas caracterizado por una penetrancia total (Xu et al., 2014).

La inactivación bialélica en melanocitos murinos ha demostrado que esta alteración no es suficiente para iniciar el cáncer en este tejido, sin embargo coopera con la activación somática de *K-Ras* en el desarrollo de melanomas metastáticos diferenciados (Liu et al., 2012). Estos resultados se sitúan en línea con los referidos al tejido pulmonar (Ji et al., 2007).

En células epiteliales del útero la inactivación de bialélica de *Lkb1* da lugar al desarrollo de carcinoma endometrial invasivo letal. La escisión de un alelo en este modelo no es suficiente para dirigir la transformación (Contreras et al., 2010).

En el epitelio pancreático la pérdida de *Lkb1* promueve el desarrollo de tumores císticos de total penetrancia, los cuales llegan a ser letales a las 30 semanas (Hezel et al., 2008) (Morton et al., 2010). La activación constitutiva condicional del alelo mutante *Kras*<sup>G12D/+</sup> en este modelo colabora con la pérdida monoalélica de *Lkb1*, mientras que los animales que portan una única de estas lesiones génicas no desarrollan tumores (Morton et al., 2010). En este contexto genético la haploinsuficiencia de *Lkb1* es suficiente para permitir el desarrollo tumoral.

El tejido mamario se ha observado que la inactivación bialélica condicional desarrolla carcinomas con una latencia de 46-85 semanas, no así la haploinsuficiencia. Los tumores desarrollados mimetizan a tumores de mama característicos de las pacientes con PJS (McCarthy et al., 2009).

En el modelo condicional de próstata generado (Pearson et al., 2008), se observa que la delección completa de *LKB1* da lugar al desarrollo de lesiones precancerosas en la próstata (PIN). Cabe destacar que este modelo expresa la enzima Cre recombinasa bajo el control del promotor p450 CYP1A1 el cual promueve la delección en la práctica totalidad del tracto genito-urinario. El empleo de este promotor pone en duda que el fenotipo tumoral característico de este modelo sea debido al papel de *LKB1* como supresor de tumores de próstata (Pearson et al., 2008).

El desarrollo de modelos murinos modificados genéticamente ha permitido constatar que la pérdida de *LKB1* coopera con otras alteraciones genéticas en la progresión tumoral. Tal como indicábamos anteriormente la cooperatividad ha sido demostrada tanto con genes supresores de tumores (*PTEN* y *p53*) (Wei et al., 2005) (Takeda et al., 2006) (Xu et al., 2014) (Liu et al., 2012), como con oncogenes (*K-Ras* y *BRAF*) (Morton et al., 2010) (González-Sánchez et al., 2013) (Ji et al., 2007). El estudio de la cooperatividad entre *Pten* y *Lkb1* ha revelado que la expresión de un alelo hipomórfico de *Lkb1*, que reducen entre 5 y 10 veces la expresión del salvaje, no acelera el fenotipo tumoral dirigido por pérdida de una copia de *Pten* (Huang et al., 2008). Los animales *Pten*<sup>+/-</sup>; *Lkb1*<sup>hyp/-</sup> presentan a los 14 meses un fenotipo similar a los

animales *Pten*<sup>+/-</sup>, caracterizados por el desarrollo de pólipos intestinales, linfomas y carcinomas de próstata (*Huang et al., 2008*).

Los modelos murinos generados hasta ahora apuntan la posibilidad de que LKB1 pueda actuar, según el contexto tisular y las alteraciones oncogénicas presentes, como un gen haploinsuficiente o como un gen que cumple la hipótesis de dos eventos. Por otra parte, varios de estos modelos presentan la tipología de cáncer de células escamosas, apuntando la posibilidad de que LKB1 pueda tener un papel en la diferenciación tumoral. Mediante el estudio de los modelos murinos condicionales deficientes para *Lkb1* generados para esta tesis abordaremos estas cuestiones en el contexto del cáncer de próstata.





# Objetivos





LKB1/STK11 fue identificado originalmente como un gen supresor de tumores, cuya mutación es responsable del síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), que predispone al desarrollo de cáncer (Hemminki *et al.*, 1997). Estas observaciones han derivado en un gran interés en el estudio del papel de LKB1 en la supresión tumoral, poniendo de relevancia su complejidad. LKB1 regula un número importante de vías que impactan en la progresión tumoral, llegándose a describir efectos específicos de tejido (*revisado en Shorning and Clarke, 2011*). En el contexto del cáncer de próstata existe muy poca bibliografía que describa su función. Por otra parte, la aplicación clínica diaria necesita de terapias selectivas y marcadores moleculares que nos ayuden a estratificar pacientes diagnosticados de cáncer de próstata y aplicar una terapia personalizada. **Esta tesis se fundamenta en la siguiente hipótesis: LKB1 actúa como un gen supresor de tumores en el cáncer de próstata.** Hemos propuesto por tanto el objetivo general de estudiar el papel de LKB1 en el contexto biológico del cáncer de próstata y explorar mejoras terapéuticas en el tratamiento de tumores carentes de la expresión de esta quinasa. Se proponen para ello los siguientes objetivos específicos:

### **Objetivo 1: Evaluar la implicación de LKB1 en la patogénesis y progresión del cáncer de próstata**

Con el objetivo de investigar los fundamentos moleculares del cáncer de próstata estudiamos la función de LKB1 en la supresión del cáncer en este tejido, así como el mecanismo subyacente. Para ello caracterizamos especímenes humanos, modelos murinos y modelos celulares en base a las alteraciones observadas en función de la presencia/ausencia de LKB1.

1. Caracterización de la actividad de LKB1 *in vitro* e *in vivo*
2. Efectos independientes de la actividad quinasa de LKB1

### **Objetivo 2: Explorar el potencial uso de LKB1 como biomarcador predictivo en cáncer de próstata**

Con el objetivo de incrementar la eficacia de las terapias necesitamos establecer la práctica de la medicina de precisión. En el contexto del cáncer de próstata sería de utilidad establecer un protocolo en el que tras el análisis de la biopsia se pudiera predecir la respuesta terapéutica (biomarcadores predictivos). En la presente tesis doctoral abordaremos las dos estrategias que existen para la determinación de una terapia eficaz contra los que los tumores deficientes en LKB1:

1. Análisis de la vía por la que opera el gen. En este caso la regulación del metabolismo energético
2. Aplicación del concepto de letalidad sintética en la terapia contra el cáncer



# *Materiales y Métodos*





## 1. ENSAYOS *IN SILICO*

Las bases de datos utilizadas para el análisis bioinformático fueron descargadas del archivo público “*GEO profiles*” el cual se encuentra disponible en la dirección web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Código de acceso GEO	Referencia
GSE21032	(Taylor et al., 2010)
GSE35988	(Grasso et al., 2012)

**Tabla M1:** Tabla en la que se indican los códigos de acceso y las referencias de las bases de datos empleadas.

Previo a su análisis las bases de datos fueron corregidas mediante la siguiente estrategia: se eliminó el ruido de fondo, los valores de la expresión se transformaron a logaritmo 2 y se normalizaron en base a los cuartiles. En los análisis de minería de datos se empleó el test ANOVA para la comparación entre múltiples componentes y el test t de Student en la comparación entre dos grupos. Los análisis de correlación se realizaron mediante la aplicación del test paramétrico de correlación de Pearson. De este análisis se obtiene el coeficiente de Pearson (R), que cuantifica la existencia de una correlación lineal, o dependencia, entre dos variables. Los límites del coeficiente son +1 y -1, ambos inclusive, donde 1 es una relación total directamente proporcional, 0 indica no relación, y -1 es una relación total inversa. El valor de p indica la significancia de este coeficiente R. Los análisis bioinformáticos fueron realizados por Ana Rosa Cortazar (CIC bioGUNE).

### **2. ENSAYOS *IN VIVO* Y *EX VIVO***

#### **2.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS HUMANAS**

##### **2.1.1 Especímenes**

Las muestras para el microarray de tejidos se obtuvieron de 207 pacientes (206 casos de tumores de próstata y 1 caso de neoplasia intraepitelial de próstata (PIN)) sometidos a prostatectomía radical en el departamento de urología del Hospital Norte de Marsella desde enero del 2002 a diciembre del 2006. En todos los casos el paciente facilitó el consentimiento informado del uso de las muestras para investigación. Se reunió la información clínica e histopatológica correspondiente a cada muestra en la que se incluía la graduación Gleason. Todas las muestras fueron fijadas en formalina, embebidas en parafina a una temperatura controlada y almacenadas a 18-22°C. Los experimentos se realizaron de acuerdo a los principios establecidos por la declaración de Helsinki (<http://www.wma.net>) y fueron aprobados por el comité institucional de revisión de protocolos del hospital.

##### **2.1.2. Construcción del microarray de tejidos y análisis inmunohistoquímico**

Las biopsias se fijaron en bloques embebidos de parafina, posteriormente empleados como bloques donantes para construir el microarray de tejidos. Para ello se utilizaron muestras obtenidas de la parte central de las biopsias de próstata, sobre las que previamente se había delimitado el área tumoral mediante el análisis de secciones teñidas con hematoxilina-eosina. Las muestras se obtuvieron mediante el aparato de trépano (*Alphelys, Plaisir, Francia*). Las muestras cilíndricas de 0,6 mm de diámetro obtenidas del bloque donante se reordenaron en el nuevo bloque receptor de parafina (bloque del microarray de tejidos) Cada bloque contenía un total de 207 muestras (206 casos de cáncer de próstata, 1 caso de PIN, además de controles positivos y controles negativos) y se realizaron secciones de 4 µm de ancho que se transfirieron a diferentes portaobjetos de cristal silanizado. La construcción del microarray de tejidos se llevó a cabo por el personal del Hospital Norte de Marsella.

El microarray de tejidos se desparafinó e hidrató en lavados consecutivos de citrosol, etanol 100%, etanol 96% y H<sub>2</sub>O (3 lavados de 5 minutos). Tras la recuperación de antígenos inducida con calor en tampón de citrato (pH=6) durante 30 minutos, se procedió a la inactivación de la encima peroxidasa endógena mediante la incubación en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% durante 15 mins. Se incubó con una solución Avidina/Biotina (*Vector Laboratories*) durante 15 minutos, bloqueando así la biotina endógena y eliminando la tinción inespecífica. Posteriormente se bloqueó 30 mins con suero de cabra (1:50)



(Gibco, Ref: 16210) y se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-LKB1 (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Ref: sc-32245). A continuación, se incubó 30 mins a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-ratón (1:1000) (Vector Laboratories, Ref: BA-9200), seguido por el sistema de peroxidasa ABC (Vectastain ABC System Vector Laboratories). DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Sigma Aldrich) se utilizó como sustrato colorimétrico y los portaobjetos se contra-tiñeron con hematoxilina. En la deshidratación se realizaron lavados consecutivos con H<sub>2</sub>O, etanol 96%, etanol 100% y citrosol, para finalmente colocar el cubreobjetos. Los controles negativos y positivos consistieron en *pellets* celulares de la línea DU145-pBABE y de la línea DU145-pBABE LKB1. El procesamiento y tinción del *microarray* de tejidos se llevó a cabo por Sonia Fernandez (CIC bioGUNE)

El análisis inmunohistoquímico del *microarray* de tejidos se realizó mediante la medida semicuantitativa de la expresión de LKB1, a través de la puntuación inmunorreactiva establecida. Los niveles de expresión se trataron como variables ordinales, estableciéndose tres categorías: 0 (tinción negativa, no expresión), 1 (tinción débil, expresión baja) y 2 (tinción fuerte, expresión alta). El análisis inmunohistoquímico del *microarray* de tejidos fue realizado por el Dr. Stéphane Garcia del departamento de Urología del Hospital Norte de Marsella. Para el análisis de correlación entre el nivel de expresión de LKB1 y el grado de agresividad del tumor, las muestras fueron clasificadas en base a la escala de Gleason, aplicándose posteriormente el test estadístico paramétrico *chi*-cuadrado.

## 2.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS MURINAS

### 2.2.1 Animales de experimentación

Los animales empleados en el establecimiento de la colonia analizada en el presente trabajo fueron donados generosamente por el laboratorio del Dr. Pier Paolo Pandolfi o por el *Mouse Models of Human Cancer Consortium* (MMHCC; *Lkb1*<sup>lox/lox</sup>), a partir de los cuales mediante la siguiente estrategia de cruces generamos la colonia de interés. Partimos de las líneas de ratones transgénicas *Lkb1*<sup>lox/lox</sup> (fondo genético FVB) y BL6/129;*Pb-Cre4Pten*<sup>lox/lox</sup> (fondo genético mixto C57/BL6 y 129sv). Con el objetivo de obtener animales de fondo genético enriquecido en C57/BL6 (estimado 93% C57/BL6) cruzamos ratones *Lkb1*<sup>lox/lox</sup> con ratones salvajes de la línea murina C57/BL6. Finalmente, cruzamos machos BL6/129;*Pb-cre4Pten*<sup>lox/+</sup> con hembras BL6/FVB;*Lkb1*<sup>lox/+</sup>, dando lugar a la siguiente progenie: *Pb-cre4Pten*<sup>+/+</sup>*Lkb1*<sup>+/+</sup>, *Pb-cre4Pten*<sup>+/+</sup>*Lkb1*<sup>lox/+</sup>, *Pb-cre4Pten*<sup>+/+</sup>*Lkb1*<sup>lox/lox</sup>, *Pb-cre4Pten*<sup>lox/+</sup>*Lkb1*<sup>+/+</sup>, *Pb-cre4Pten*<sup>lox/+</sup>*Lkb1*<sup>lox/+</sup> y *Pb-cre4Pten*<sup>lox/+</sup>*Lkb1*<sup>lox/lox</sup>.

A partir de esta fuente inicial se generó una colonia estable en el estabulario de CIC bioGUNE, de donde proceden los ratones utilizados en nuestros estudios. La

colonia fundadora se cruzó durante al menos tres generaciones con el objetivo de asegurar un fondo genético homogéneo. Los animales fueron estabulados en jaulas de ambiente controlado (ciclos constantes de 12 horas de luz y oscuridad,  $22 \pm 2$  °C de temperatura y 30-50% de humedad relativa). Los animales eran alimentados *ad libitum* con piensos comerciales completos. Previo a la extracción de tejidos, con el objetivo de prevenir alteraciones metabólicas relacionadas con la ingesta inmediata, los animales eran ayunados durante 6 horas. El cuidado y tratamiento de los animales se realizó siguiendo la legislación vigente en “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos”, de acuerdo con las normas de la Unión Europea (O.J. de E.C. L358/1 18/12/1986). Los experimentos llevados a cabo con animales han sido aprobados por el comité de bioética y bienestar animal de CIC bioGUNE, habiendo sido desarrollados siguiendo las normas éticas establecidas.

### 2.2.2 Métodos

#### 2.2.2.1. Genotipado de ratones

El genotipado de las camadas de ratones fue realizado a los 21 días de su nacimiento, a partir de DNA extraído de la cola. Para la obtención del DNA se cortó un fragmento de la cola ( $\approx 4$  mm) al cual se añadieron 3 mls de solución de extracción de DNA (NaCl 100mM, Tris-HCl 50 mM pH=8, EDTA 25 mM, SDS 0,5%) con proteinasa K (*Fluka*). La incubación se realizó a 55 °C durante 4 horas en agitación. Tras ello fueron añadidos 200  $\mu$ l de solución fenol/cloroformo/isoamil (25:24:1), mezclándose repetidamente por inversión, tras lo cual se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos. Finalmente la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo *eppendorf*. Se añadieron 15  $\mu$ l de acetato de sodio (3M) y 1 ml de etanol 100%, se mezcló por inversión y se añadieron 400  $\mu$ l adicionales de etanol 100%. La incubación se realizó durante toda la noche a -20°C para facilitar la precipitación de DNA. La solución DNA:etanol se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante el DNA se dejó secar 2-3 minutos previo a la resuspensión en 200  $\mu$ l de solución H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Para realizar el genotipado, el DNA extraído de la cola (1  $\mu$ l) fue sometido a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con la DNA polimerasa *AccuStart™ II PCR SuperMix* (*Quanta Biosciences*). La extracción de DNA y genotipado fueron realizados por Pilar Sanchez-Mosquera y Sonia Fernandez (CIC bioGUNE).

Gen	Secuencia cebadores
<b>Cre</b>	5' - GGTGCAAGTTGAATAACCGGA - 3' 3' - CGCGACCTCAAAGTTATGGC - 3'
<b>Lkb1</b>	5' - GGGCTTCCACCTGGTGCCAGCCTGT - 3' 5' - GAGATGGGTACCAGGAGTTGGGGCT - 3' 3' - CGGCTCCTACTGCTACTCGCGTAACAATCT - 5'
<b>Pten</b>	5' - TGTTTTTGACCAATTAAAGTAGGCTGTG - 3'

	3'- TGTTTAGTAGTCGTCGCCCTTGAAAA - 5'
--	-------------------------------------

**Tabla M2:** Tabla en la que se indican los cebadores empleados en la PCR para el genotipado de los ratones

Temperatura/Gen	Cre	Lkb1	Pten
<b>T<sup>a</sup> desnaturalización (ciclo 1)</b>	95°C 5 min	95°C 5 min	95°C 5 min
<b>T<sup>a</sup> desnaturalización</b>	94°C 30 seg	94°C 30 seg	94°C 30 seg
<b>T<sup>a</sup> alineación</b>	58°C 30 seg	65°C 30 seg	58°C 30 seg
<b>T<sup>a</sup> elongación</b>	72°C 1 min	72°C 30 seg	72°C 1 min
<b>T<sup>a</sup> elongación (último ciclo)</b>	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min
<b>T<sup>a</sup> final</b>	4°C infinito	4°C infinito	4°C infinito
<b>Número de ciclos</b>	40	40	40

**Tabla M3:** Tabla en la que se indican las condiciones empleadas en la PCR para el genotipado de los ratones

### 2.2.2.2. Análisis de supervivencia

Para los estudios de supervivencia se monitorizó la letalidad de los genotipos de interés (o la aplicación de puntos finales humanitarios). En todos los casos los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. En este momento se practicó la necropsia, la extracción y el pesaje de los diferentes tejidos para su posterior examen histológico y patológico. Los tumores localizados fueron medidos registrándose características macroscópicas tales como peso, vascularización, forma, consistencia, color y localización de la masa tumoral en la cavidad peritoneal así como el grado de adhesión a los órganos adyacentes. Paralelamente se analizó la presencia de metástasis en hígado y pulmón. Los tejidos recogidos fueron examinados mediante estudios patológicos e inmunohistoquímicos. La supervivencia se calculó a partir de la fecha de nacimiento y de muerte o punto final humanitario de cada animal (hasta un máximo de 18 meses de edad). El conjunto de datos se analizó a través del método Kaplan-Meier.

### 2.2.2.3. Caracterización de los ratones a los 6 meses de vida

Los animales de los genotipos de interés se criaron y asignaron a los grupos experimentales, sometidos a eutanasia a los 6 meses de edad. Los tumores localizados fueron procesados mediante el protocolo empleado para el análisis de supervivencia. Paralelamente se analizó la presencia de metástasis en hígado y pulmón. Los tejidos recogidos fueron analizados mediante estudios patológicos e inmunohistoquímicos

### 2.2.2.4. Análisis patológico de tejidos murinos

El tejido escogido para su análisis patológico era introducido inmediatamente en formalina 10% durante 24 horas en el momento de su extracción. La posterior deshidratación se realizó mediante incubaciones de 10 minutos, con alcohol 70%, 90% y alcohol absoluto hasta tratar dos veces con parafina líquida. Tras dejar toda la noche en un tercer cambio de parafina a 60 °C, se procedió a la inclusión de las muestras, mediante la colocación del tejido en moldes metálicos con parafina líquida que se enfriaban colocándolos en placas metálicas a -10 °C. Los bloques se almacenaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz hasta el momento de obtener las secciones.

Las muestras incluidas en parafina se procesaron para obtener secciones de 5 µm de grosor. Con el objetivo de eliminar la parafina, las muestras se calentaron a 65 °C durante 30-45 minutos y a continuación se incubaron durante 7-10 minutos con xileno. Seguidamente, los restos de xileno se eliminaron y el tejido se hidrató mediante la incubación en alcoholes a concentraciones menguantes. Los lavados consistían en inmersiones en: alcohol absoluto (dos cambios de tres minutos), alcohol 90% (5 minutos), alcohol 70% (3-5 minutos) y finalmente H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Para su análisis patológico, las muestras se contrastaron mediante hematoxilina/eosina. El procesamiento y tinción de las muestras fue llevado a cabo por Sonia Fernandez (CIC bioGUNE).

Las secciones de los tumores fueron analizadas a diferentes aumentos (10-40X). En cada una de las muestras se valoró la presencia de cáncer primario en la próstata o de focos de metástasis en el pulmón, nódulos linfáticos y hueso largo (tibia y peroné). El examen patológico de las muestras fue llevado a cabo por la Dra. Juana María Flores (Universidad Complutense de Madrid).

### 2.2.2.5. Estudio de la expresión génica en la próstata murina

El RNA se obtuvo a partir del lóbulo anterior de la próstata de ratones *Lkb1*<sup>pc+/+</sup> y *Lkb1*<sup>pc-/-</sup> de 12 meses de edad. Los lóbulos prostáticos eran congelados en nitrógeno líquido durante la necropsia, con el fin de preservarlos de la acción de las RNAsas. Previo a la extracción de RNA, el tejido se trató con *RNA Later*<sup>TM</sup> (Ambion®) durante 16 horas a -80 °C y tras lo cual se procedió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.2.5.

### 3. ENSAYOS IN VITRO

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares humanas de carcinoma de próstata, DU145, PC3 y LnCaP, empleadas en este trabajo fueron adquiridas, con el consiguiente certificado de autenticación, del Instituto *Leibniz DSMZ* (“*Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*”) y las líneas RWPE1, PWR-1E, C-42 y 22RV1 de la ATCC (“*American Type Culture Collection*”). La línea VCaP fue donada generosamente por el laboratorio de Dr. R. Kypta (CIC bioGUNE) y la línea empaquetadora de virus 293FT por el laboratorio de la Dra. R. Barrio (CIC bioGUNE). Los experimentos se realizaron con células cultivadas hasta un máximo de 30 pases. Las células se mantenían en el incubador *Hera cell 150i* (*Thermo Scientific*), a 37°C con un porcentaje de CO<sub>2</sub> del 5% en una atmósfera humidificada. Las células se cultivaron en el medio correspondiente (**Tabla M4**), suplementándose con un 1% de penicilina/estreptomicina (*Gibco*) y con un 10% de suero fetal bovino ((SFB) inactivado proveniente de un único lote (*Gibco*)). Excepto las líneas primarias RWPE1 y PWR-1E, completadas con extracto pituitario bobino y EGF humano recombinante, según las instrucciones del proveedor (*Gibco, ref 37000-015*). El medio de cultivo se cambió regularmente cada 2 días hasta que las células habían crecido lo suficiente para sembrar experimentos o para ser subcultivadas. En el mantenimiento regular de las células se usaron platos de cultivo de 100 mm de diámetro. En la ejecución de los experimentos se emplearon platos de diferentes formatos según el diseño. Para la siembra las células eran incubadas en una solución tripsina-EDTA al 0.25% (*Gibco*) durante 3 minutos a 37°C para ser resuspendidas en medio de cultivo completo. Con el objetivo de mantener los cultivos celulares las células se crecieron hasta llegar a un 80-90% de confluencia y se dividieron a una dilución de 1:3-1:10 según la línea celular. Las células se analizaron regularmente por PCR con el objetivo de monitorizar la presencia de micoplasma, (y retirarlas o tratarlas en caso positivo).

Línea celular	Tipo celular	Origen	Medio cultivo
RWPE1	Epitelio humano de próstata	Epitelio de próstata normal	Medio de queratinocitos
PWR-1E	Epitelio hiperplásico humano de próstata	Epitelio de próstata con hiperplasia leve	Medio de queratinocitos
DU145	Carcinoma de próstata	Metástasis al sistema nervioso central	DMEM
PC3	Carcinoma de próstata	Metástasis a la médula espinal tras terapia de supresión de andrógenos	DMEM
VCaP	Carcinoma de próstata	Metástasis ósea	DMEM
LNCaP	Carcinoma de próstata	Metástasis al ganglio linfático	RPMI

## Materiales y Métodos

<b>C4-2</b>	Carcinoma de próstata	Derivadas de LNCaP	RPMI
<b>22Rv1</b>	Carcinoma de próstata	Derivada de xenograft humano de carcinoma de próstata (CWR22R)	RPMI
<b>293FT</b>	Embriónicas renales humanas	Derivadas de la línea celular renal embrionaria 293.	DMEM

**Tabla M4:** Tabla resumen de las líneas celulares y los medios de cultivo empleados en este trabajo

Con el objetivo de estimar las células presentes en la suspensión se empleó la cámara de Neubauer (*Brand*). Las células se cuantificaron tras diluirlas 1:2 en solución de azul tripán (*Amresco*). El empleo de azul tripán permite determinar la viabilidad celular ya que las células muertas, con su membrana plasmática degradada, teñirán su citoplasma de azul. El conteo de células viables se realizó mediante microscopía óptica (*Olympus CKX31*), estimando así el número de células viables presentes (**Tabla M5**). Cada experimento fue realizado con triplicatas técnicas y al menos 3 réplicas biológicas.

Ensayo	Densidad celular por pocillo		Placa usada
	DU145	PC3	
Extracción de proteína/RNA	100.000	75.000	6 pocillos
Expresión proteínas membrana	100.000		6 pocillos
Viabilidad celular. Análisis a 3 días	25.000		12 pocillos
Viabilidad celular. Análisis a 6 días	15.000	7.500	12 pocillos
Inmunofluorescencia	25.000		12 pocillos
Crecimiento en agar blando	5.000	2.500	6 pocillos
Migración/Invasión	100.000		24 pocillos
Seahorse	50.000		24 pocillos
Incorporación de glucosa	250.000		6 pocillos
Producción de lactato	250.000		6 pocillos
Apoptosis	200.000		6 pocillos
Infección con lentivirus	500.000	250.000	100mm

**Tabla M5:** Tabla resumen de las densidades celulares utilizadas en los ensayos realizados en este trabajo.

### 3.1.2 Fármacos

Los fármacos empleados en el presente trabajo, su procedencia y función quedan detallados en la siguiente tabla (**Tabla M6**).

Fármaco	Proveedor	Función
<b>Fenformina</b>	<i>Fluka</i>	Análogo a la metformina, usado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2. Actúa a nivel mitocondrial
<b>2-Deoxi-D-glucosa</b>	<i>Sigma</i>	Derivado análogo de la glucosa incapaz de entrar en la ruta de la glicolisis

<b>GW441756</b>	<i>Tocris</i>	Inhibidor selectivo del receptor tirosina quinasa A (TrkA)
<b>17-DMAG</b>	Dr. R. Kypka (CIC bioGUNE)	Inhibidor de la chaperona HSP90, proteína de choque térmico
<b>Geldanamincina</b>	Dr. J. Anguita (CIC bioGUNE)	Inhibidor de HSP90, análogo del 17-DMAG

**Tabla M6:** Tabla resumen en la que se indican los fármacos empleados así como su procedencia y función.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1. Producción de virus e infección en células diana

#### 3.2.1.1. Transfecciones transitorias en células 293FT

En este trabajo la transfección transitoria se llevó a cabo con el fin producir partículas virales (retrovirus y lentivirus) posteriormente empleadas en la generación de líneas celulares estables portadoras de las modificaciones deseadas. En la transfección transitoria el DNA introducido no se inserta en el genoma nuclear, por lo tanto se diluye en las subsecuentes divisiones celulares.

Con el objetivo de generar las partículas virales empleamos la línea celular empaquetadora 293FT. Las transfecciones transitorias fueron realizadas en presencia de fosfato de calcio. El DNA a introducir se diluyó en  $\text{CaCl}_2$  en agua (250 mM) y se empleó el tampón HBS (50mM HEPES, 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 12 mM glucosa, pH= 7,05). Al combinar ambas soluciones se genera fosfato cálcico que cristaliza con el DNA. La formación de cristales facilita la aparición de poros en la membrana citoplasmática permitiendo así que las células internalicen el DNA exógeno. El medio de cultivo se cambió al cabo de 16 horas de la transfección. Para la producción de partículas virales se sembraron  $4 \times 10^6$  células 293FT en placas de 100mm de diámetro. Las transfecciones transitorias fueron llevadas a cabo tras la adhesión celular.

#### 3.2.1.2. Producción de retrovirus e infección en células diana

Con el objetivo de introducir DNA exógeno y generar una población que lo exprese tras sucesivas replications empleamos partículas retrovirales. Para la producción de partículas retrovirales fueron co-transfectados el vector empaquetador pCL-Ampho, que confiere al virus el tropismo necesario para infectar células humanas, (2  $\mu\text{g}$ , donado por el Dr. Pier Paolo Pandolfi) y el vector de expresión portador de la secuencia codificante para la proteína de interés (6  $\mu\text{g}$ ). Los vectores de expresión retroviral facilitan los elementos necesarios para la transcripción y el procesado además del gen a expresar.

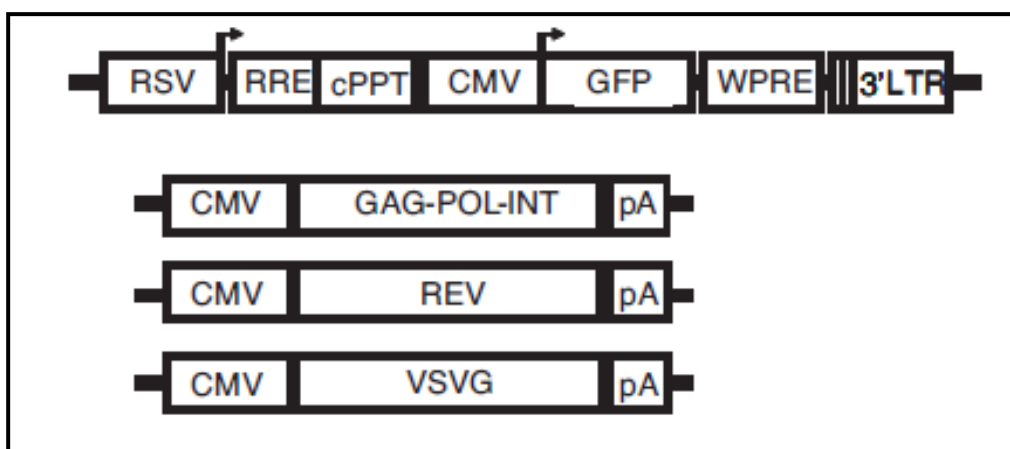
Vector	Código Addgene	Procedencia
pBABE-puro	# 1764	Drs. Land, Morgenstern y Weinberg
pBABE-FLAG-LKB1	# 8592	Dr. Cantley
pBABE-FLAG-LKB1-KD	# 8593	Dr. Cantley

**Tabla M7:** Tabla en la que se indican los vectores de expresión retroviral empleados.

Tras 16 horas de la transfección el medio de cultivo fue reemplazado por 7 ml de medio fresco. Las células 293FT producían un sobrenadante infectivo que fue recogido al cabo de 24 y 48 horas para filtrarlo con un corte de membrana de 45  $\mu\text{m}$  (VWR *International*). El sobrenadante fue añadido a las células diana en presencia de 5 ml de medio fresco y sulfato de protamina (8  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células diana (DU145) fueron sembradas el día previo, realizándose dos infecciones en días consecutivos. Las células que integraron el DA recombinante de interés se seleccionaron mediante la adición de puromicina (2  $\mu\text{g/ml}$ ). El protocolo se llevó a cabo en un laboratorio con nivel de seguridad BSL-2.

### 3.2.1.3. Producción de lentivirus e infección en células diana

Con el objetivo de reducir los niveles de proteína generamos partículas lentivirales que expresan una secuencia interferente contra el mRNA que codifica la proteína de interés. Los lentivirus generados son de tercera generación, por lo tanto, en la transfección transitoria sobre células empaquetadoras 293FT se cotransfectaron 4 plásmidos, aumentando de esta manera el nivel de bioseguridad. El vector de transferencia contiene el transgen de interés, y todos los elementos *cis* requeridos para la producción de RNA y el empaquetamiento. El sistema de empaquetamiento dispone además de 3 plásmidos adicionales, que proveen los factores *trans* requeridos, denominados pRRE, pREV y pVSV-G y que proveen los elementos Gag-Pol, Rev y las proteínas de envoltura, respectivamente.



**Figura M1: Vector lentiviral de tercera generación**

El vector de transferencia (superior) contiene el transgen de interés y todos los elementos *cis* necesarios para la replicación y el empaquetamiento de las



partículas virales. Los 3 plásmidos accesorios (inferiores) proveen los factores *trans* requeridos.

En la generación de lentivirus las células productoras 293FT se transfectaron de forma transitoria. Se co-transfectaron 1,6 µg de cada plásmido del sistema de empaquetamiento junto con 5 µg del vector de transferencia. Se empleó el vector de transferencia pLKO, seleccionable por puromicina. El plásmido pLKO fue diseñado para el clonaje y la expresión de secuencias de RNA de interferencia, específicamente shRNA (Código Addgene: # 8453, procedente del Dr. Weinberg). Los plásmidos empaquetadores pRRE, pREV y pVSV-G fueron donados por el Dr. J. Sutherland (CIC bioGUNE). Al cabo de 16 horas de la transfección el medio de cultivo fue reemplazado por 7 ml de medio fresco. El sobrenadante infectivo producido fue recogido y filtrado con un corte de membrana de 45 µm (*VWR International*) al cabo de 24 y 48 horas. Tras la eliminación de posibles restos celulares por centrifugación, el sobrenadante era añadido a la columna *Lenti-X Concentrator* (*Clontech*), la cual concentra partículas lentivirales en suspensión. El concentrado viral recogido a 24 horas se mantenía a 4°C para ser añadido al concentrado producido a 48 horas y hacer alícuotas de título viral similar. Las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta el momento de la infección. Las células diana (DU145 o PC3) fueron sembradas el día anterior e infectadas durante dos días consecutivos. Las infecciones se realizaron en presencia de sulfato de protamina (8 µg/ml). Las células que han integrado el plásmido de interés fueron seleccionadas por puromicina. El protocolo se llevó a cabo en un laboratorio con nivel de seguridad BSL-2.

### 3.2.2. Caracterización celular

#### 3.2.2.1. Análisis de la viabilidad celular mediante de cristal violeta

La densidad celular relativa, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con diferentes drogas, se determinó a través de la tinción con cristal violeta. El cristal violeta penetra en las células previamente fijadas con formalina al 10%. Las placas de cultivo se fijaron a diferentes tiempos, según el diseño experimental y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Tras lavar con PBS se añadían 500 µl de una solución cristal violeta 0.1%, metanol 20% en agua e incubar durante 10 minutos. El cristal violeta era retirado, la placa lavada y expuesta al aire para su secado. Para disolver el cristal violeta eran añadidos 500 µl de una solución de ácido acético al 10% con incubación en agitación durante 30 minutos. Para la cuantificación fueron transferidos 100 µl a una placa de 96 pocillos para cuantificar la absorbancia a 595 nm mediante el lector de placas *Sinergy HT* (*Biotek*).

### 3.2.2.2. Análisis de la tasa de síntesis de DNA mediante BrdU

La relación directa entre la duplicación del DNA y la división celular hace que la medición de la síntesis sea una manera eficaz de cuantificar la proliferación celular. La bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina) es un nucleótido sintético análogo a la timidina que al añadirlo al medio de cultivo se incorpora en las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. En el presente trabajo la detección de BrdU se realizó por inmunofluorescencia, mediante anticuerpos monoclonales. Se emplearon cultivos asincrónicos cíclicos. Las células fueron sembradas y tras adherirse la BrdU era añadida al medio de cultivo. El medio de cultivo no se cambió al añadir la BrdU ya que el medio fresco estimula la entrada en fase S del ciclo celular. La BrdU se empleó a una concentración final de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  y se incubó durante 6 horas para permitir la incorporación en las nuevas cadenas de DNA sintetizadas. Tras este tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS para ser fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Con el fin de hacer accesibles las moléculas de BrdU incorporadas al anticuerpo se llevó a cabo la exposición del DNA. Para ello las células fijadas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución 2M de ácido clorhídrico. Tras lavar con PBS el ácido se neutralizó mediante la incubación con una solución 0.1M de borato de sodio durante 5 minutos. Una vez expuesto el DNA se procedió con los pasos de permeabilización y tinte de una inmunofluorescencia, tal como detallaremos a continuación.

### 3.2.2.3. Análisis de localización celular mediante inmunofluorescencia

Para llevar a cabo ensayos de inmunofluorescencia, las células fueron sembradas en platos de cultivo donde previamente se ha introducido un cubreobjetos estéril. Tras permitir la adhesión celular el medio de cultivo era retirado y las células lavadas tres veces con PBS para ser fijadas se fijaron durante 15 minutos en una solución 4% de paraformaldehído (*Electron microscopy Sciences*) en PBS. La permeabilización se llevó a cabo mediante una solución 0,1% Tritón-X y 100mM glicina en PBS con incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. El bloqueo se realizó durante una hora con una solución de suero de cabra (*Gibco*) preparada al 2%. Los anticuerpos primarios se disolvieron en la solución de bloqueo (1:100) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente las células se lavaron 4 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (*AlexaFluor488* o *AlexaFluor594*, *Molecular Probes*) durante 1 hora en ausencia de luz. El anticuerpo secundario se diluyó 1:1000 en suero de cabra. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI diluido en PBS (1:1000) mediante una incubación de 15 minutos. Finalmente los cubre-objetos fueron adheridos al portaobjetos mediante el empleo del medio de montaje *Mowiol* y almacenados a 4°C en ausencia de luz hasta el momento de su análisis. Las células se visualizaron usando el microscopio epifluorescente *Axio Image D1* (*Carl Zeiss*).

Anticuerpo. Clon	Referencia	Especie	Dilución
BrdU. 3D4	<i>PB pharmingen (555627)</i>	Humano	1:100
NFκB p65. C-20	<i>Santa Cruz (sc-372)</i>	Humano	1:100

**Tabla M8:** Tabla resumen de los anticuerpos primarios utilizados en ensayos de inmunofluorescencia en este estudio

### 3.2.2.4. Estudio de expresión de proteínas

#### 3.2.2.4.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas, tras lavar las células con PBS eran añadidos 75µl de tampón de lisis por pocillo. En el caso de querer inmunodetectar proteínas de alto peso molecular ( $\geq 200$  KDa) se utilizó el tampón de inmunoprecipitación (tampón IP) que contiene un porcentaje bajo de un detergente no iónico suave, TritonX100 con el objetivo de mantener mínimamente la estructura terciaria de la proteína. De esta manera se facilita la unión del anticuerpo y por tanto la detección de la proteína.

Tampón IP	Concentración final
TrisHCl (pH 7.5)	40mM
EDTA	1mM
TritonX100	0,10%
NaCL	150mM
MgCL2	1mM
<i>Inhibidores de proteasas</i>	
Cocktail completo de inhibidores de proteasas	1 pastilla/50mL
<i>Inhibidores de fosfatasas</i>	
Fluoruro sódico	1mM
Ortovanadato sódico	1mM
B-Glicerolfosfato	1mM

**Tabla M9:** Ingredientes del tampón de lisis suave IP

Para la detección de proteínas cuyo peso molecular no supera los 200 KDa se utilizó el tampón de lisis RIPA que contiene un detergente aniónico fuerte, SDS, que desnaturaliza totalmente las proteínas.

Tampón RIPA	Concentración final
TrisHCl (pH 7.5)	50mM
NaCL	150mM
EDTA	1mM
SDS	0,10%
Deoxycolato sódico	1%
Nonidet P-40	1%
<i>Inhibidores de proteasas</i>	

Cocktail completo de inhibidores de proteasas	1 pastilla/50mL
<i>Inhibidores de fosfatasas</i>	
Fluoruro sódico	1mM
Ortovanadato sódico	1mM
B-Glicerolfosfato	1mM

**Tabla M10:** Ingredientes del tampón de lisis fuerte RIPA

Tras incubar con el tampón de lisis 5 minutos las muestras se recogieron con un rascador y se incubaron en agitación orbital (*Labnet international, Inc*) a 4°C durante 15 minutos. Las muestras eran centrifugadas a 14.000 g durante 10 minutos a 4°C con el objetivo de precipitar los ácidos nucleicos. Tras recoger el sobrenadante y trasvasarlo, la concentración proteica de las muestras se cuantificó mediante el método del BCA (*Pierce*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema estándar se basa en el cambio de estructura del ácido bicinchonínico (BCA), el cual tras la unión de iones  $\text{Cu}^+$  presentes en las proteínas varía su espectro de absorción. Por cada experimento se igualó la concentración de cada grupo de muestras para finalmente añadir a cada muestra un 20% del volumen de tampón *Laemmli*. Las muestras fueron desnaturalizadas en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol mediante incubación a 95°C durante 5 minutos, para ser analizadas por electroforesis o almacenadas a -20°C para su posterior análisis.

### 3.2.2.4.2. Electroforesis y transferencia de proteínas

La separación de las proteínas se realizó en función a su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para ello se utilizaron geles prefabricados *NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris* de 1.0 mm de grosor (*Invitrogen*) y se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína por pocillo. La electroforesis se resolvió a 150V durante 1 hora con el sistema *XCell4 SureLock Midi-Cell* (*Invitrogen*) en tampón *NuPAGE MOPS SDS* (*Invitrogen*). Las proteínas separadas en la electroforesis se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa *Amersan Protran* (*GE healthcare*) con un tamaño de poro de 2  $\mu\text{m}$ . Se utilizó el sistema de transferencia húmedo en una cubeta *Criterion™ cell* (*BioRad*) en tampón Tris- Glicina, que en el momento de la transferencia fue completado con un 20% de etanol. La transferencia se realizó durante toda la noche a una potencia de 25V. Tras la transferencia las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con la solución *Ponceau* rojo para comprobar la eficiencia.

### 3.2.2.4.3. Inmunodetección de proteínas

Para la inmunodetección las membranas se bloquearon durante 1 hora en tampón TBSTM (5% de leche en polvo, 0.1% Tween-20 en TBS, pH= 7,4). Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en TBST-azida (0.1% Tween-20, 0.02% azida en TBS) durante toda la noche a 4°C (**TablaM11**). El revelado se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL y la impresión se realizó en película fotográfica (*Konika Minolta*). La película fotográfica expuesta a quimioluminiscencia se manipuló en una cámara oscura con la reveladora *Curix 60* (*Agfa*), digitalizando la imagen

resultante. En algunos casos, las imágenes obtenidas se analizaron por técnicas de densitometría mediante el programa *ImageJ*.

Anticuerpo. Clon	Referencia	Especie	Dilucion
<b>LKB1. 27D10</b>	<i>CellSignalling #3050</i>	Conejo	1:1000
<b>Fosfo-ACC (Ser79)</b>	<i>Merk Millipore 07-303</i>	Conejo	1:1000
<b>AMPK total. F6</b>	<i>Cell Signalling #2535</i>	Conejo	1:1000
<b>Fosfo-AMPK. 40H9 (Thr172)</b>	<i>CellSignalling #4049</i>	Conejo	1:1000
<b>RAPTOR. 24D12</b>	<i>Cell Signalling #2280</i>	Conejo	1:1000
<b>Fosfo-RAPTOR (Ser792)</b>	<i>Cell Signalling #2083</i>	Conejo	1:1000
<b>S6 total. 54D2</b>	<i>Cell Signalling #2317</i>	Conejo	1:1000
<b>Fosfo-S6 (Ser235-236)</b>	<i>Cell Signalling #2211</i>	Conejo	1:1000
<b>β- Actin. AC74</b>	<i>Sigma A-5316</i>	Ratón	1:2000
<b>Secundario de ratón</b>	<i>Jackson Immuno Research</i>	Ratón	1:5000
<b>Secundario de conejo</b>	<i>Jackson Immuno Research</i>	Conejo	1:5000

**Tabla M11:** Tabla resumen de los anticuerpos empleados en los análisis Western-Blot realizados sobre líneas celulares.

### 3.2.2.4.4. Análisis de la expresión de proteínas de membrana mediante citometría de flujo

Para el estudio del nivel de expresión de la proteína CD24 en la membrana plasmática se empleó un citómetro de flujo analizador modelo *FACSCanto II*, equipado con el software de análisis *FACSDiva (BD, Biosciences)*. El citómetro de flujo permite determinar el nivel de expresión de los antígenos analizados, gracias a la medida de la luz emitida por los fluorocromos con los que están marcados los anticuerpos al ser excitados por los láseres de los que consta el citómetro.

Las células fueron sembradas y tras permitir la adhesión se despegaron enzimáticamente con Tripsina-EDTA, se lavaron con PBS y se incubaron a temperatura ambiente en 1 ml de solución de bloqueo (2% BSA y 2 ml de EDTA en PBS), impidiendo de esta manera la formación de uniones inespecíficas. Tras la incubación las células se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos para desechar el sobrenadante y resuspender el *pellet* celular en 100 µl de solución de bloqueo. Finalmente se incubaron con el anticuerpo correspondiente (1:100). El marcaje se realizó mediante el empleo de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos que reconocen específicamente antígenos de CD24 situados en la superficie celular, en concreto el anticuerpo anti-CD24 humano conjugado con ficoeritrina (anti-CD24-PE) (*BD Biosciences*). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo se añadió 1 ml de solución de FACS (HEPES, EDTA, BSA 1% en PBS) a cada muestra y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos. Cada *pellet* de células se resuspendió en 500 µl de solución de FACS y se transfirió a un tubo específico para el

## Materiales y Métodos

citómetro, donde se añadieron 500 µl adicionales de solución de FACS (*BD, Biosciences*). La ficoeritrina conjugada al anticuerpo al excitarse con el laser que emite una luz con una longitud de onda de 488 nm produce una emisión a 578 nm, lo que permite determinar la expresión del antígeno correspondiente en la superficie de la membrana plasmática.

### 3.2.2.5. Estudio de expresión génica

#### 3.2.2.5.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción de RNA, tanto de células en cultivo como de tejido prostático murino, se llevó a cabo utilizando el kit *NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel)* según las instrucciones del fabricante. El tratamiento con DNasa se realizó en la columna, tal como indica el protocolo. La concentración y la pureza del RNA extraído se determinó mediante la cuantificación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm empleando el espectrofotómetro *ND-100 (NanoDrop Technologies)*. Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit *qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences)*, partiendo de 1 µg de RNA. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *qScript™ cDNA SuperMix (BioRad)* incubando las muestras durante 1 hora a 42°C° seguidos de 5 minutos a 95°C para inactivar la enzima.

#### 3.2.2.5.2. PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en el sistema *ViiA™ 7 (Life Technologies)* utilizando la master mix para PCR *TaqMan Universal® MasterMixII (Applied Biosystems)*. La reacción de PCR se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo: 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C para permitir la amplificación, los pasos de separación de los cebadores y de elongación se repitieron 40 ciclos. El diseño de los cebadores de los genes de interés se realizó siguiendo las indicaciones de la librería de sondas universales de *Roche*. Esta aplicación permite identificar las secuencias específicas de los cebadores y la sonda de la librería universal correspondiente a cada par. La librería se encuentra disponible en la siguiente página web: <http://lifescience.roche.com/shop/en/mx/overviews/brand/universal-probe-library>. Los valores de referencia considerados fueron GAPDH y β-actina y se utilizaron las siguientes sondas (*Life Technologies*): hGAPDH: Hs02758991\_g1, hBACTIN: Hs99999903\_m1 y mGapdh: m99999915\_g1. Con el objetivo de determinar el cambio de expresión transcripcional de genes se empleó el método de cuantificación  $\Delta\Delta Ct$ .

Gen	Especie	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'	Sonda/Ref
AKR1C2	Humano	ctatgcgcctgcagaggt	acctgctcctcattattgtaaacat	31
ANXA3	Humano	tceggaaagctctgttgact	atcttgtttgccagatgct	29

<b>ARPC5</b>	Humano	caagttcgtggacgaagaaga	gcagctgcatgtttccttg	51
<b>BIRC3</b>	Humano	gatgaaaatgcagagtcacaaatta	catgattgcatcttctgaatgg	80
<b>CADM1</b>	Humano	gagttaacatgtgaagccatcg	cgactctcacccaagtacca	45
<b>CD24</b>	Humano	tggatttgacattgcatttga	tgggggtagattctcattcatc	37
<b>CXCL6</b>	Humano	gtccttcgggctcctgt	cagcacagcagagacaggac	18
<b>GRP64</b>	Humano	aaacacctgctttgtttcagg	gatatgacgtagctgacagagagag	80
<b>HLA-B</b>	Humano	cctacctggaggcgaggt	ggggggtcacgtgtgtcttt	80
<b>IRF9</b>	Humano	agcctggacagcaactcag	gaaactgccactctcact	22
<b>LKB1</b>	Humano			Hs00176092_m1
<b>MAP3K8</b>	Humano	cgaagaggctgctgagt	ttcctgtgcacgaagaatca	17
<b>MO25<math>\alpha</math></b>	Humano	ttgaggcctttcacgttttt	tctatgagttggcctggttc	88
<b>MO25<math>\beta</math></b>	Humano	cgacactatTTTTgaagactatgagaa	atgatggcaaagttgtgacg	24
<b>NF<math>\kappa</math>BIA</b>	Humano	gtcaaggagctgcaggagat	atggccaagtgcaggaac	38
<b>NF<math>\kappa</math>BIZ</b>	Humano	ttgataccattaagtgcctaattca	gccacttttgcgaccttc	32
<b>OAS3</b>	Humano	tcccatcaaagtgatcaaggt	acgaggtcggcatctgag	41
<b>PTPRM</b>	Humano	ggccggacttttgtaact	tgtgctatacggctcatcaaa	83
<b>SAT1</b>	Humano	cctacctggaggcgaggt	ggggggtcacgtgtgtcttt	80
<b>SIK1</b>	Humano	catcccccttctcatgtctca	gatctgggcgatggtgat	77
<b>Cd24</b>	Ratón	cttctggcactgctcctacc	tgggtgtagcgttacttga	38
<b>Epas1</b>	Ratón	ctccaggagctcaaaaggtg	caggttaaggctcgaacgatg	3

**Tabla M12:** Tabla resumen de los cebadores y las sondas utilizadas para cada gen en los análisis de PCR cuantitativa a tiempo real.

### 3.2.2.5.3. Microarray de expresión génica

La caracterización de la expresión del genoma completo se realizó mediante el microchip para genoma humano *HT12\_V4.0* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). La síntesis del cRNA se obtuvo mediante el kit *TargetAmp™ Nano-g™ Biotin-aRNA Labeling Kit*, para el sistema *Illumina, Epicentre* (Cat. Num. TAN07924) y la subsiguiente amplificación, marcaje e hibridación se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo de *Illumina* para la hibridación directa de la expresión génica del genoma completo. Los datos crudos se obtuvieron con el programa de análisis de datos *GenomeStudio*, (Illumina). Dichos datos se corrigieron y analizaron mediante el entorno informático estadístico *R/Bioconductor*. En la corrección previa al análisis se utilizó el

paquete *lumi* de *Bioconductor*, con el que se eliminó el ruido de fondo, se transformaron los valores de la expresión a logaritmo 2 y se normalizaron en base a los cuartiles. Además, aquellas sondas que no fueron detectadas en al menos una muestra se excluyeron de los siguientes análisis al considerarse que representaban transcritos que no eran expresados. Para la detección de genes diferencialmente expresados entre grupos muestrales se utilizó el paquete *limma* de *Bioconductor*. Mediante esta herramienta informática se ajustaron los datos a un modelo lineal y se calcularon los valores estadísticos de t, el estadístico F moderado y los *log-odds* de los genes estudiados. Tras ello los valores p fueron ajustados mediante el procedimiento Benjamin-Hochberg para la eliminación de posibles falsos positivos.

Es importante indicar que en el presente estudio se consideran como genes diferencialmente expresados aquellos con un cambio absoluto (FC, del inglés “*Fold Change*”) mayor a 1,5 y un valor de p inferior a 0,05. Tras lo cual se procedió a comprobar si entre ellos existen agrupaciones que impliquen la alteración de un proceso biológico. Con este objetivo se empleó el análisis de enriquecimiento basado en ontología génica incluido en el paquete de análisis funcional *GOstats* en *Bioconductor*. Se aplicó el estadístico de test hipergeométrico que identifica, en caso de que exista, la sobre-representación de genes diferencialmente expresados. Adicionalmente se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento similares en diversas bases de datos (*KEGG*, *Reactome*, *Oncogenic Signatures*, *HIPC*, *CMAP* y *BioCarta*) disponibles en la página web: <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp#C2>. Los análisis bioinformáticos fueron realizados por Ana Rosa Cortazar (CIC bioGUNE).

### 3.2.2.6. Análisis del fenotipo metabólico

#### 3.2.2.6.1. Ensayo de incorporación de glucosa

Con el objetivo de cuantificar la cantidad de glucosa incorporada por las células se midió la captación de 2-deoxiglucosa marcada con tritio ( $^3\text{H}$ ). Las células se lavaron a las 24 horas con solución KRH (20mM HEPES, 136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,25 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1,25 mM, pH= 7,4). A continuación se incubaron durante 15 minutos con 900  $\mu\text{l}$  de solución KRH para añadir 100  $\mu\text{l}$  de la solución *10XSTART* que contiene 1mM de 2-deoxy-D-glucosa (*Sigma*) y 5  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]-2-deoxy-D-glucosa (*Perkin Elmer*). Con el objetivo de permitir la incorporación de la [ $^3\text{H}$ ]-2-deoxy-D-glucosa se realizó una incubación de 5 minutos a 37°C tras lo cual las células se lisaron con SDS. La actividad específica de la [ $^3\text{H}$ ]-2-deoxy-D-glucosa incorporada se midió por duplicado en el contador de centelleo líquido *LS-6500* (*Beckman Coulter*), expresándose en nmol por mg de proteínas por minuto. El protocolo se llevó a cabo en salas específicas para manejo de material radioactivo.



### 3.2.2.6.2. Ensayo de medida de la producción de lactato

La medida de la producción de lactato se realizó mediante técnicas colorimétricas (*Lactate Kit, Trinity Biosciences*). Las células se sembraron y a las 24 horas se tomaron muestras por duplicado. El kit permite la detección enzimática del lactato. Tras recoger el sobrenadante y añadir reactivo de lactato las muestras fueron incubadas durante 10 minutos para finalmente leer la absorbancia a 540 nm. La medida de la absorbancia a 540 nm se puede relacionar con la concentración de lactato mediante su extrapolación a partir de la curva patrón.

### 3.2.2.6.3. Ensayo de medida del oxígeno consumido

El oxígeno basal consumido en tiempo real (OCR) y el ratio de acidificación extracelular (ECAR) en líneas celulares se determinaron utilizando el analizador de flujo extracelular *Seahorse XF24*, (*Seahorse Bioscience, Chicopee, MA*). El *XF-24* mide la concentración de oxígeno y de protones libres en el medio sobre una monocapa de células en tiempo real. Las células se sembraron en microplatos de cultivo celular *XF24* 16 horas antes del experimento. La concentración de proteína se determinó para cada pocillo utilizando un sistema de medida de proteína mediante BCA (*Pierce*). Los valores de OCR obtenidos se normalizaron a mg de proteína, representándose la media y la desviación estándar. Los datos fueron adquiridos mediante el *software XF24*, estableciendo 5 minutos de intervalo por cada vez que agita y obteniendo datos cada 2 minutos. El ratio de consume de oxígeno (OCR) y de acidificación extracelular se midieron mediante el analizador de flujo extracelular *XF24* (*Seahorse Bioscience*). Las células se sembraron en DMEM con glucosa y glutamina y se emplearon las siguientes concentraciones de los compuestos a inyectar: oligomicina, 1  $\mu\text{M}$ ; rotenona 0,1  $\mu\text{M}$ ; acelerador de cadena de transporte de electrones p-trifluotomethoxy carbonil cianida fenil hidracina (FCCP), 1,2  $\mu\text{M}$ ; antimicina A 1,5  $\mu\text{M}$ . Los análisis realizados mediante el sistema *Seahorse XF24* fueron llevados a cabo por el Dr. Caro-Maldonado (CIC bioGUNE)

### 3.2.2.7. Análisis de la migración e invasión celular

Los ensayos de migración celular se llevaron a cabo mediante el empleo de cámaras de migración de 8  $\mu\text{m}$  de poro situadas sobre platos de cultivo de 24 pocillos (*BD Falcon*). Los ensayos de invasión celular se realizaron mediante cámaras de invasión cubiertas de matrigel de 8  $\mu\text{m}$  de poro situadas sobre platos de cultivo de 24 pocillos (*BD Biosciences*). En ambos casos, las células eran resuspendidas en medio que contiene 0.1% de FBS, mientras que en la parte inferior de la cámara el medio se completó con 10% de FBS para que actuase como quimioatrayente. Tras la incubación, (24 horas para la migración y 48 horas para la invasión) las células de la parte superior del *transwell* se retiraron con un bastoncillo de algodón y las células que

## Materiales y Métodos

migraron/invadieron hacia la parte inferior del filtro se fijaron durante 10 minutos con una solución de formalina al 10%. Las células fijadas eran posteriormente teñidas con cristal violeta y DAPI. La tasa de migración/invasión se calculó mediante la obtención de 5 micrografías por pocillo y la posterior cuantificación de las células que han migrado/invadido. En el contaje se empleó el *software ImageJ*. Para su representación los resultados fueron expresados como el porcentaje de células que migraron/invadieron respecto de las células control. Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control. Para disponer de imágenes representativas las membranas de las cámaras se tiñeron con DAPI, posteriormente se cortaron y montaron con *Mowiol* sobre un portaobjetos. Las micrografías representativas fueron adquiridas mediante el empleo de un microscopio invertido (10X) (*Eclipse TS-100, Nikon*).

### 3.2.2.8. Análisis de la capacidad de formar colonias en condiciones independientes de anclaje

La capacidad de formación de colonias de las líneas celulares DU145 y PC3 se estudió mediante el análisis de su crecimiento en agar blando. El agar blando es un tipo de cultivo semisólido en el cual, con el objetivo de estudiar su clonogenicidad, las células son sembradas a baja dilución. En este tipo de cultivo se preparan 2 capas de DMEM completo en las que se disuelven diferentes concentraciones de agar, proporcionando diferente densidad a cada capa. La capa inferior sirve de base y la superior contiene la dilución celular. Para la preparación de la capa inferior se empleó agarosa al 6% en agua (*SeaKem LE agarose, Lonza*). Tras la esterilización de la solución la agarosa se diluyó en DMEM completo en proporción 1:10. Este medio se dejó solidificar una hora a 4°C. Para preparar la capa superior se empleó agarosa de bajo punto de fusión. De esta manera la temperatura a la cual la mezcla agarosa-DMEM se mantiene líquida es inferior, por lo que conseguimos minimizar el estrés celular por choque térmico. La agarosa de bajo punto de fusión se preparó al 4% en agua. Tras su esterilización se diluyó en DMEM completo en proporción 1:10. La densidad deseada de células se añadía a esta solución que era depositada sobre la base de agar previamente preparado. Se facilitó la solidificación del agar mediante su mantenimiento durante una hora a 4°C. Las células se mantuvieron en este medio durante 3 semanas en el caso de las DU145 y durante 2 en el de las PC3. Transcurrido este tiempo se contabilizaron las colonias formadas. Las micrografías representativas fueron obtenidas mediante el uso de un microscopio invertido (10X) (*Eclipse TS-100, Nikon*).

### 3.2.2.9. Análisis de la tasa de apoptosis: Estudio de la población SubG1

Con el objetivo de estudiar la tasa de apoptosis las células se tripsinizaron y centrifugadas a 450 ref. A continuación se fijaron con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con etanol al 70%. Los fragmentos de DNA de bajo peso molecular

salen de las células que se encuentran en soluciones acuosas, por lo cual en su interior queda una cantidad de DNA inferior a  $2n$ . De esta manera las células apoptóticas pueden ser identificadas en histogramas de frecuencia de contenido de DNA como la población con un contenido de DNA por debajo de  $2n$  (población SubG1). El citómetro de flujo permite identificar así la población apoptótica y células intactas. Previo al análisis en el citómetro las células eran incubadas durante media hora a  $37^{\circ}\text{C}$  con una solución de RNAsa ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ) y yoduro de propidio ( $40\ \mu\text{g/ml}$ ). Las células apoptóticas se detectaron y cuantificaron mediante el citómetro *FACS Canto™ II* (BD Biosciences). Los datos fueron analizados con el programa *Flowing Software*.

### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

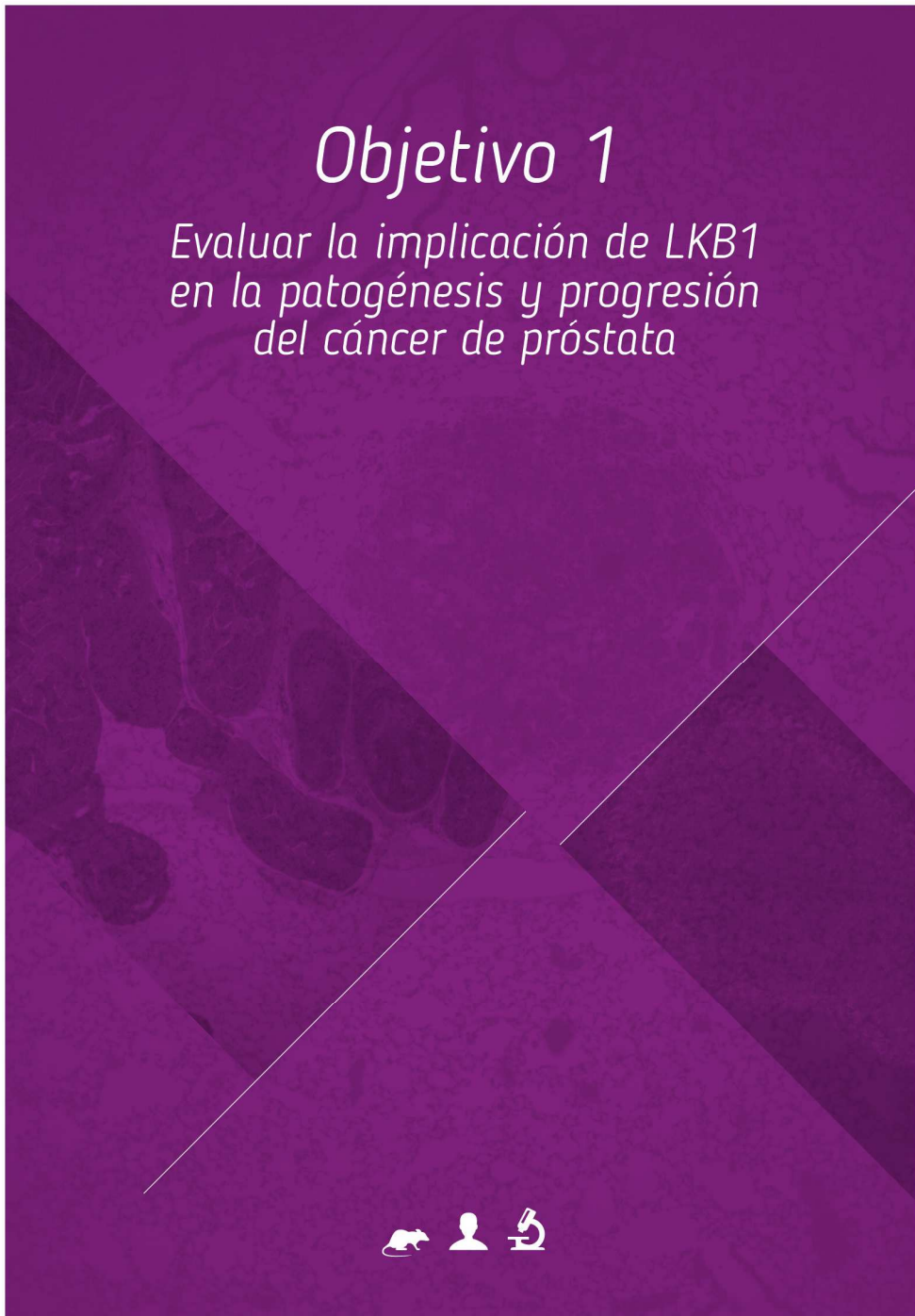
Los gráficos se realizaron utilizando el programa especializado *GraphPad Prism*. Todos los experimentos se repitieron un mínimo de 3 veces. Los valores de las graficas corresponden a la media de los experimentos realizados. Las barras de error en los gráficos indican el error estándar (SE), a menos que se indique lo contrario. El nivel de confianza empleado en todos los análisis estadísticos fue del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

En el análisis de los datos obtenidos se emplearon diversos estadísticos en función de la comparación deseada. Para la comparación de dos medias entre muestras independientes fue utilizado el test paramétrico t de Student, mientras que en la comparación entre múltiples componentes se empleó el test ANOVA. En todos los casos se ha estimado una varianza igual, excepto en los experimentos con animales donde se ha utilizado el test U no paramétrico de Mann Whitney. Se aplicaron análisis estadísticos de dos colas en los diseños experimentales que carecían de un resultado previsto y una cola de distribución en los casos de validación. Los análisis de correlación entre la expresión de 2 genes se realizaron aplicando el test paramétrico de correlación de Pearson. Para la detección de genes diferencialmente expresados, los datos obtenidos del microarray se analizaron mediante el estadístico de Bayes moderado. Con el objetivo de estudiar el grado de independencia entre dos variables categóricas se realizó la prueba estadística *chi-cuadrado*. Finalmente, en los estudios de supervivencia, se determinó por cada genotipo la media del tiempo transcurrido entre el nacimiento y la muerte natural o el sacrificio por razones éticas. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el método Kaplan-Meier.

# *Resultados y discusión*











LKB1 ha sido implicado en el desarrollo de un amplio rango de cánceres epiteliales y de pulmón (*Herrmann et al., 2011*) (*Sanchez-Cespedes et al., 2002*). Sin embargo, existe muy poca literatura que describa su papel en el contexto del cáncer de próstata.

Proponemos que la pérdida de LKB1 desempeña un papel en la iniciación y/o progresión del cáncer de próstata, por lo que en este capítulo, evaluamos la consecuencia de su modulación genética y el mecanismo asociado.

### HIPÓTESIS

**LKB1 actúa como un gen supresor de tumores cáncer de próstata**

Con el objetivo de profundizar en la hipótesis planteada, investigamos el grado de implicación y el mecanismo de acción de LKB1 en el cáncer de próstata mediante el empleo de tres metodologías de estudio diferentes:

1. Para analizar la relevancia de LKB1 en el cáncer de próstata humano evaluamos la alteración en los niveles de expresión de RNA mensajero y proteína de LKB1 mediante el uso de muestras parafinadas y de bases de datos públicas disponibles.
2. Con el objetivo de caracterizar *in vivo* su papel en la patogénesis del cáncer de próstata generamos líneas de ratones condicionales *knockout* de LKB1 en los que hemos delecionado uno o ambos alelos del gen en el epitelio prostático. Asimismo evaluamos la implicación de la deleción de LKB1 en el contexto de mutaciones oncogénicas, como es la deleción del supresor de tumores PTEN.
3. Con el objetivo de describir el mecanismo de acción de LKB1 en cáncer de próstata, alteramos su expresión en líneas celulares humanas, para evaluar a continuación las consecuencias de su expresión.

### 1.1. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LKB1 EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Quisimos, para comenzar, determinar la existencia de cambios en la expresión de LKB1 en cáncer de próstata. En el contexto del cáncer de este tejido, se ha apuntado la posibilidad de que las mutaciones somáticas puedan ser un evento relativamente raro en comparación con otro tipo de tumores como el de pulmón (*Taylor et al., 2010*). Decidimos, por lo tanto, analizar la expresión de LKB1 a nivel de proteína y mRNA. Según muestran estudios previos, el nivel de transcripción de LKB1 en la próstata de individuos sanos es bajo (*Collins et al., 2000*), y a nivel proteico, se detecta su presencia en el citoplasma de las células luminales (*Conde et al., 2007*).

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

### 1.1.1. Evaluación del nivel de expresión de LKB1 a nivel de proteína en cáncer de próstata

En primer lugar estudiamos la expresión de LKB1 a nivel de proteína mediante el análisis inmunohistoquímico de un *microarray* de tejidos compuesto por 207 biopsias con material evaluable (Giusiano *et al.*, 2012).

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Estudiar la expresión de LKB1 a nivel de proteína en cáncer de próstata humano

**Muestras:** 206 casos de tumores de próstata y 1 caso de neoplasia intraepitelial de próstata (PIN)

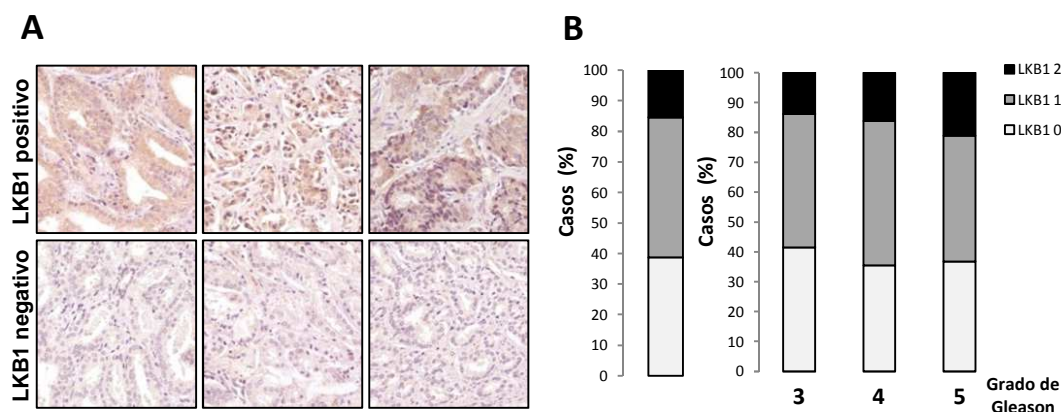
**Metodología:** Tinción inmunohistoquímica y evaluación patológica

**Test estadístico:** Chi cuadrado

El análisis del *microarray* de tejidos nos permitió confirmar que en un grupo de biopsias no se detecta la expresión de LKB1 (**Fig. R1A**). Con el objetivo de cuantificar este resultado los niveles de expresión observados se trataron como variables ordinales y se clasificaron en 3 categorías: 0 (sin expresión), 1 (expresión baja) y 2 (expresión alta). La cuantificación de los resultados del análisis inmunohistoquímico indicó que la ausencia de expresión de LKB1 presentaba una prevalencia del 38,64% (**Fig. R1B**).

Con el objetivo de determinar si las muestras incluidas en el *array* de tejidos presentan algún tipo de correlación entre la expresión de LKB1 y la agresividad del tumor clasificamos las biopsias incluidas en base a la escala de Gleason. Mediante esta clasificación, pudimos observar que el conjunto muestral se componía de tumores con un grado de Gleason comprendido entre 3 y 5 (calificando de este modo el Gleason más prevalente o más alto si son discordantes). El análisis realizado no mostró ninguna correlación entre la expresión de LKB1 y el grado de agresividad del tumor, sugiriendo que en el cáncer primario de próstata la disminución de los niveles de proteína LKB1 es independiente de su agresividad (**Fig. R1B**).

Los resultados obtenidos del *microarray* de tejidos nos permiten concluir que existe un grupo de tumores de próstata que presenta niveles indetectables de LKB1 mediante las técnicas empleadas, en favor de su posible implicación en el cáncer de próstata.



**FIGURA R1. La inmunoreactividad de LKB1 es indetectable en el 38,64% de los casos**

**A.** Imágenes representativas del microarray de tejidos analizado. La tinción marrón representa la presencia de LKB1. Se muestran tinciones de 6 especímenes tumorales diferentes (n=207).

**B.** La intensidad de la señal fue graduada en una escala del 0 al 2 (0, sin expresión; 1 expresión baja; 2 expresión alta). Se muestra el porcentaje de casos categorizados según esta clasificación, (panel izquierdo) y la correlación entre grado de agresividad, determinado según la escala de Gleason, y nivel de expresión (panel derecho).

### 1.1.2. Evaluación del nivel de expresión transcripcional de LKB1 en cáncer de próstata

Quisimos confirmar a nivel de mRNA los resultados obtenidos del análisis de expresión a nivel de proteína. Para ello, mediante técnicas bioinformáticas, se analizó una selección de bases de datos constituidas por estudios de expresión génica derivados de biopsias de pacientes con cáncer de próstata e individuos sanos. El análisis comparativo entre perfiles de expresión en cáncer nos permite establecer patrones que se repiten a lo largo de diferentes cohortes. En base a ello, empleamos dos estudios de expresión, seleccionando, de entre los que disponemos de acceso, los que presentan mayor valor muestral.

DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Evaluar el nivel expresión transcripcional de LKB1 en cáncer de próstata

**Metodología:** Análisis de 2 bases de datos públicas:

Código GEO	Referencia
GSE21032	(Taylor et al., 2010)
GSE35988	(Grasso et al., 2012)

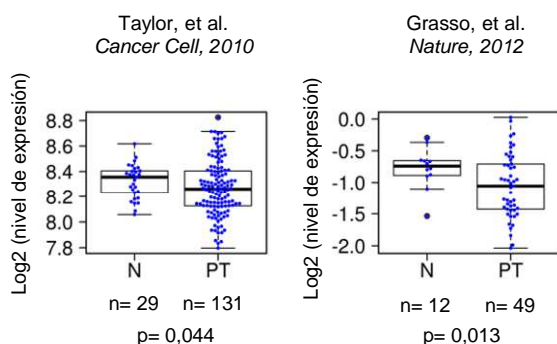
**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

El acceso a los estudios de *microarray* de tejidos se realizó mediante la base de datos denominada “*GEO profiles*”, perteneciente al NCBI (del inglés, “*National Center for Biotechnology Information*”). GEO es un depósito público internacional que archiva

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

y distribuye libremente datos presentados por la comunidad científica y originados mediante la aplicación de técnicas de alto rendimiento, *microarray* o técnicas de secuenciación de próxima generación (Edgar et al., 2002). “*GEO profiles*” se encuentra disponible en la siguiente dirección web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>

Con el objetivo de evaluar el nivel de expresión transcripcional de LKB1 seleccionamos dos estudios de perfiles de expresión y comparamos los niveles observados para este gen entre individuos sanos y pacientes diagnosticados de cáncer localizado de próstata. Los resultados obtenidos se muestran mediante diagramas de cajas, donde en el eje Y se representa la transformación a logaritmo 2 del nivel de expresión normalizado obtenido del microarray (**Fig. R2**). El análisis de datos realizado sobre ambos estudios revela un descenso significativo en los niveles de mRNA de LKB1 asociado con el cáncer de próstata, lo cual sugiere que la disminución de la expresión de LKB1 puede ser un evento relevante en este contexto.



**FIGURA R2. El nivel de expresión transcripcional de LKB1 disminuye en tumores primarios de próstata**

Diagramas de cajas mostrando la intensidad de señal de LKB1 según dos estudios de determinación de perfiles de expresión en cáncer. Los límites de las cajas representan los cuartiles 1 y 3. También se representa la mediana así como los valores máximo y mínimo. Cada punto indica un caso.

N: Tejido normal; PT: Tumor primario

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Evaluación de los niveles de expresión de LKB1 en cáncer de próstata

- En la cohorte empleada para el análisis de expresión a nivel de proteína sería recomendable analizar la actividad de LKB1, con el fin de verificar la correlación con su expresión. Proponemos para estimar el grado de actividad, estudiar el nivel de fosforilación de las proteínas diana de LKB1
- En esta misma cohorte, sería ampliamente informativo disponer de las muestras pareadas de RNA y DNA. De esta manera podríamos determinar también la tasa de mutación a nivel genómico y a nivel transcripcional. Mediante análisis comparativos se podrían establecer grados de concordancia entre estos 3 estadios (DNA, RNA y proteína)
- Ampliar a un mayor número de estudios de perfiles de expresión génica en cáncer de próstata el análisis bioinformático realizado.

En resumen, los resultados obtenidos indican que la expresión de LKB1 se encuentra disminuida a nivel de mRNA y proteína en tumores localizados de próstata.

Estas observaciones son coherentes con la hipótesis de partida, por lo que procedimos a determinar si su pérdida tiene consecuencias en la iniciación y/o progresión de este tipo de cáncer, valiéndonos para ello de modelos murinos modificados genéticamente.

### 1.2. EVALUACIÓN DE LAS CONSECUENCIAS DE LA DELECIÓN DE LKB1 DE MANERA CONDICIONAL EN LA PRÓSTATA DE RATONES

La hipótesis propuesta en la presente tesis doctoral plantea que LKB1 actúa como un gen supresor de tumores en el cáncer de próstata. Razonamos también que su pérdida puede cooperar con otras mutaciones oncogénicas frecuentes en este tipo de tumor, seleccionando para su estudio la hipotética cooperación con el gen supresor de tumores PTEN (*Nardella et al., 2010*).

#### HIPÓTESIS

La delección de *Lkb1* en el epitelio prostático da lugar a la iniciación del cáncer

La delección de *Lkb1* coopera con la delección de *Pten* en cáncer de próstata

Por lo tanto, con el fin de evaluar la contribución de la delección de LKB1 al cáncer de próstata exploraremos dos contextos genéticos diferentes:

2.1.- La delección completa *Lkb1* como único evento genético.

2.2.- La delección combinada de *Pten* y *Lkb1*.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

##### Objetivos:

- Evaluar *in vivo* las consecuencias de la delección condicional de *Lkb1* en la próstata
- Generar de modelos murinos sobre los que estudiar el papel de LKB1 y la potencial cooperación con PTEN en el cáncer de próstata

**Cepas murinas de partida:** ♂ C57BL6/129sv;*Pb-Cre4Pten*<sup>lox/+</sup> x ♀ C57BL6/FVB;*Lkb1*<sup>lox/+</sup>

##### Metodología:

- Recombinación generada mediante la técnica Cre/LoxP
- Caracterización de las líneas murinas:
  - Análisis de supervivencia: Test estadístico Kaplan-Meier
  - Análisis macroscópico e histológico de los tejidos: Tinción Hematoxilina/Eosina

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

Tal como se describe en la introducción, el cáncer de próstata progresa a través de diferentes estadios. El primero de ellos es la neoplasia intraepitelial de próstata (PIN), considerada una lesión precancerosa que se caracteriza por la aparición de focos de displasia. Si la PIN evoluciona, el epitelio prostático invadirá el estroma circundante y establecerá un adenocarcinoma invasivo localizado. Éste se puede desarrollar como un tumor localmente confinado o avanzado, para eventualmente progresar y desarrollar cáncer de próstata metastático (*Abate-Shen and Shen, 2002*) (**Fig. R3A**). La caracterización de los modelos murinos generados en base a esta clasificación tumoral nos permitirá establecer el papel que desempeña LKB1 en la supresión del cáncer de próstata.

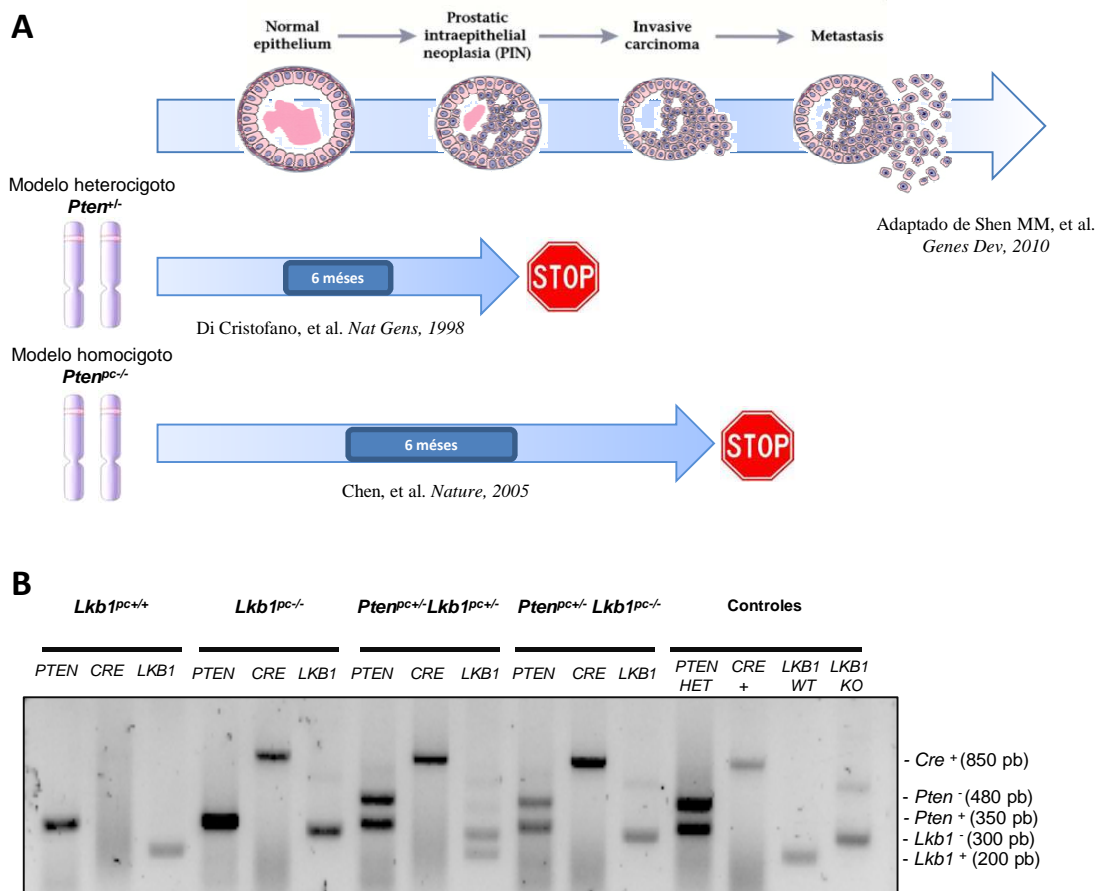
Con el objetivo de evaluar el papel de LKB1 en el cáncer de próstata decidimos generar un modelo murino en que combinamos la delección condicional de *Pten* y *Lkb1*. Tal como indicábamos en la introducción, partimos del modelo análogo al *Pten*<sup>+/-</sup> originado en el laboratorio del Dr. Pier Paolo Pandolfi pero en su variante específica de tejido (los estudios en laboratorio han permitido confirmar resultados equivalentes en el modelo condicional y la mutación en línea germinal, permitiendo el modelo específico de tejido evitar la letalidad temprana por linfadenopatías). En el modelo original la delección del gen se realiza en la línea germinal lo que a los 6 meses de vida da lugar a la aparición de focos de PIN indolentes (*Di Cristofano et al., 1998*). Recordemos que contrastando con estos resultados en el modelo condicional de delección completa de *Pten* (*Pten*<sup>pc/-</sup>) se detectan lesiones PIN a los 3 meses de vida, las cuales progresan hasta desarrollar cáncer invasivo a los 6 meses. Este modelo no presenta metástasis (*Chen et al., 2005*). (**Fig. R3A**).

Nuestro primer paso consistió en generar un modelo *Pb-cre4Pten*<sup>lox/+</sup>. La introducción del transgen *Pb-Cre4* permite que la enzima Cre recombinasa se exprese tras la pubertad (a la edad de 7 semanas) bajo el control del promotor ARR2 probasina y de forma específica en el epitelio prostático (*Wu et al., 2001*). La expresión de este promotor se encuentra restringida a los tres lóbulos prostáticos (próstata anterior (AP), próstata ventral (VP) y próstata dorsolateral (DLP)), observando también una tasa de recombinación mínima en las vesículas seminales (*Chen et al., 2005*). Este promotor también induce la expresión de bajos niveles de Cre en el oocito, dando lugar a la recombinación en la fase de desarrollo embrionario (*Wu et al., 2001*), por lo que, con el fin de asegurar la recombinación específica de tejido, en la transmisión del transgen Cre empleamos únicamente animales machos.

Con el objetivo de generar los modelos murinos seleccionados partimos de las líneas de ratones transgénicas *Lkb1*<sup>lox/lox</sup> (fondo genético FVB) y BL6/129;*Pb-Cre4Pten*<sup>lox/lox</sup> (fondo genético mixto C57/BL6 y 129sv). Estudios previos han analizado el impacto derivado del fondo genético de diversas líneas murinas sobre la incidencia, progresión y patología del cáncer de próstata, habiendo detectado que la cepa FVB muestra predisposición a la tumorigénesis en este tejido (*Chiaverotti et al., 2008*). Con

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

el fin de eliminar estos efectos, en primer lugar cruzamos a lo largo de cuatro generaciones ratones  $Lkb1^{lox/lox}$  con ratones salvajes de la línea murina C57/BL6, para obtener animales de fondo genético enriquecido en C57/BL6 (estimado 93% C57/BL6). Finalmente cruzamos machos BL6/129; $Pb-cre4Pten^{lox/+}$  con hembras BL6/FVB; $Lkb1^{lox/+}$ , dando lugar en consecuencia, a la siguiente descendencia:  $Pb-cre4Pten^{+/+}Lkb1^{+/+}$ ,  $Pb-cre4Pten^{+/+}Lkb1^{lox/+}$ ,  $Pb-cre4Pten^{+/+}Lkb1^{lox/lox}$ ,  $Pb-cre4Pten^{lox/+}Lkb1^{+/+}$ ,  $Pb-cre4Pten^{lox/+}Lkb1^{lox/+}$  y  $Pb-cre4Pten^{lox/+}Lkb1^{lox/lox}$ . Las líneas murinas obtenidas fueron denominadas  $Lkb1^{pc+/+}$ ,  $Lkb1^{pc+/-}$ ,  $Lkb1^{pc-/-}$ ,  $Pten^{pc+/-}Lkb1^{pc+/+}$ ,  $Pten^{pc+/-}Lkb1^{pc+/-}$  y  $Pten^{pc+/-}Lkb1^{pc-/-}$ . Su patrón de genotipado a partir de DNA genómico de la cola se muestra en la siguiente figura (Fig. R3B).



**FIGURA R3. El modelo murino de cáncer de próstata basado en la pérdida de *Pten* mimetiza los diferentes estadios de la enfermedad en humanos**

**A.** Esquema indicando la progresión del cáncer de próstata en humanos. Se muestran también la progresión de la enfermedad provocada por la pérdida monoalélica y bialélica del gen *Pten*.

**B.** Gel de agarosa en el que se pueden observar los cuatro genotipos murinos que se analizarán en el presente estudio.

Dada la complejidad de estos cruces genéticos para la obtención de animales de diferentes genotipos, algunos grupos se han obtenido en bajo número. Los datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que los ratones  $Lkb1^{pc+/-}$  durante su primer año de vida presentan un comportamiento indistinguible al de los  $Lkb1^{pc+/+}$ , tanto en su variante  $Pten^{pc+/+}$  como en  $Pten^{pc+/-}$  (Torrano and Valcarcel-Jimenez datos no

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

publicados y datos preliminares de esta tesis doctoral). Estos resultados son coherentes con estudios previos (Huang *et al.*, 2008). Por tanto en el análisis comparativo de los animales a tiempos tempranos se ha obviado la caracterización de ratones  $Pten^{pc+/-} Lkb1^{pc+/-}$  y se han utilizado animales  $Pten^{pc+/-} Lkb1^{pc+/-}$ .

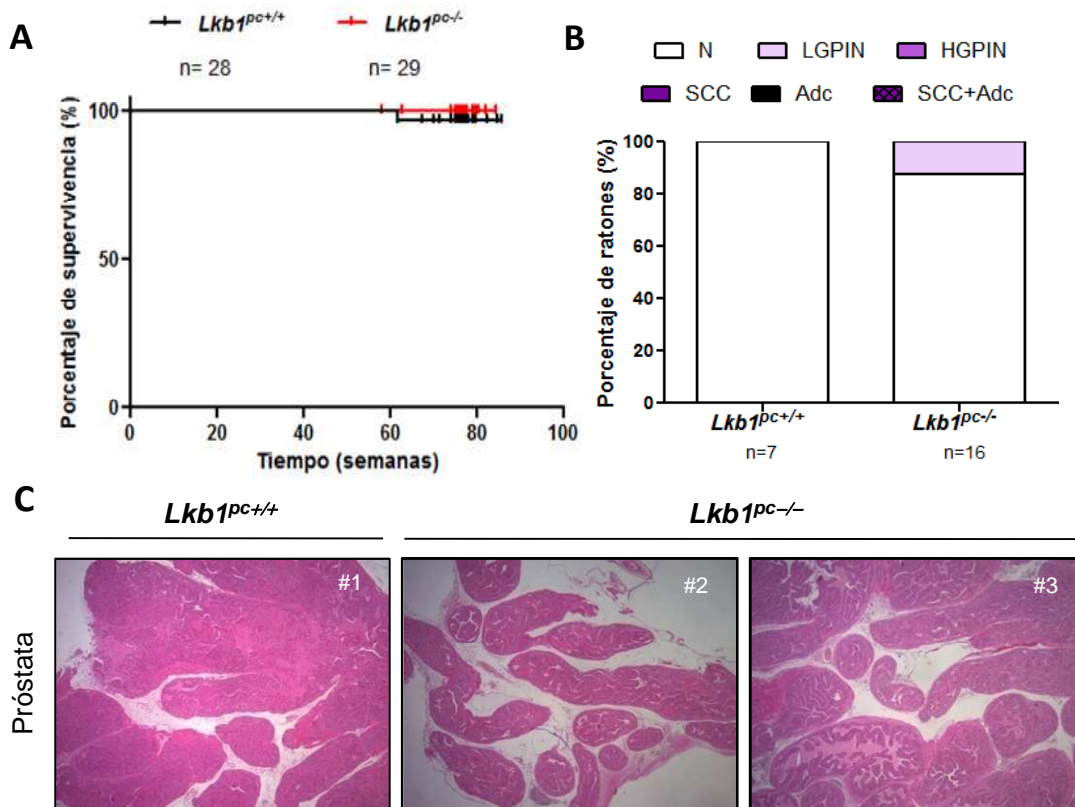
El estudio de las líneas murinas generadas nos ha permitido determinar si la pérdida de *Lkb1* contribuye a la iniciación y/o a la progresión tumoral en el tejido prostático, analizando para ello la supervivencia e histología tisular en función de la identificación de lesiones cancerosas. Hemos determinado, por una parte, si la pérdida de *Lkb1* como único evento genético es capaz de iniciar el cáncer de próstata, y por otra parte, si su pérdida coopera con la haploinsuficiencia de *Pten* en la progresión tumoral.

### 1.2.1. Evaluación de las consecuencias de la delección condicional de *Lkb1* en la próstata en modelos murinos

Con el objetivo de resolver si la pérdida de *Lkb1* como único evento genético tiene un papel causal en el inicio y/o progresión del cáncer de próstata, analizamos la supervivencia y las potenciales alteraciones histológicas presentes en las líneas transgénicas murinas  $Lkb1^{pc+/-}$  y  $Lkb1^{pc-/-}$ . Para analizar la supervivencia de los ratones en función de la expresión de *Lkb1* en el tejido prostático establecimos dos grupos:  $Lkb1^{pc+/-}$  (n=28) y  $Lkb1^{pc-/-}$  (n=29). Los animales fueron monitorizados semanalmente, sin haberse observado deterioro alguno de su salud a lo largo del tiempo. En consecuencia, se sacrificaron a los 18-20 meses de vida, considerando este tiempo punto final experimental. Los resultados derivados se analizaron mediante el método estadístico Kaplan-Meier. Las curvas representativas de la supervivencia muestran una dinámica muy similar en ambos grupos, confirmando mediante el análisis estadístico (p=0,863), que la ausencia de *Lkb1* en el tejido prostático no influye sobre la supervivencia de los ratones (**Fig. R4A**).

Quisimos profundizar en el papel que *Lkb1*, como único evento genético, puede desempeñar en la histopatología de la próstata y para ello analizamos a nivel histológico algunas de las muestras del tejido prostático y pulmonar de ratones  $Lkb1^{pc+/-}$  (n=7) y  $Lkb1^{pc-/-}$  (n=16) a los 18 meses de vida. Como era de esperar, los ratones salvajes no presentaban alteraciones histológicas. El análisis del tejido prostático de los ratones deficientes para *Lkb1* reveló la presencia de lesiones hiperplásicas de baja incidencia (12,5%) de larga latencia (**Fig. R4B**). Cabe destacar la ausencia de lesiones neoplásicas tras la delección de *Lkb1*. (**Fig. R4C**).





**FIGURA R4. La pérdida de LKB1 no afecta a la supervivencia pero provoca la aparición de lesiones hiperplásicas con bajo grado de penetrancia**

**A.** Función de supervivencia calculada a partir del método Kaplan-Meier para ratones WT y ratones *Lkb1* KO condicionales de próstata.

**B.** Gráfico indicativo del número de histologías analizadas por genotipo y el porcentaje de incidencia de las lesiones identificadas en la próstata. Se analizaron tejidos de ratones de 18 meses.

**C.** Imágenes representativas del tejido prostático teñido con hematoxilina/eosina. Se muestran los tejidos de 1 ratón WT y 2 ratones *Lkb1* KO de 18 meses.

Imágenes microscópicas adquiridas a 100X (#1 y #2) y 200X (#3). # Indica el código de ratón N: Tejido sano; LGPIN: PIN de bajo grado; HGPIN: PIN de alto grado; Adc: Adenocarcinoma; SCC: Cáncer de células escamosas

Los resultados obtenidos en la presente tesis discrepan de los derivados del único modelo murino condicional de próstata generado hasta ahora en función de la delección de *Lkb1* (Pearson *et al.*, 2008), ya que en este estudio se muestra que la deficiencia de *Lkb1* reduce la longevidad de los animales y causa la aparición de lesiones PIN en la próstata. Es importante mencionar que el promotor empleado por Pearson *et al.* para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa fue el denominado p450 CYP1A1 (Finn *et al.*, 2007). En este caso la expresión de la Cre recombinasa se produce tras la administración de inductores de CYP1A1, en concreto la administración intraperitoneal de  $\beta$ -naptoflavona produce la recombinación en la práctica totalidad del tracto genito-urinario. Tal como describen los autores del estudio, el empleo del promotor p450 CYP1A1 produce la escisión de *Lkb1* dependiente de la expresión del transgene *AhCre* en los lóbulos de la próstata y en las glándulas uretrales. Además, se producen fenómenos de recombinación independientes de la expresión de

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

*AhCre* que afectan a riñones, glándula bulbouretral, vesícula seminal, testículos y vasos deferentes. Especulamos que los diferentes fenotipos observados en la próstata tras la delección de *Lkb1* son el resultado del empleo de distintos promotores. En nuestro caso, tal como indicábamos anteriormente, hemos empleado el promotor *Pb-Cre4* bajo el control de la expresión de ARR2 probasina que induce la expresión de la enzima Cre recombinasa de forma casi exclusiva en el epitelio prostático (Wu et al., 2001) (Chen et al., 2005). De este modo podemos confirmar que los resultados obtenidos en la presente tesis son el reflejo de la función de *Lkb1* en la supresión de los tumores de próstata. Estos resultados nos llevan a concluir que la pérdida de *Lkb1* como único evento genético no es un factor determinante en la iniciación del cáncer de próstata.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Evaluación de las consecuencias de la delección condicional de *Lkb1* en la próstata en modelos murinos

- Análisis de supervivencia e histológico del modelo murino condicional de próstata *Lkb1<sup>pc+/-</sup>*

### 1.2.2. Evaluación de la cooperatividad de la pérdida combinada de *Lkb1* y *Pten* en cáncer de próstata

También quisimos investigar la potencial cooperación entre *Lkb1* y *Pten* en la supresión del cáncer de próstata. Analizamos, por lo tanto, si la pérdida de monoalélica o bialélica de LKB1 hace progresar el fenotipo dirigido por la heterocigosidad de PTEN.

Con el objetivo de analizar si la pérdida combinada de *Pten* y *Lkb1* produce un efecto sobre la supervivencia de los ratones decidimos establecer los siguientes grupos: *Pten<sup>pc+/-</sup>Lkb1<sup>pc+/-</sup>* (n=16, considerado en base a estudios preliminares no mostrados con un grupo equivalente a *Pten<sup>pc+/-</sup>Lkb1<sup>pc+/+</sup>*) y *Pten<sup>pc+/-</sup>Lkb1<sup>pc-/-</sup>* (n=17) y analizar los resultados mediante el método estadístico Kaplan-Meier. Ambos grupos experimentales fueron monitorizados semanalmente. La vigilancia continuada nos permitió detectar que a partir de los 8 meses de vida los animales pertenecientes al genotipo *Pten<sup>pc+/-</sup>Lkb1<sup>pc-/-</sup>* comenzaban a mostrar un rápido deterioro en su estado de salud. Esta observación dio lugar a monitorizar este grupo 3 días por semana a partir de los 7 meses con el objetivo de asegurar el punto final humanitario. Todos los animales *Pten<sup>pc+/-</sup>Lkb1<sup>pc-/-</sup>* fueron sacrificados en el momento que presentaban signos de deterioro de salud tales como la observación de piloerección o movimientos lentos y postración. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la deficiencia total de *Lkb1* en el contexto genético de la heterocigosidad de *Pten* reduce significativamente la supervivencia de los ratones (vida media  $42,93 \pm 2,81$  semanas). Sin embargo, la heterocigosidad combinada de ambos genes no altera la supervivencia con respecto a los animales salvajes (**Fig. R5A**). Estos resultados indican que la dosis de *Lkb1* tiene un papel crítico en la agresividad de

los tumores derivados de la heterocigosidad de *Pten*, impactando significativamente en la vida media (**Fig. R5A**).

El análisis macroscópico realizado durante la necropsia de los ratones del grupo *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> nos permitió concluir que la causa de la muerte de todos los animales de este genotipo es el avanzado estado y la diseminación del tumor de próstata. Los animales *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> presentaron fusión de los órganos presentes en la cavidad abdominal, integrantes del aparato digestivo, reproductor y excretor (**Fig. R5D**). También presentaron nódulos blancos macroscópicos visibles en diversos órganos tales como riñones, hígado y pulmones, e identificados *a priori* como focos metastáticos (**Fig. R5D**). El análisis histológico de los tejidos de estos animales (n=13-15) nos permitió observar que la combinación genética generada da lugar al desarrollo de cáncer de próstata de células escamosas con una incidencia del 100% (**Fig. 5B**). La mayoría de los casos (84,6%) presentaron además lesiones pulmonares metastáticas y un alto porcentaje presentaron metástasis en nódulos linfáticos inguinales (45,4%) (**Fig. 5C**). Estudiamos asimismo la cohorte de ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc+/-</sup> a dos tiempos relevantes a este estudio: a 10 meses, un tiempo equivalente al de la supervivencia media de los *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> (n=5, datos no mostrados) y a 18 meses, el tiempo final experimental (n=5) (**Fig. 5F**). Los resultados confirmaron que este genotipo no da lugar a la iniciación de cáncer de próstata de modo robusto. A 10 meses, un 60% de los animales presentó PIN de alto grado, y el 40% PIN de bajo grado. A 18 meses, el 20% no presentó lesiones histológicas, un 20% presentó PIN de bajo grado, un 20% PIN de alto grado, un 20% adenocarcinoma intraductal focal y un 20% carcinoma invasivo de células escamosas (**Fig. 5F**). No se observaron signos macroscópicos de metástasis en ninguno de los animales de este genotipo analizados (**Fig. 5G**). La pérdida de un alelo de *Pten* da lugar al desarrollo de adenocarcinomas de próstata (*Chen et al., 2005*) (*Huang et al., 2008*) (*Ittmann et al., 2013*). En este contexto genético observamos que la pérdida bialélica de *Lkb1* en el contexto de la heterocigosidad de *Pten* compromete la diferenciación tumoral con el desarrollo de cáncer de células escamosas.

Cabe destacar que este es el estudio de mayor longevidad que se ha podido realizar en un modelo murino basado en la heterocigosidad de *Pten* en el tejido prostático ya que en los generados hasta ahora la delección se producía en la línea germinal, mostrándose letal a los 12 meses de vida por un fenotipo predominante de linfadenopatías (*Di Cristofano et al., 1998*).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la cooperación entre *Pten* y *Lkb1* en la supresión del cáncer de próstata, demostrando además que la dosis de *Lkb1* influye decisivamente sobre la agresividad del fenotipo resultante. El análisis de los modelos murinos generados nos permite concluir que la delección de *Lkb1* acelera la progresión tumoral en el contexto de la haploinsuficiencia de *Pten* dando lugar a cáncer metastático de próstata en el que la letalidad observada es inherente a la agresividad mostrada por el tumor.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

Cabe destacar que la pérdida completa de *Lkb1* en este modelo desarrolla invariablemente cáncer de próstata de células escamosas. Este es un tipo de tumor no habitual, con una incidencia de entre el 0.5% y el 1% de todos los carcinomas de la próstata. Se describe como un cáncer agresivo con una supervivencia media de 14 meses tras el diagnóstico. No existe tratamiento definitivo aplicándose en la clínica tratamientos de terapia combinada: intervención quirúrgica, quimioterapia multimodal y terapia de radiación (*Malik et al., 2011*). Por tanto, nuestro modelo murino (*Pten<sup>pc+/+</sup>Lkb1<sup>pc-/-</sup>*) podría ser empleado para el estudio del mecanismo molecular del proceso tumorigénico de este tipo de cáncer en la próstata así como herramienta sobre el que probar terapias de potencial aplicación. La importancia del modelo generado (*Pten<sup>pc+/+</sup>Lkb1<sup>pc-/-</sup>*) radica además en que, hasta nuestro conocimiento, es el primer modelo de ratón para el estudio de cáncer de próstata en el que se observa que el desarrollo metástasis es responsable de la letalidad (revisado en *Parisotto and Metzger, 2013*). Este modelo mimetiza la progresión del cáncer de próstata en humanos por lo que esperamos que su estudio nos permita ayudar a establecer las bases moleculares que actúan en la tumorigénesis, desde la aparición de lesiones precancerosas hasta el desarrollo de metástasis letales.

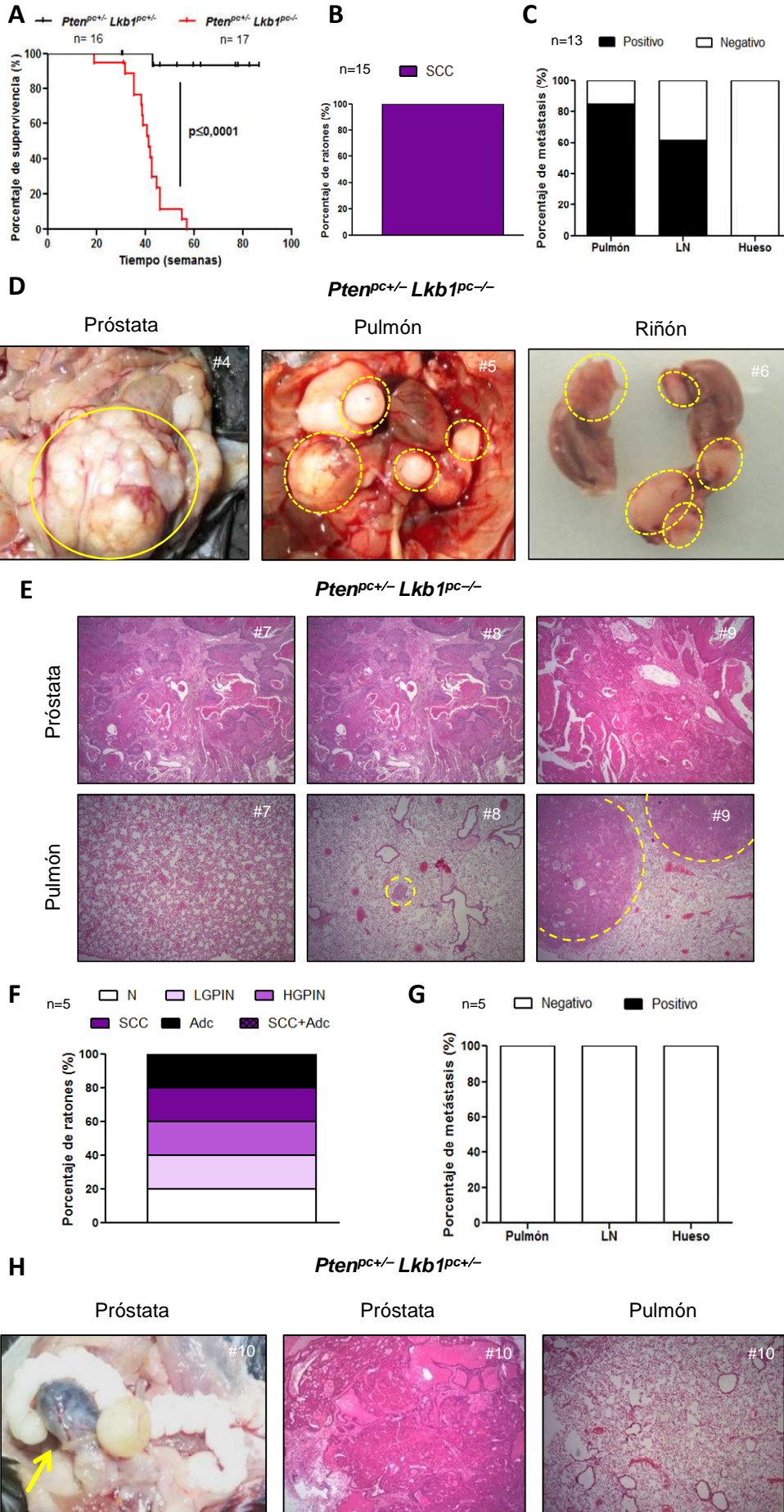
El cáncer de próstata presenta tropismo para la metástasis en el tejido óseo, mostrando características osteoblásticas más que lesiones osteolíticas (*Logothetis and Lin, 2005*). El análisis patológico de huesos largos (tibia y peroné) no ha mostrado la presencia de lesiones metastáticas (**Fig. 5C**), aun así, sería interesante analizar otros huesos con el objetivo de descartar la metástasis en este tejido. También sería de interés analizar la presencia de metástasis en el cerebro ya que este órgano también ha sido descrito como tejido diana de metástasis del cáncer de próstata (*Craig et al., 2015*).

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Evaluación de la cooperatividad de la pérdida combinada de *Lkb1* y *Pten* en cáncer de próstata

- Analizar mediante técnicas inmunohistoquímicas tejidos óseo y cerebral. Mediante la detección de AR se podrían confirmar la presencia de lesiones metastáticas originadas en la próstata
- Análisis de supervivencia e histológico del modelo murino condicional de próstata *Pten<sup>pc-/-</sup>Lkb1<sup>pc-/-</sup>*

# Resultados y Discusión- Objetivo 1



## Resultados y Discusión- Objetivo 1

### FIGURA R5. La pérdida combinada de *Pten* y *Lkb1* colaboran en la progresión del cáncer de próstata dirigido por la haploinsuficiencia de *Pten*

**A.** Función de supervivencia calculada a partir del método Kaplan-Meier para ratones condicionales de próstata, *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc+/-</sup> y *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup>.

**B.** Gráfico indicativo del porcentaje de incidencia de las lesiones identificadas en la próstata de ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup>. Se analizaron tejidos de ratones de 10 meses aproximadamente.

**C.** Gráfico representativo del porcentaje de metástasis de ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> de 10 meses aproximadamente.

**D.** Imágenes representativas de la próstata, pulmón y riñón de 3 ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> de 10 meses.

**E.** Imágenes representativas del tejido prostático y pulmonar teñido con hematoxilina/eosina. Se muestran los tejidos de 3 ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> de 10 meses.

**F.** Gráfico indicativo del porcentaje de incidencia de las lesiones identificadas en la próstata de ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc+/-</sup>. Se analizaron tejidos de ratones de 18 meses.

**G.** Gráfico representativo del porcentaje de metástasis de ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc+/-</sup> de 18 meses.

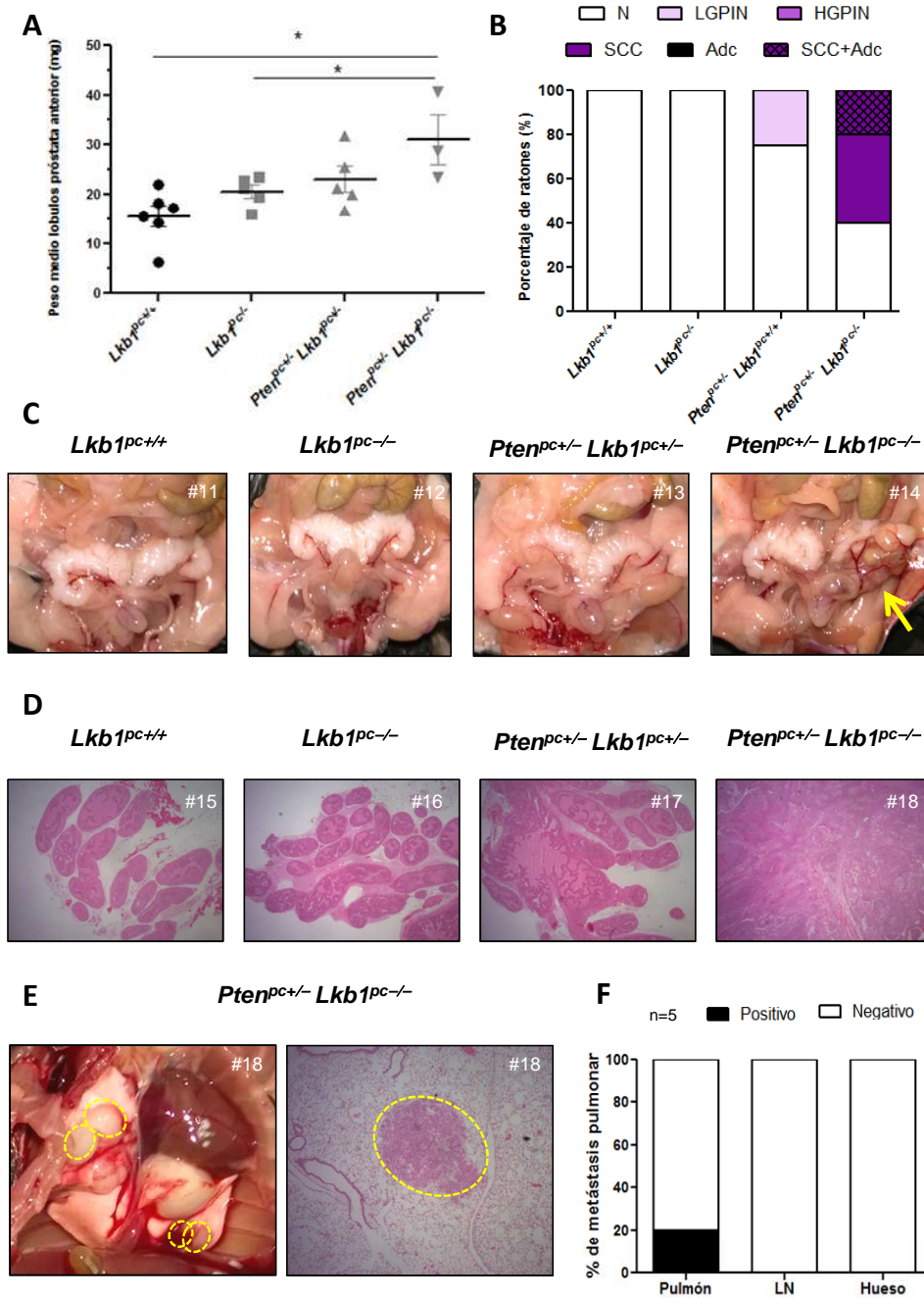
**H.** Imagen representativa de la próstata e imágenes representativas del tejido prostático y pulmonar teñido con hematoxilina/eosina de un ratón *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc+/-</sup> de 18 meses. El animal presenta cáncer de células escamosas invasivo sin lesiones de metástasis.

Todas las imágenes microscópicas fueron adquiridas a 100X, excepto la imagen #8 del tejido pulmonar que fue adquirida a 200X. Las flechas amarillas indican tumores de próstata. Los círculos amarillos indican tumores invasivos de próstata. Los círculos amarillos punteados indican focos de metástasis. # Indica el código de ratón

N: Tejido sano; LGPIN: PIN de bajo grado; HGPIN: PIN de alto grado; LN: Nódulo linfático; Adc: Adenocarcinoma; SCC: Cáncer de células escamosas

### 1.2.3. Análisis comparativo de los modelos murinos generados a tiempos tempranos

La reducción de la vida media observada en los ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> imposibilitó el análisis histológico comparativo de los tejidos a mismos tiempos de los diferentes genotipos. Por lo tanto, decidimos establecer un nuevo grupo de animales experimentales compuesto por individuos de los cuatro genotipos de estudio a seis meses de edad (n=3-6). La extracción individualizada de los tres lóbulos prostáticos y su pesaje nos permitió llevar a cabo el análisis comparativo de los tejidos. La medida del peso medio de los lóbulos anteriores de las próstatas confirmó la hiperplasia tisular en los dobles mutantes con delección de *Lkb1* en homocigosis. La siguiente figura muestra los resultados correspondientes al lóbulo prostático anterior (**Fig. R6A**), aunque la tendencia observada fue la misma en los 3 lóbulos.



**FIGURA R6. La pérdida de *Lkb1* y la haploinsuficiencia de *Pten* aceleran la progresión del cáncer próstata**

**A.** Gráfico en el que se muestra la media de los pesos de los 2 lóbulos anteriores de la próstata de ratones de 6 meses (n=6; n=5; n=5; n=3).

**B.** Gráfico indicativo de los genotipos analizados y el fenotipo mostrado a los 6 meses en la próstata. (n=6; n=3; n=4; n=5)

**C. y D.** Imágenes representativas de la próstata (**C**) y del tejido prostático teñido con hematoxilina/eosina (**D**) de ratones de 6 meses.

**E.** Imagen representativa del tórax e imagen representativa del tejido pulmonar teñido con hematoxilina/eosina de un ratón *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> de 6 meses. El animal presenta SCC multifocal invasivo con metástasis pulmonar.

**F.** Gráfico representativo del porcentaje de metástasis pulmonar de ratones *Pten*<sup>pc+/-</sup>*Lkb1*<sup>pc-/-</sup> de 6 meses

Todas las imágenes microscópicas fueron adquiridas a 100X, excepto la #18 que fue adquirida a 200X. Las flechas amarillas indican tumores de próstata. Los círculos amarillos punteados indican puntos de metástasis. # Indica el código de ratón.

N: Tejido sano; LGPIN: PIN de bajo grado; HGPIN: PIN de alto grado; Adeno: Adenocarcinoma; SCC: Cáncer de células escamosas; LN: Nódulo linfático

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

Los órganos de los ratones de los cuatro genotipos estudiados fueron analizados macroscópicamente e histológicamente en el momento del sacrificio. El examen de los animales  $Pten^{pc+/-}Lkb1^{pc-/-}$  reveló la presencia de cáncer de próstata en el 60% de los casos (dos casos de cáncer de células escamosas y un caso de carcinoma adenoescamoso). El análisis del resto de los genotipos reveló la ausencia de lesiones malignas (**Fig. R6B, C y D**). El examen macroscópico de la cavidad torácica de ratones  $Pten^{pc+/-}Lkb1^{pc-/-}$  reveló la presencia de nódulos pulmonares, compatibles con lesiones metastáticas en el análisis histológico en un 20% de los animales (**Fig. R6E**).

El análisis comparativo de los tejidos indica que a los 6 meses de vida la línea murina  $Pten^{pc+/-}Lkb1^{pc-/-}$  desarrolla cáncer de próstata metastático de modo temprano, mientras que en el resto de los genotipos analizados no se observan alteraciones significativas a este tiempo. Observamos además que la pérdida total de *Lkb1* a 6 meses se refleja en la presencia mayoritaria de cáncer de células escamosas en detrimento de la presencia de adenomas (PIN), característicos del fenotipo tumoral derivado de la heterocigosidad de *Pten* (Ittmann *et al.*, 2013). Estos resultados se sitúan en línea con los mostrados a tiempos tardíos (10 meses) (**Fig. 5**).

Una vez comprobada la relevancia de la pérdida de LKB1 en el cáncer de próstata humano y su papel a través de modelos murinos genéticos, el siguiente paso consistió en desentrañar su mecanismo de acción mediante el uso de modelos *in vitro*.

### 1.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPRESORA DE LKB1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Los resultados mostrados hasta ahora apuntan hacia el papel que LKB1 desarrolla en la inhibición del cáncer de próstata, lo que nos llevó a preguntarnos cuál sería su mecanismo de acción. LKB1, a través de sus dianas de la familia AMPK-RK, ha sido implicado en la regulación de diversas funciones biológicas que intervienen a lo largo de la oncogénesis (revisado en (Alessi *et al.*, 2006)). Postulamos, por lo tanto, que estos podrían ser los procesos mediadores en el mecanismo de supresión tumoral que nos interesa.

AMPK es la diana más estudiada, habiéndose descrito extensamente las consecuencias de su activación (revisado en Mihaylova and Shaw, 2011). Proponemos que el mecanismo de acción de LKB1 podría ser dependiente de AMPK, lo cual potencialmente podría verse reflejado en un descenso del crecimiento tumoral (Hardie, 2011) y/o en la inhibición del efecto Warburg (Faubert *et al.*, 2013). Por otra parte, el resto de miembros de la familia han sido ampliamente implicados en la regulación de la polaridad celular (revisado en Bright *et al.*, 2009), por lo que razonamos que la alteración de esta función biológica potencialmente podría dar pie a la adquisición de capacidades oncogénicas permisivas del desarrollo de metástasis. Los datos obtenidos del estudio de los modelos murinos generados avalan esta hipótesis. Proponemos que



uno de los mecanismos planteados o bien la combinación de varios son los responsables de la supresión tumoral ejercida por LKB1 en el cáncer de próstata.

### HIPÓTESIS

**El mecanismo de acción de LKB1 en la supresión del cáncer de próstata regula negativamente:**

- ✓ **El crecimiento celular**
- ✓ **La adquisición de capacidades metastáticas**

Con el objetivo de investigar en el mecanismo de acción de LKB1, en primer lugar, se determinó la expresión de esta proteína en un panel de líneas celulares de cáncer de próstata. En base a estos resultados pudimos construir un modelo celular sobre el que estudiar las consecuencias de la presencia de LKB1 en función de los criterios planteados en la hipótesis. El estudio de estos parámetros biológicos nos permitió evaluar la inhibición de algunas de las capacidades oncogénicas postuladas en el modelo actual de progresión del cáncer (*Hanahan and Weinberg, 2000*) (*Hanahan and Weinberg, 2011*). Mediante esta estrategia nos propusimos identificar qué características tumorales se encuentran alteradas en presencia de LKB1.

### 1.3.1. Generación de un modelo celular para el estudio del mecanismo de acción de LKB1

En primer lugar, analizamos los niveles transcripcionales y proteicos presentes en un conjunto de líneas celulares de cáncer de próstata.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Generar un modelo celular válido sobre el que estudiar el mecanismo de acción de LKB1

**Muestras:** Células DU145 deficientes para LKB1 de las que derivamos las líneas isogénicas: pBABE, pBABE-LKB1 y pBABE-LKB1 KD

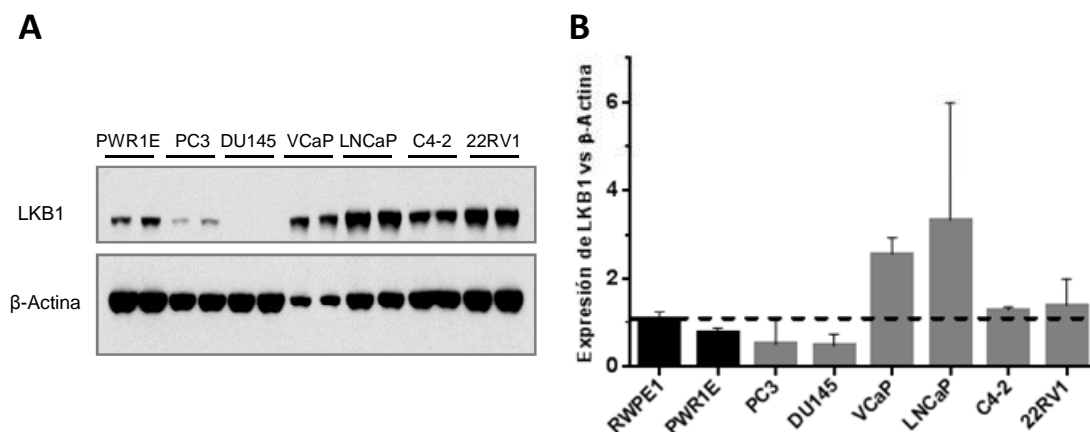
**Metodología:** Líneas generadas mediante infección retroviral y expresión de LKB1 analizada mediante Western blot (WB) y PCR cuantitativa en tiempo real (qRTPCR)

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

Los análisis de expresión realizados mediante WB y qRTPCR y llevados a cabo en paralelo, mostraron una correlación entre los niveles de mRNA y proteína de LKB1, lo cual no es una norma en el contexto del cáncer de próstata (*Varambally et al., 2005*) (**Fig. R7**). Cabe destacar el hecho de que las líneas celulares benignas PWR1E y

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

RWPE1 no presentan los mayores niveles de expresión de LKB1, como podría corresponder a un gen supresor de tumores clásico. En línea con esta observación en cáncer de pulmón se ha descrito que existe un conjunto de tumores ( $\approx 20\%$ ) que en los que se detectan altos niveles de LKB1 (Conde *et al.*, 2007).



**FIGURA R7. El nivel de expresión de LKB1 varía en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata**

**A.** Western blot representativo mostrando la expresión de LKB1 en líneas celulares de cáncer de próstata (n=3).

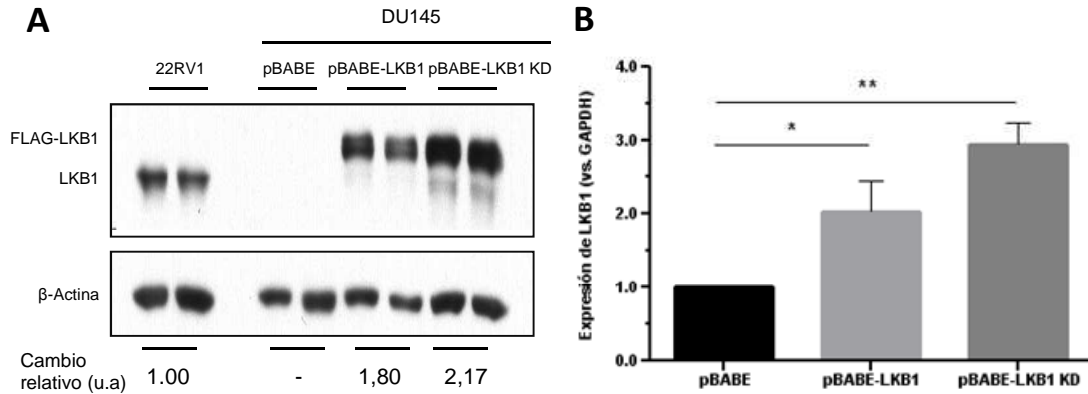
**B.** Análisis de la expresión de LKB1 en líneas celulares de cáncer de próstata mediante qRT-PCR. Las barras negras y grises representan líneas celulares de cáncer de próstata, benignas y agresivas respectivamente. Se representa la desviación estándar (n=3).

Observamos que en la línea celular DU145 carece de expresión para LKB1 (**Fig. R7**). Estos resultados están en concordancia con estudios previos en los que se identifica una mutación, consistente en la delección de cinco nucleótidos, que desplaza el marco de lectura y da lugar a un producto proteico truncado (Ikediobi *et al.*, 2006). La mutación *STK11 Hom c.532\_536delAAGCC p.K178fsX8* se detecta en homocigosis en LKB1. Esta característica genética nos permitió generar un modelo celular sobre el cual estudiar las consecuencias de la reconstitución de LKB1, con el objetivo de investigar su mecanismo de acción en la supresión del cáncer de próstata.

Por otra parte, cabe destacar, que la línea celular DU145 no presenta mutaciones para el gen PTEN (Ikediobi *et al.*, 2006) y que la proteína se expresa correctamente (Rhee *et al.*, 2014). Debido a ello, queremos remarcar que efectos observados tras la expresión ectópica de LKB1 en esta línea celular no serán consecuencia del potencial mecanismo de cooperación entre ambos genes.

Con el objetivo de estudiar el mecanismo de acción de LKB1 en la supresión del cáncer de próstata, infectamos células diana con partículas retrovirales que codifican el gen salvaje LKB1 o un mutante inactivo (K78I) (Shaw *et al.*, 2004). Conseguimos de esta manera establecer tres líneas isogénicas que difieren únicamente en la expresión de LKB1. La línea que denominaremos pBABE, fue infectada mediante retrovirus que contenían el vector de expresión vacío, es por lo tanto deficiente para LKB1 y se

empleará como control. La línea DU145-pBABE-LKB1 WT expresa en un único transcripto la forma salvaje de LKB1 precedida por el octapéptido FLAG en el mismo marco de lectura. La línea celular DU145-LKB1 KD expresa un mutante LKB1 sin actividad catalítica y con la marca FLAG. Este mutante fue generado con el objetivo de discernir entre actividades dependientes e independientes de la actividad quinasa de LKB1.



**FIGURA R8. La expresión de LKB1 tras su introducción en la línea celular DU145 es comparable a la expresión endógena en la línea celular 22RV1**

**A.** Western blot mostrando la expresión de LKB1 tras la generación por infección retroviral de células estables que sobreexpresan LKB1 o LKB1-KD en la línea celular DU145. La expresión de LKB1 fue cuantificada por densitometría y relativizada a los niveles de expresión de  $\beta$ -actina. Se muestra el aumento relativo de los niveles de LKB1 en las células DU145 frente a las células 22RV1.

**B.** qRT-PCR mostrando la expresión exógena de LKB1 en la línea celular DU145 (n=3).

\*\*p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01

Quisimos a continuación comprobar el nivel de expresión obtenido en las condiciones de expresión ectópica de LKB1, realizando para ello el análisis a nivel de proteína y de transcripto (**Fig. R8**). La sobreexpresión de LKB1 podría dar lugar a efectos artefactuales si la abundancia de proteína no se ajusta a la endógena en sistemas celulares relacionados. Con el objetivo de descartar esta situación, llevamos a cabo un análisis semicuantitativo del WB. La aplicación de técnicas de densitometría nos permite relativizar la expresión de LKB1 a los niveles la proteína control seleccionada ( $\beta$ -actina) y calcular de esta manera el cambio de expresión relativo a nivel proteico (**Fig. R8A**). Observamos que el nivel de expresión de LKB1 ectópico es comparable al nivel que presenta LKB1 en la línea celular 22RV1. La selección de esta línea celular como control se realizó en función de los resultados derivados del análisis de expresión sobre nuestro panel de células de cáncer de próstata. Los resultados mostraron que la línea celular 22RV1 presenta unos niveles de expresión cercanos a los mostrados por las líneas celulares benignas RWPE1 y PWR1E (**Fig. R7**). El haber clonado el péptido FLAG anexo a la secuencia codificante de LKB1 explica la diferencia de migración de LKB1 ectópico en gels de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los resultados derivados del análisis de expresión a nivel transcripcional confirman que el nivel de

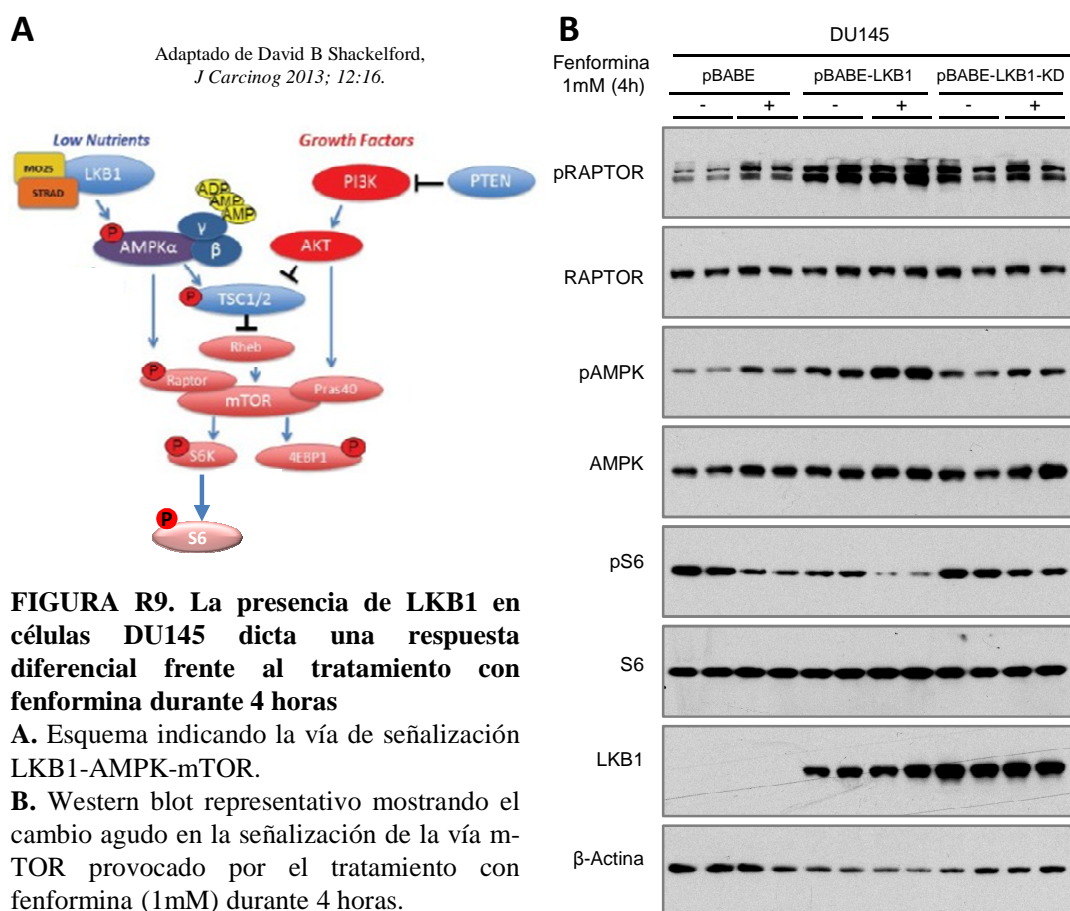
## Resultados y Discusión- Objetivo 1

mRNA de la forma ectópica de LKB1 se mantiene en el mismo orden de magnitud y a concentraciones comparables (**Fig. R8B**).

Por lo tanto, hemos generado un modelo celular basado en la reconstitución de LKB1 en células de cáncer de próstata deficientes para el gen, en el que se consigue un nivel de expresión comparable al observado en líneas tumorales. Antes de comenzar a estudiar el mecanismo de acción de LKB1 en la tumorigénesis de próstata, quisimos confirmar que las construcciones introducidas cumplían las funciones celulares que les habían sido atribuidas anteriormente, analizando para ello la respuesta ante el estrés de energía.

LKB1 ha sido descrita como una quinasa maestra controladora del metabolismo y del crecimiento a través de AMPK y de la vía mTOR (*Shackelford, 2013*). La activación de la vía LKB1/AMPK regula negativamente el complejo de señalización mTOR. En concreto, AMPK inhibe mTORC1 a través de la fosforilación directa del complejo TSC2 y de la proteína de anclaje RAPTOR, dando lugar a un descenso en la señalización de la vía (**Fig. R9A**). En concordancia con esta descripción mecanística, se ha observado que el tratamiento con fenformina es capaz de inducir una respuesta diferencial en células de cáncer de pulmón que carecen de LKB1 funcional. Lo cual se refleja en un diferente grado de señalización de la vía mTOR y en una mayor activación de las vías apoptóticas. (*Shackelford et al., 2013*), parcialmente debida a la incapacidad de facilitar un respuesta celular adaptativa (*Shaw et al., 2004*). La fenformina actúa a nivel de la mitocondria, inhibiendo de manera transitoria el complejo I de la cadena de transporte de electrones (*Owen et al., 2000*) (*Dyken et al., 2008*), reduciendo en consecuencia la producción de ATP mitocondrial e incrementando la concentración de AMP intracelular. Tal como indicábamos en la introducción, el AMP libre se une a la subunidad  $\gamma$  reguladora de AMPK permitiendo así su activación (*Hawley et al., 2010*). Basándonos en este conocimiento, evaluamos el comportamiento de nuestro sistema celular mediante el estudio de la respuesta aguda (4 horas) ante el tratamiento con fenformina (1 mM), analizando para ello el estado de activación de la vía mTOR a diferentes niveles (**Fig. R9B**). El nivel de fosforilación de la proteína ribosomal S6 se emplea habitualmente como medida del grado de activación de la ruta (*Dibble and Manning, 2013*). Por lo tanto, con el objetivo de confirmar la activación diferencial de la vía en función de la presencia de LKB1, decidimos monitorizar el estado de fosforilación de AMPK, RAPTOR y S6. Observamos que, en ausencia de estrés energético, la presencia de LKB1 funcional se correspondía con una mayor inhibición de la ruta. Esta situación se reflejó en las alteraciones observadas en los niveles de fosforilación de las proteínas seleccionadas, tanto en el aumento en los niveles de fosforilación de los inhibidores de la vía, RAPTOR y AMPK, así como en la inhibición del nivel de fosforilación de S6. Cabe destacar que frente al estrés energético inducido por el tratamiento con fenformina observamos que las líneas celulares carentes de LKB1 funcional responden mediante un aumento moderado en los niveles de fosforilación de RAPTOR y AMPK y un descenso, también moderado, en el nivel de fosforilación de S6. Estos resultados indican que, en respuesta al tratamiento con fenformina, las células

tumorales del tejido prostático deficientes para LKB1 son capaces de compensar su carencia mediante la acción de otra quinasa capaz de realizar parcialmente su cometido. En células DU145 se ha observado que JNK es capaz de activar AMPK en respuesta a la privación de glucosa (Yun *et al.*, 2005), por lo que especulamos que esta puede ser la quinasa que active AMPK en respuesta al tratamiento con fenformina en este contexto celular. En el cáncer de otros tejidos se ha observado que CAMKK $\beta$  (Xi *et al.*, 2013) y DNA-PK (Amatya *et al.*, 2012) son capaces de activar AMPK en ausencia de LKB1. De todas formas, las células que carecen de la función de LKB1 no alcanzan los niveles de regulación de la vía que se observan en las células competentes, indicando que, aunque otras quinasas puedan llevar a cabo parcialmente su función, no lo hacen de una manera tan efectiva (**Fig. R9B**). El estudio del grado de activación de la vía mTOR en respuesta frente al estrés energético, nos permitió verificar que las células que expresan LKB1 ectópico se comportan tal como había sido descrito anteriormente (Shackelford, 2013). Este hecho se refleja en la activación diferencial de la ruta en función de la presencia de la forma salvaje de LKB1. Confirmamos de esta forma que el modelo celular generado cumple las funciones que le han sido atribuidas, así como su validez para el estudio del mecanismo de acción de LKB1 en la supresión del cáncer de próstata.



**FIGURA R9. La presencia de LKB1 en células DU145 dicta una respuesta diferencial frente al tratamiento con fenformina durante 4 horas**

**A.** Esquema indicando la vía de señalización LKB1-AMPK-mTOR.

**B.** Western blot representativo mostrando el cambio agudo en la señalización de la vía mTOR provocado por el tratamiento con fenformina (1mM) durante 4 horas.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

El sistema celular incluye la expresión de dos formas de LKB1, la salvaje y una mutante sin actividad catalítica. Discutiremos los resultados obtenidos en dos apartados independientes:

1.3.2.- Evaluación de las consecuencias de la expresión de LKB1. Efecto dependiente de su actividad quinasa

1.3.3.- Evaluación de las consecuencias de la expresión de un mutante LKB1 sin actividad catalítica. Efecto independiente de su actividad quinasa

### 1.3.2. Evaluación de las consecuencias de la expresión de LKB1. Efecto dependiente de su actividad quinasa

En este apartado caracterizamos dos líneas celulares DU145 isogénicas, que únicamente difieren en la expresión de LKB1. Estudiaremos ambas líneas en función de una selección parámetros que evalúan la competencia celular en determinadas características tumorales requeridas para la progresión del cáncer (*Hanahan and Weinberg, 2000*) (*Hanahan and Weinberg, 2011*). Mediante el análisis de las consecuencias de su expresión nos propusimos desvelar las funciones celulares que regula LKB1 en el cáncer de próstata. Investigamos asimismo si la presencia de LKB1 se opone a la capacidad de las células tumorales de proliferar, de alterar su metabolismo energético y/o a la de activar la invasión tisular. A continuación, con el objetivo de identificar genes implicados en su mecanismo de acción, estudiaremos las alteraciones inducidas por su presencia en el perfil de expresión génica.

#### 1.3.2.1. Estudio de los efectos biológicos derivados de la expresión de LKB1

LKB1 fosforila y activa un total de 14 quinastas pertenecientes a la subfamilia AMPK-RK (*Alessi et al., 2006*) que a su vez son potenciales mediadoras de su acción inhibitoria del desarrollo tumoral. Las dianas de LKB1 ejercen sus funciones en la regulación de la proliferación, del fenotipo metabólico y de la polaridad celular (*Alessi et al., 2006*). Por lo tanto, decidimos estudiar si la presencia de LKB1 alteraba alguno de estos parámetros.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Analizar el número relativo de células

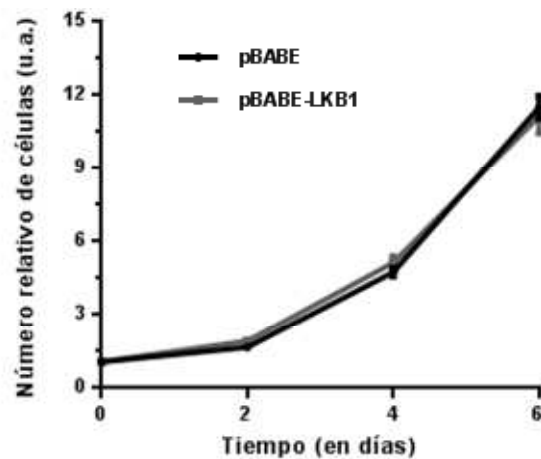
**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1

**Metodología:** Ensayo de cristal violeta

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

El análisis del número relativo de células indica que la presencia de LKB1 no se refleja en la disminución del crecimiento celular (**Fig. R10**). La hipótesis planteada predecía que la presencia de LKB1 podría inhibir la señalización y el metabolismo proliferativos a través de AMPK. Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran diferencias, sugiriendo que el mecanismo de supresión tumoral de LKB1 no se ejerce a través del control del crecimiento celular.

La presencia de LKB1 en condiciones basales no es suficiente para inhibir el crecimiento celular, quizá debido a que ésta actúa en respuesta al déficit de energía (*Shackelford, 2013*). Razonamos, por lo tanto, que en condiciones de estrés energético es posible que la expresión de LKB1 funcional se pueda reflejar en la disminución de la viabilidad celular, cuestión que desarrollaremos en el objetivo 2. También sería interesante analizar el crecimiento celular de estas células en condiciones de hipoxia, ya que es un estímulo capaz de activar AMPK y descrito como habitual en el entorno tumoral (*Vaupel and Harrison, 2004*).



**FIGURA R10.** La expresión exógena de LKB1 no altera el crecimiento celular en la línea DU145

Número relativo de células totales analizado por cristal violeta. Se muestra un experimento representativo y su desviación estándar (n=9).

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Estudio del crecimiento celular

- Analizar el crecimiento en condiciones de hipoxia
- Analizar el ciclo celular

Observamos que la presencia de LKB1 no regula el crecimiento celular. Por otra parte, los resultados derivados del estudio sobre la línea murina *Pten<sup>pc+/-</sup>Lkb1<sup>pc-/-</sup>* demuestran que la pérdida combinada de ambos genes permite a las células tumorales en transformación maligna adquirir la capacidad oncogénica de desarrollar metástasis. En base a estos datos, nos propusimos averiguar si éste podría ser el mecanismo de supresión tumoral ejercido por LKB1. Con el objetivo estudiar si LKB1 regula los procesos biológicos que permiten la metástasis, analizamos si su presencia se podría reflejar en la disminución de tres capacidades de obligada adquisición a lo largo del

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

desarrollo tumoral. Las tres capacidades seleccionadas fueron la capacidad de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje, la de migración y la de invasión.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Analizar funcionalmente capacidades oncogénicas

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1

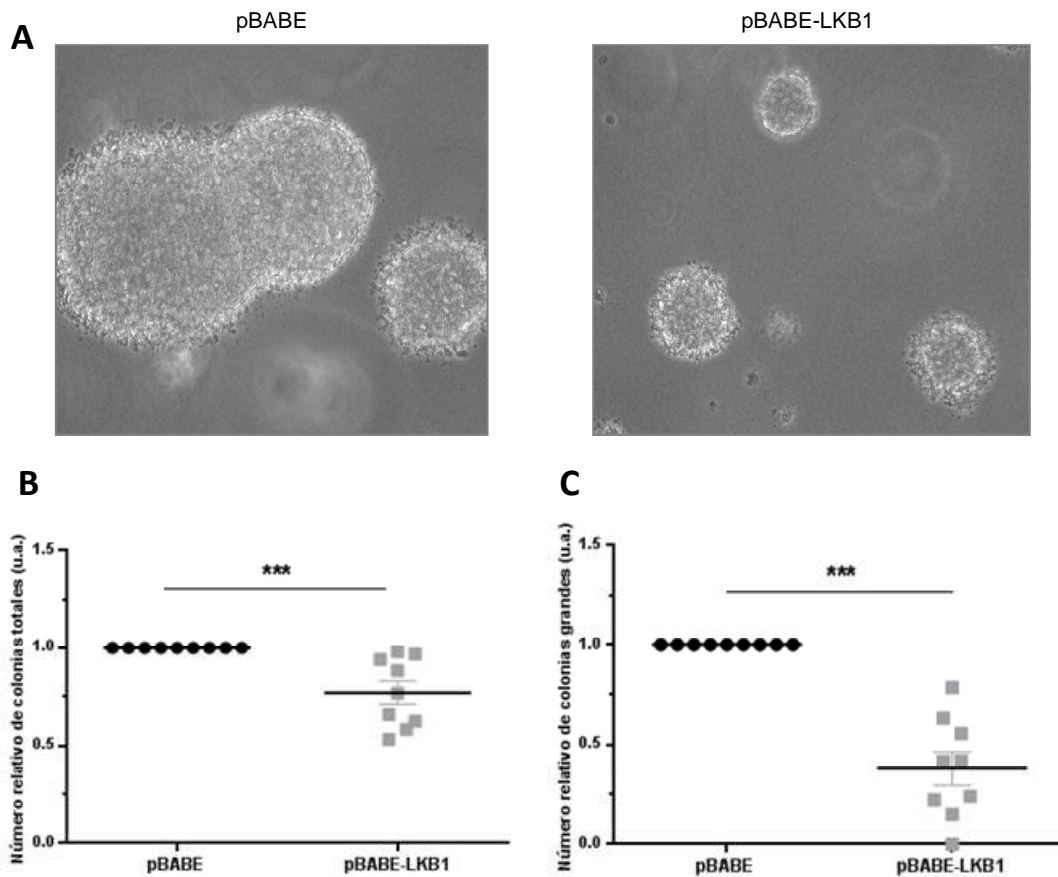
**Metodología:**

- Análisis de la capacidad de crecimiento en condiciones independientes de anclaje: Ensayo de formación de colonias en agar blando
- Cuantificación de las capacidades de migración e invasión: Ensayo en cámaras de Boyden

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución.

Para evaluar el grado de transformación maligna de las células DU145 en función de la presencia de LKB1, decidimos llevar a cabo un ensayo de crecimiento en condiciones independientes de anclaje. Con este fin, sembramos células embebidas en un sustrato de agar blando y analizamos al cabo de 21 días la capacidad sobrevivir y de formar de colonias. Tal como se aprecia en las microfotografías mostradas (**Fig. R11A**), la presencia de LKB1 inhibió notablemente el crecimiento de las colonias formadas en estas condiciones, reflejándose en una reducción del 25% en el número de colonias presentes, (**Fig. R11B**) y de una manera más acusada, en el tamaño de las mismas, cuantificándose una disminución cercana al 60% en la formación de colonias de gran tamaño (**Fig. R11C**). Estos resultados indican que la presencia de LKB1 inhibe tanto la capacidad para iniciar la formación de colonias, como la capacidad de proliferación de las mismas, sugiriendo que parte del mecanismo de supresión del cáncer de próstata de LKB1 potencialmente radica suprimir estas funciones biológicas.





**FIGURA R11. La expresión exógena de LKB1 en células DU145 hace disminuir el número y el tamaño de las colonias formadas en agar blando**

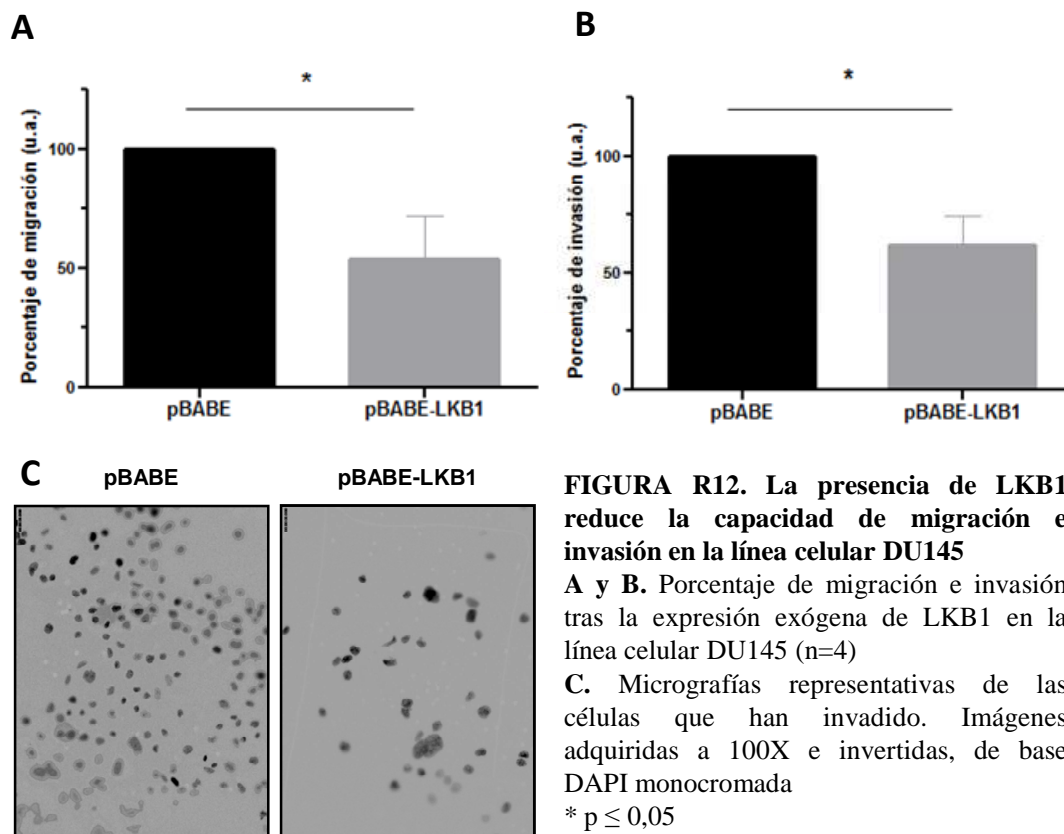
**A.** Micrografías representativas de las colonias formadas tras crecer 21 días en agar blando. Imágenes adquiridas a 100X

**B. y C.** Cuantificación correspondiente al número total de colonias (**B**) y al número de colonias de tamaño grande (**C**) formadas (n=8). Se consideraron grandes las colonias que al menos triplicaban el tamaño medio del resto

\*\*\*  $p < 0,001$

Quisimos también analizar si su presencia regula la capacidad de migración y/o la de invasión, ambas de obligada adquisición para el desarrollo de metástasis. Para caracterizar las células en base a estas capacidades los ensayos fueron llevados a cabo mediante el empleo de cámaras de Boyden. El diseño de estas cámaras permite cuantificar el porcentaje de células capaces de migrar a través del poro del filtro situado entre ambas cámaras, o bien, el porcentaje de células capaz de atravesar, además del poro, una capa de matrigel que imita a la matriz extracelular a invadir. El análisis de las capacidades de migración e invasión reveló que la presencia de LKB1 reduce ambos parámetros en un 50% y en un 40% respectivamente (**Fig. R12A y B**), apuntando hacia la posibilidad de que LKB1 sea un importante supresor de las capacidades invasivas de las células tumorales.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1



### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Estudio funcional de las capacidades oncogénicas relacionadas con el desarrollo de metástasis

- Recuperar las células, tanto del cultivo de agar como las que han migrado/invadido, y analizar la variación del perfil transcripcional y la activación de las dianas de LKB1.
- Análisis *in vivo* de las capacidades metastáticas: Ensayo de inyección en la vena de la cola

Podemos concluir que parte del mecanismo supresor de tumores ejercido por LKB1 se centra en la inhibición de las capacidades de migración e invasión tisular.

Los resultados obtenidos nos permiten demostrar que la presencia de LKB1 reduce la capacidad de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje, la capacidad de migración y la de invasión. Estos resultados avalan parcialmente la hipótesis planteada e indican que LKB1 puede ejercer su mecanismo de acción antitumoral a través de una potente inhibición de los procesos biológicos que facilitan el desarrollo de metástasis.

### 1.3.2.2. Análisis de las consecuencias del silenciamiento de LKB1 sobre la línea celular PC3

Con el objetivo de investigar el mecanismo de supresión tumoral ejercido por LKB1 y su potencial, quisimos averiguar si LKB1 podría llegar a regular la función de una línea celular altamente metastática, seleccionando para ello la línea PC3. El análisis de las consecuencias del silenciamiento de LKB1 sobre el crecimiento celular y sobre la capacidad de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje nos permitió determinar la implicación de LKB1 sobre estos parámetros.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Analizar de las consecuencias del silenciamiento de LKB1 sobre la línea celular PC3

**Muestras:** Líneas celulares isogénicas PC3 que difieren en la expresión de LKB1

**Metodología:**

- Generación de las líneas celulares: Infección lentiviral y selección con puromicina
- Análisis de la expresión de LKB1: WB
- Análisis de la viabilidad celular: Ensayo de cristal violeta
- Análisis de la capacidad de crecimiento en condiciones independientes de anclaje: Ensayo de formación de colonias en agar blando

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

El RNA de interferencia (RNAi) es un RNA de doble hebra que da lugar al silenciamiento del gen de una manera específica (*Fuchs et al., 2004*). Con el objetivo de conseguir el silenciamiento génico mediado por RNAi introdujimos, a través de vectores lentivirales, secuencias con bucle cortas de RNA (shRNA) diseñadas específicamente para silenciar el gen LKB1, lo que nos permitió mantener un nivel de silenciamiento estable de manera indefinida gracias a la capacidad del lentivirus de incorporar su material genético (incluyendo el RNAi) en el genoma celular. La mayor limitación de la técnica se debe a los efectos relativos al silenciamiento inespecífico de otros genes, para evitarlos se emplearon dos secuencias de silenciamiento diferentes. La hipótesis planteada predice que el silenciamiento de LKB1 podría exacerbar la agresividad de la línea celular PC3, caracterizada mediante el estudio de la capacidad de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje.

Con el objetivo de evaluar las consecuencias del silenciamiento de LKB1 sobre una línea celular altamente metastática infectamos la línea celular PC3 con partículas lentivirales portadoras del vector de un RNAi control (*scramble*, pLKO) o de una de las dos secuencias cortas de silenciamiento empleadas (shLKB1.04 y shLKB1.05). El análisis de expresión de proteínas realizado mediante WB nos permitió comprobar que

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

ambas secuencias silenciaban la expresión del gen con diferente efectividad (**Fig. R13A**). Las consecuencias del silenciamiento diferencial obtenido se pueden apreciar en los niveles de ACC (acetil-carboxilo-carboxilasa) fosforilada presentes. La reducción en los niveles de fosforilación de ACC, diana directa de AMPK, es consecuencia de la ausencia de señalización LKB1/AMPK. La correlación positiva mostrada entre el descenso en los niveles de activación de ACC y la efectividad mostrada por el silenciamiento demuestran la funcionalidad del sistema celular (**Fig. R13A**). El análisis de viabilidad celular corrobora que este parámetro no se encuentra bajo la regulación de LKB1 (**Fig. R13B**), coincidiendo con lo observado anteriormente en la línea DU145 (**Fig. R10**), sugiriendo que LKB1 no ejerce su acción antitumoral mediante la inhibición del crecimiento celular. Por otra parte, el análisis de la capacidad de formación de colonias en condiciones independiente de anclaje nos permitió concluir que en la línea celular PC3 esta capacidad tumoral no se encuentra regulada por LKB1. Observamos la ausencia de diferencias tanto en referencia al número de colonias formadas (**Fig. R13C**) como al tamaño de las mismas (**Fig. R13D**).

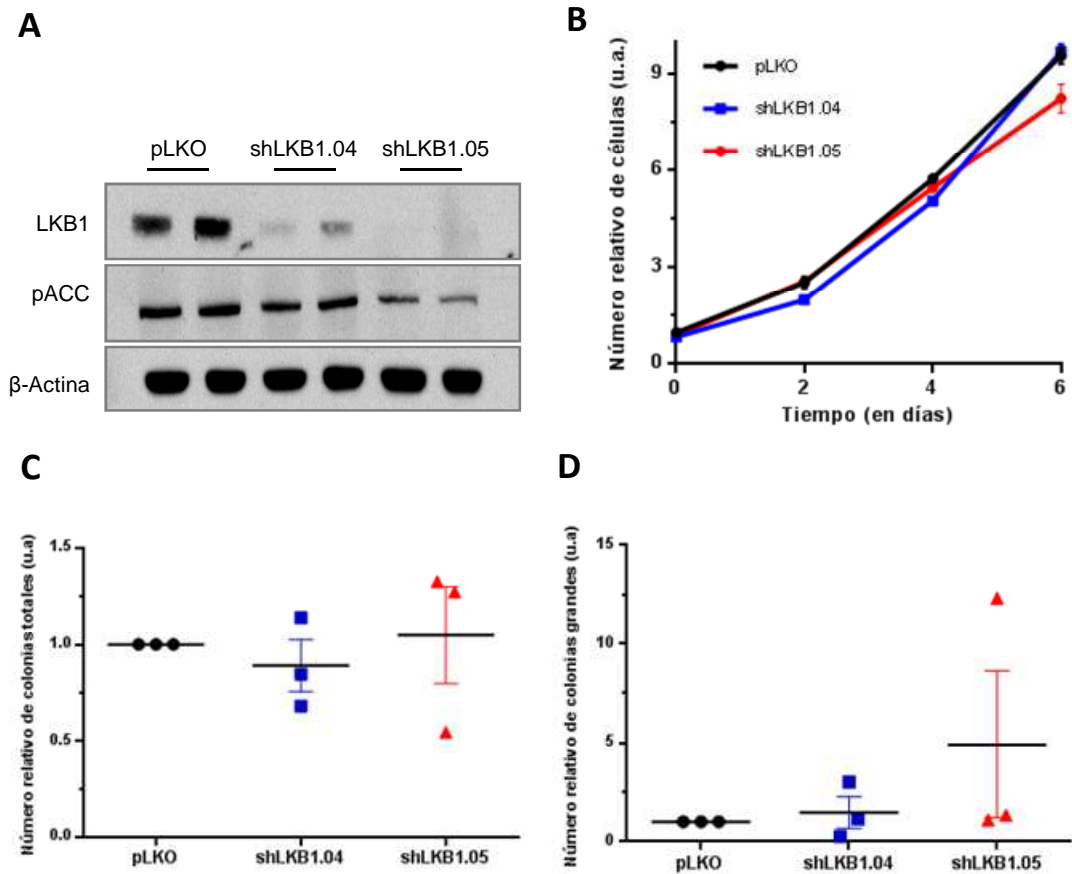
La caracterización de las líneas celulares de cáncer de próstata empleadas en la investigación oncológica en función de su potencial metastático, ha permitido identificar a la línea celular PC3 como altamente metastática, mientras que la línea celular DU145 muestra un potencial metastático moderado (*Webber et al., 1997*). Los resultados obtenidos por el silenciamiento de LKB1 en la línea celular PC3 nos llevan a plantear que es posible que el silenciamiento de un único gen supresor de tumores no altere el fenotipo de una línea celular tan agresiva como la empleada.

En referencia a la expresión de LKB1 cabe destacar que la línea celular PC3 presenta una disminución aproximada del 50% en comparación con la observada en células benignas (**Fig. R7**), es posible que tal disminución sea suficiente para estimular la formación de colonias en condiciones independientes de anclaje de forma irreversible. En este sentido, resultaría interesante analizar las consecuencias del silenciamiento de LKB1 sobre células que presenten niveles de expresión cercanos a las células benignas, proponiendo para ello la línea celular 22RV1.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Consecuencias del silenciamiento de LKB1 en la línea celular PC3

- Estudiar las consecuencias del silenciamiento genético de LKB1 en la línea celular 22RV1



**FIGURA R13. El silenciamiento de LKB1 no disminuye la densidad celular ni la clonogenicidad de la línea celular PC3**

Las células PC3 fueron transfectadas con shRNA *scramble* o con shRNA para LKB1, utilizándose 2 secuencias diferentes

**A.** Western blot mostrando el silenciamiento de LKB1 y la fosforilación de ACC en células PC3

**B.** Número relativo de células analizado por cristal violeta. Se muestra un experimento representativo y su desviación estándar (n=3)

**C. y D.** Cuantificación correspondiente al número total (**C**) y al número de colonias de tamaño grande (**D**) formadas tras crecer 10 días en agar blando (n=3). Se consideraron como grandes las colonias que al menos triplicaban el tamaño medio del resto

ACC: Acetil-CoA carboxilasa

### 1.3.2.3. Análisis del mecanismo de acción de LKB1 en la supresión del cáncer de próstata

En este capítulo analizaremos el perfil metabólico y transcripcional regulado en presencia de LKB1, con el fin de arrojar luz sobre el mecanismo de acción ejecutado por LKB1 en la supresión del cáncer de próstata.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

### 1.3.2.3.1. Caracterización del fenotipo metabólico regulado por LKB1

LKB1, a través de la señalización sobre AMPK controla la respuesta metabólica adaptativa ante los cambios en la disponibilidad de ATP (revisado en *Shackelford and Shaw, 2009*). Razonamos que la alteración del metabolismo energético y la oposición al efecto Warburg (*Hanahan and Weinberg, 2011*) podría ser potencialmente un mecanismo mediante el que LKB1 podría llevar a cabo las funciones observadas en la supresión tumoral.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Caracterizar el fenotipo metabólico

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1 KD

**Metodología:**

- Medida de la incorporación de glucosa: Cuantificación de los niveles de 2DG- $H^3$  intracelular
- Medida del lactato extracelular: Técnicas colorimétricas
- Estudio de la actividad metabólica en tiempo real: Análisis del flujo extracelular mediante el sistema *Seahorse*

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

Con el objetivo de estudiar si la presencia de LKB1 altera el metabolismo celular en cáncer de próstata, quisimos en primer lugar cuantificar la glucosa incorporada y el lactato producido, ya que la inhibición de la glicólisis (una de las actividades de LKB1 a través de AMPK) haría descender ambos parámetros. Para ello, caracterizamos las células en función de la incorporación relativa de 2-deoxi- $d$ - $[^3H]$ -glucosa y de la acidificación del medio extracelular, medida asociada al lactato producido. Observamos que la presencia de LKB1 no alteró ni la cantidad de glucosa incorporada ni el lactato producido (**Fig. R14A y B**), sugiriendo que el mecanismo de acción de LKB1 en cáncer de próstata no se ejerce a través de la regulación de la glicólisis.

A continuación nos propusimos investigar si LKB1 regula el metabolismo oxidativo y para ello se cuantificó el oxígeno consumido en tiempo real utilizando el sistema *Seahorse XF24* (*Seahorse Bioscience*). El analizador del flujo extracelular *XF24* mide la actividad metabólica de las células vivas monitorizando simultáneamente el consumo de oxígeno (medida de la respiración mitocondrial) y la acidificación del medio extracelular (medida de la glicólisis). Mediante esta técnica estudiamos la respuesta frente a la inyección sucesiva de compuestos que alteran la cadena de transporte de electrones y por tanto el perfil de consumo de oxígeno. Decidimos seguir el protocolo establecido anteriormente (*Nicholls et al., 2010*), mediante el que se describe cómo el análisis del perfil de consumo de oxígeno (tras la adición sucesiva de oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A) permite estudiar diferentes parámetros

implicados en la respiración celular. La siguiente figura muestra el perfil de consumo de oxígeno obtenido en un experimento representativo (**Fig. R14C**). La respiración basal es la medida del consumo de oxígeno detectada previamente a la inyección de los compuestos. El tratamiento con oligomicina nos permite cuantificar la cantidad de oxígeno consumido en la producción de ATP, reflejado en el descenso resultante tras su inyección. Observamos la ausencia de diferencias significativas en el porcentaje de oxígeno consumido para la producción de ATP en función de la presencia de LKB1 (**Fig. R14D**). La sucesiva adición de FCCP disipa el gradiente de protones y permite así que la cadena de transporte de electrones y el consumo de oxígeno operen a su máxima capacidad lo que obliga a la célula a respirar bajo su máximo potencial. En este caso observamos que el consumo de oxígeno no supera el consumo basal, lo que sugiere que la línea DU145 está funcionando a su máxima capacidad, lo que le imposibilita aumentar el transporte de electrones y el consumo de oxígeno tras la adición de oligomicina y/o FCCP. La incapacidad de la línea DU145 de responder frente a la adición de FCCP mediante la activación de la capacidad respiratoria máxima podría indicar una hipersensibilidad ante los antitumorales que ejercen su acción a través de la mitocondria. Rotenona y antimicina A inhiben los complejos mitocondriales I y III respectivamente, lo que permite medir el oxígeno invertido en el mantenimiento del gradiente de protones y la tasa de respiración no mitocondrial. Tampoco se observan diferencias tras la adición de Rotenona y antimicina A. Estos parámetros reflejan el estado oxidativo de la célula y su análisis estadístico nos permite concluir que la presencia de LKB1 no altera el metabolismo oxidativo.

El sistema Seahorse cuantifica además el ECAR (del inglés, “*Extracellular Acidification Rate*”), tras la inyección de los compuestos metabólicos mencionados. Tampoco fueron detectadas diferencias en la acidificación del medio extracelular (datos no mostrados).

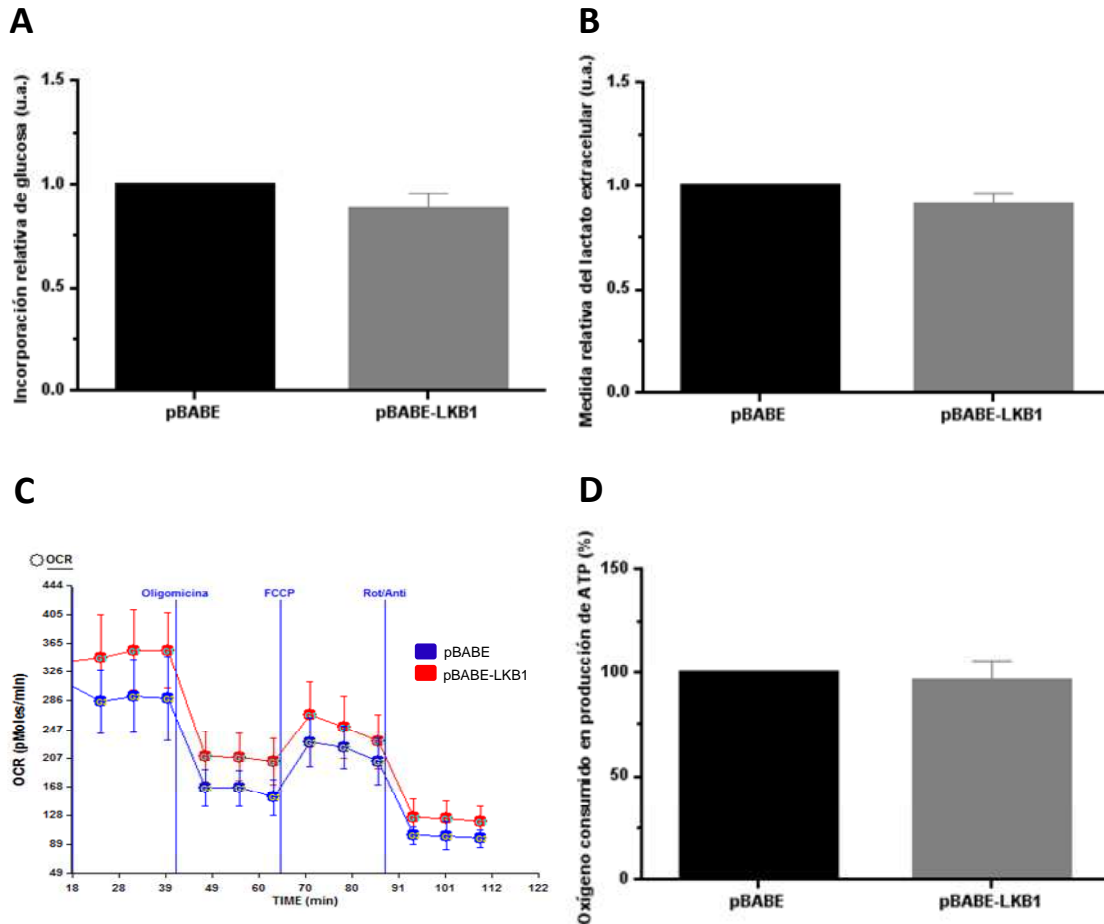
Los resultados obtenidos parecen indicar que el mecanismo mediante el que LKB1 inhibe la progresión tumoral no actúa a través de la regulación del metabolismo energético.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

#### Estudio del fenotipo metabólico

- Analizar las consecuencias de la inyección de otros compuestos potenciadores del estrés energético: Fenformina
- Estudiar la respuesta metabólica ante situaciones de estrés: estrés energético y estrés inducido por ausencia de anclaje a la matriz extracelular.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1



**FIGURA R14.** La presencia de LKB1 no altera el metabolismo basal en la línea celular DU145

**A.** La incorporación de 2 desoxi-D-glucosa marcada con  $^3\text{H}$  se midió mediante un contador de centelleo. Los resultados se muestran en nmoles de glucosa por mg de proteína por minuto (n=7)

**B.** Medida la concentración del lactato extracelular al cabo de 24 horas de la siembra (n=7)

**C.** Gráfico correspondiente a un experimento representativo realizado con el sistema *Seahorse*. Se representa el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo así como la desviación estándar

**D.** Porcentaje de oxígeno destinado a la producción de ATP. Las medidas se realizaron utilizando el método de análisis *Seahorse* (n=3)

$^3\text{H}$ : Tritio. OCR: Ratio de consumo de oxígeno. FCCP: carbonilcianuro 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona. Rot/Anti: Rotenona/Antimicina A

Con el objetivo de identificar los genes implicados en el mecanismo de acción en estudio nuestra siguiente estrategia consistió en analizar el perfil de expresión transcripcional regulado por LKB1.

### 1.3.2.3.2. Caracterización del perfil de expresión génica regulado por LKB1

La introducción de la tecnología de los microarrays de RNA ha hecho posible el análisis de la expresión de miles de genes de forma simultánea (*Hansen and Eyster,*



2010). Con el objetivo de estudiar el mecanismo de acción de LKB1 e identificar genes implicados, nos propusimos analizar mediante esta técnica el perfil de expresión transcripcional regulado por LKB1. La identificación de genes diferencialmente expresados entre poblaciones nos permitió seleccionar genes candidatos a mediar el mecanismo objeto de estudio. También empleamos diversas bases de datos públicas sobre las que llevamos a cabo análisis de enriquecimiento.

Previo a su inclusión en el análisis se verificó la calidad del RNA, incluyendo en el estudio de expresión únicamente aquellas muestras que alcanzaban un RIN (del inglés “*RNA Integrity Number*”) mínimo de 8. Tras la retrotranscripción, amplificación y marcaje con biotina el RNA fue cuantificado para finalmente hibridarse con el chip HT-12v4 de *Illumina*. Este microarray de expresión de genoma humano completo da cobertura transcripcional a genes bien caracterizados, genes candidatos, transcritos y variantes de *splicing*, conteniendo más de 47.000 sondas.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Caracterizar el perfil de expresión génica regulado por LKB1

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1

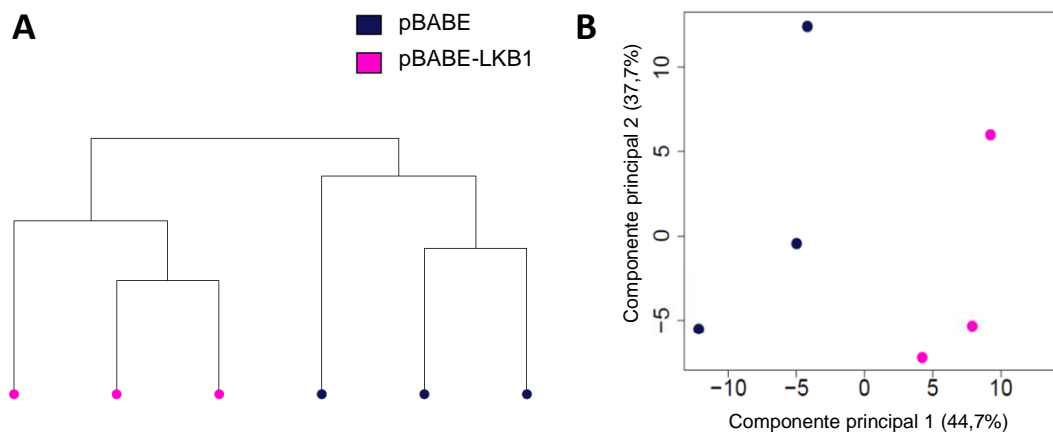
**Metodología:** Microarray de expresión del genoma completo según tecnología de *Illumina*. Validación de los resultados mediante qRT-PCR

**Test estadístico:**

- Análisis de agrupación muestral: Algoritmo Pearson
- Análisis de expresión diferencial: Estadístico empírico t de Bayes moderado
- Análisis de enriquecimiento funcional: Test hipergeométrico
- Análisis de expresión por qRT-PCR: T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución.

Previo al análisis, se corrigieron los valores derivados del microarray, se eliminó el ruido de fondo, se transformaron los valores de la expresión a logaritmo 2 y se normalizaron en base a los cuartiles. Estos datos se emplearon, en primer lugar, para estudiar el perfil genético obtenido mediante la aplicación de la metodología de análisis no supervisada, agrupando de esta manera las muestras que comparten un gran porcentaje de su perfil de expresión. Los análisis realizados, tanto el de agrupamiento jerárquico como el de componentes principales, coinciden en la asociación de los perfiles obtenidos en dos grupos, constituidos por las células deficientes y competentes para LKB1 (**Fig. R15**). De esta manera verificamos tanto la validez del sistema celular empleado, como la existencia de un determinado perfil genético regulado en presencia de LKB1.

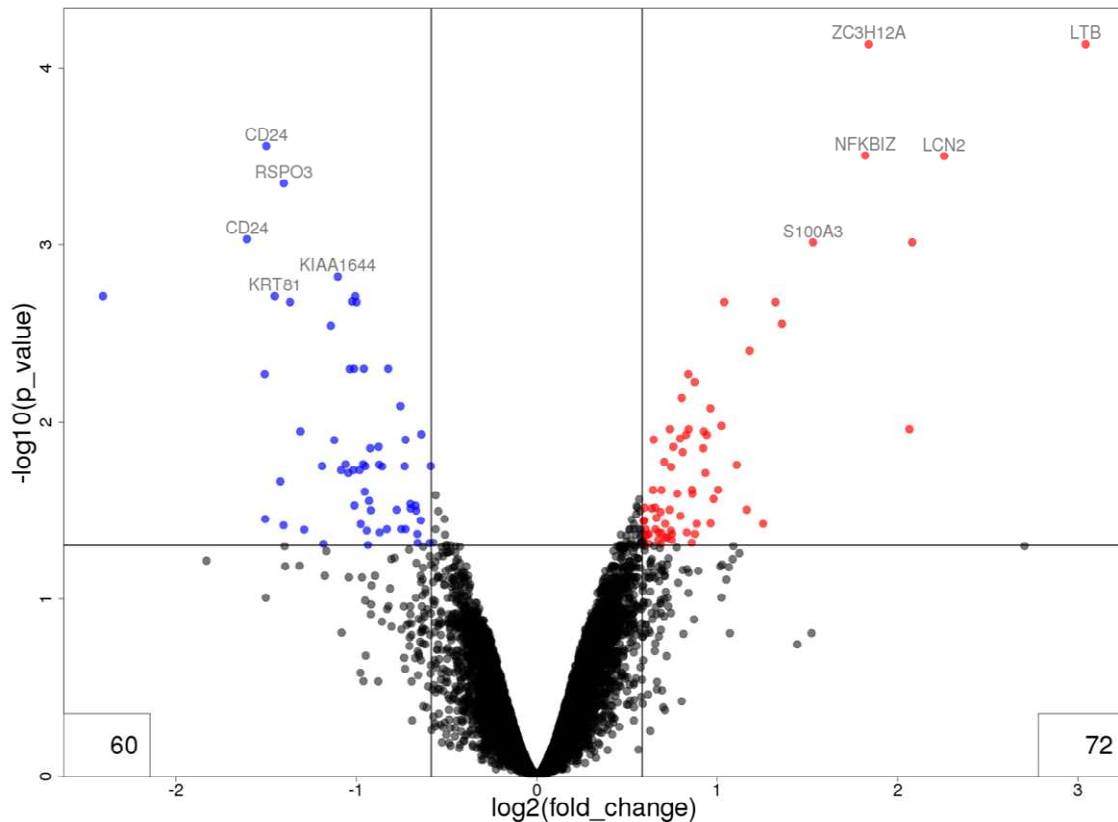
## Resultados y Discusión- Objetivo 1



**FIGURA R15.** El análisis estadístico no supervisado de los datos derivados del microarray revela la existencia de un perfil de expresión regulado por la presencia de LKB1

**A y B.** Representación gráfica del análisis de agrupación jerárquica (**A**) y del análisis de componentes principales (**B**).

El siguiente paso consistió en llevar a cabo el estudio de expresión diferencial entre ambas condiciones. El análisis comparativo de los perfiles reveló la existencia de un total de 132 genes diferencialmente expresados en presencia de LKB1, cuantificándose 72 genes incrementados y 60 disminuidos (**Fig. R16**). Los resultados obtenidos se muestran mediante la representación gráfica denominada Volcano. En el eje X se representa la corrección a logaritmo 2 de las veces que cambia la expresión (umbral establecido en  $\pm 1,5$  veces), mientras que en el eje Y se representa el potencial estadístico que presenta el cambio (umbral establecido en valor de  $p$  ajustado  $< 0,05$ ). Puntualizaremos que los valores correspondientes al eje X se determinan gen a gen mediante el cálculo de la diferencia matemática existente en los niveles de expresión detectados entre células deficientes y competentes para LKB1. De esta manera los genes regulados de forma negativa (reprimidos) por LKB1 se situarán entre los valores negativos (en azul en la representación gráfica) mientras que los genes regulados positivamente (activados) resultan en valores positivos (marcados en rojo). El gráfico indica además los nombres de los genes que presentan una mayor probabilidad de encontrarse bajo el control de LKB1 (**Fig. R16**).



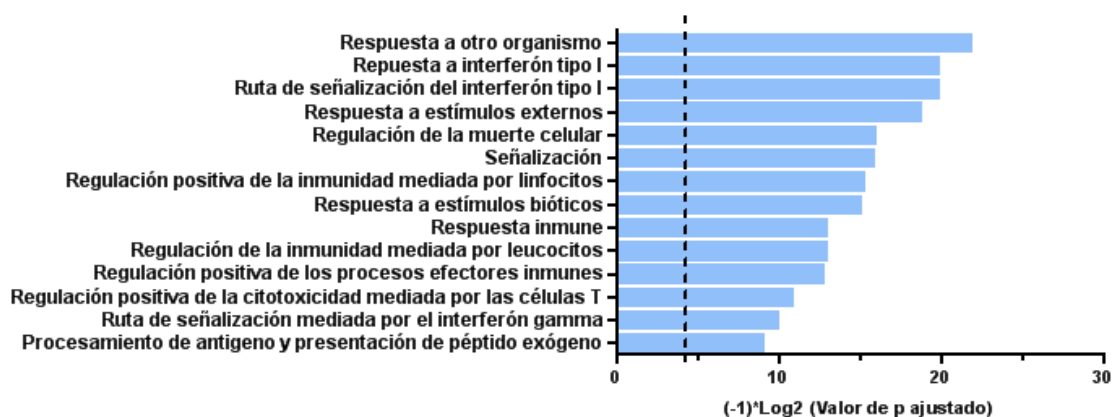
**FIGURA R16. El análisis mediante microarray de RNA de la diferencias en la expresión genética entre el grupo pBABE-LKB1 y el pBABE resulta en un total de 132 genes diferencialmente expresados**

Gráfico Volcano en el que se muestran los genes que se expresan de manera diferencial en el grupo pBABE-LKB1 con respecto al grupo pBABE. Los genes expresados diferencialmente a la baja se representan en azul y los expresados diferencialmente al alza se representan en rojo. Umbrales considerados:  $-1,5 > \text{veces que cambia la expresión} > +1,5$ ; valor de p ajustado  $< 0,05$

A partir de estos datos, quisimos explorar la posibilidad de que el perfil de expresión génica revelado en presencia de LKB1 pudiera traducirse en la alteración de un conjunto de funciones biológicas potencialmente responsables de su acción como supresor de tumores en el tejido prostático. Para ello llevamos a cabo diversos análisis de enriquecimiento. En primer lugar, en términos de ontología génica, utilizando la aplicación de Bioconductor “*GOstats*” la cual ejecuta análisis funcionales. El proyecto Ontología Génica (GO, del inglés “*Gene Ontology*”) es una iniciativa centrada en unificar las descripciones de los productos génicos que gestiona una de las bases de datos más relevantes para la clasificación y asignación de funciones génicas y proteicas. El proyecto GO se ha estructurado en 3 categorías a través de las cuales se describen transcritos en base a términos asociados con cada una de las ontologías establecidas. Para determinar grupos de genes cuya expresión se encuentra regulada por LKB1 se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento en función de cada una de las ontologías descritas: procesos biológicos (GOBP), funciones moleculares (GOMF) y componentes celulares (GOCC). El análisis realizado en función de los procesos biológicos reveló que la presencia de LKB1 se refleja en el enriquecimiento en grupos de genes

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

relacionados con procesos integrantes de la respuesta inmune, destacando los mediadores de la respuesta a interferón (Fig. R17).



**FIGURA R17. La presencia de LKB1 altera procesos biológicos integrantes de la respuesta inmune**

Procesos biológicos incluidos en la base de datos GOBP alterados en presencia de LKB1. La línea punteada indica el valor  $(-1)*\text{Log}_2(0,05)$ .

Con el objetivo de ampliar el número de análisis de enriquecimiento y confirmar los resultados obtenidos, quisimos contrastar nuestros resultados con otra serie de bases de datos verificadas. Empleamos para ello la herramienta pública facilitada por el Broad Institute, “*The Molecular Signature Database*” (MsigDB) la cual contiene diferentes colecciones de grupos de genes anotados (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp#C2>). Mediante esta estrategia aumentamos la robustez de las conclusiones derivadas, ya que nos permite integrar en nuestro estudio los conocimientos generados acerca de las rutas biológicas incluidas en cada base de datos.

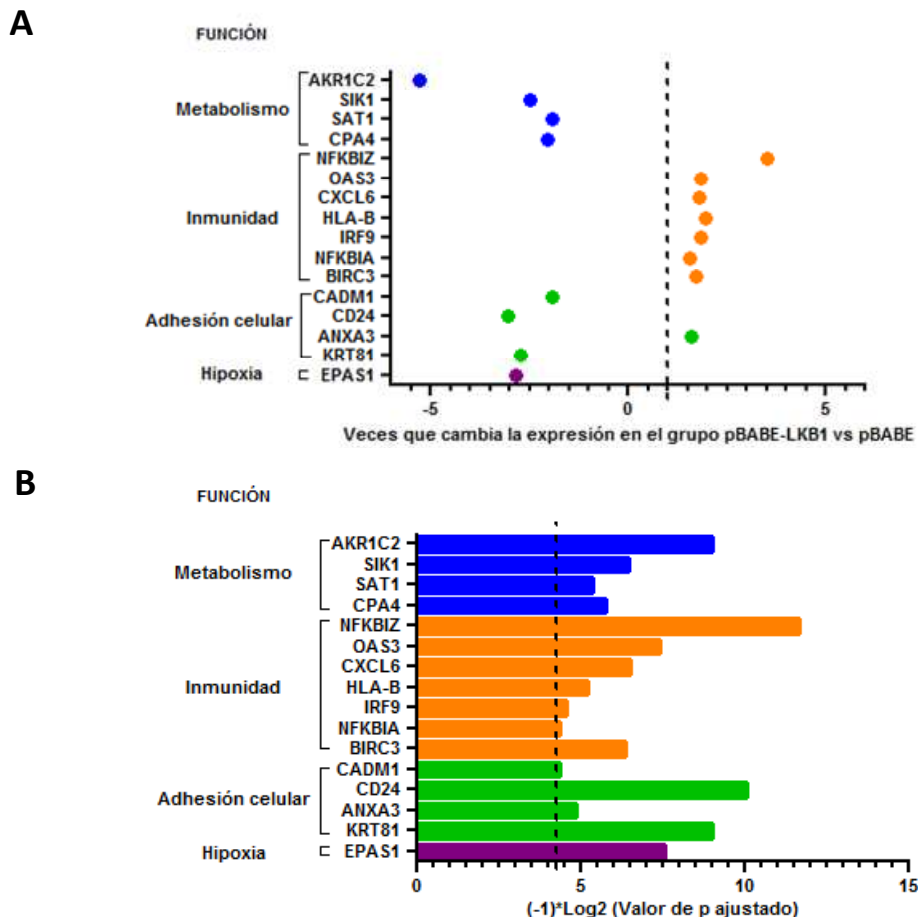
Los análisis de enriquecimiento llevados a cabo sobre las bases de datos *KEGG*, *Reactome*, *Oncogenic Signatures*, *CMAP*, *HICP* y *BioCarta*, también mostraron en repetidas ocasiones la presencia mayoritaria de grupos de genes implicados en la respuesta inmune y/o en la inflamatoria (datos no mostrados). En resumen, los análisis de enriquecimiento génico realizados coinciden al mostrar que la presencia de LKB1 potencia la exhibición de un perfil de expresión en el que se encuentran incrementados grupos de genes que participan en la regulación de la respuesta inmune. El enriquecimiento es especialmente notorio en genes que intervienen en la ruta del interferón y en genes que responden al factor de transcripción NFκB. Estos resultados confirman los obtenidos previamente tras el análisis del perfil genético de adenocarcinomas de pulmón murinos deficientes para LKB1, llevado a cabo mediante la tecnología de microarray de *Affymetrix*. Los autores de este estudio apuntan hacia la potencial la regulación que LKB1 puede ejercer sobre la expresión genes relacionados respuesta inmune (*Ji et al., 2007*). Los resultados derivados de los análisis de enriquecimiento, así como la concurrencia con lo observado en la progresión tumoral de

otros tejidos, sugieren que el mecanismo supresión tumoral de LKB1 pueda deberse parcialmente a la activación de la respuesta inmune, cuestión que desarrollaremos en el siguiente capítulo.

Por otra parte, los análisis de enriquecimiento ponen de manifiesto la ausencia de grupos de genes relevantes en el desarrollo de características metastáticas, tal como sería de esperar tras el análisis de los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta observación apunta hacia la posibilidad de que los efectos que se observan en presencia/ausencia de LKB1 relativos al potencial metastático puedan ser debidos a la regulación ejercida sobre genes discretos y no sobre grupos de genes, sugiriendo que el mecanismo de acción actúa a través de vías muy concretas y no mediante la alteración masiva del perfil de expresión. En base a este razonamiento seleccionaremos también un gen regulado por la presencia de LKB1 cuyas funciones pudieran explicar las diferencias observadas en las capacidades metastáticas. A través del estudio de este gen candidato trataremos de esclarecer el potencial mecanismo de acción mediante el que LKB1 podría regular la progresión tumoral.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos mediante la tecnología del microarray quisimos emplear una técnica alternativa, tal como dictan las directrices acordadas por la comunidad científica, empleando para ello la tecnología de la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Para ello, basándonos en los resultados obtenidos a partir de los análisis de expresión diferencial y de enriquecimiento funcional realizamos una selección de 16 genes cuya expresión se encuentra potencialmente regulada por LKB1. La selección de estos genes se realizó considerando el grado de alteración observado y el potencial estadístico asociado, incluyendo únicamente genes que muestran un cambio absoluto mayor que 1,5 veces y un potencial estadístico menor que 0,05. Otro criterio de selección fue la función biológica descrita para el gen, incluyendo únicamente funciones biológicas que potencialmente podrían intervenir en el mecanismo antitumoral de estudio. LKB1 actúa en la regulación del metabolismo (Alessi *et al.*, 2006), por lo que para la validación quisimos considerar un grupo de genes que participan en esta función. Considerando los resultados de los análisis de enriquecimiento, decidimos añadir también un grupo de genes responsables de la respuesta inmune. Por otra parte, los resultados obtenidos del modelo murino *Pten<sup>pc+/-</sup> Lkb1<sup>pc-/-</sup>* muestran la implicación de LKB1 en la regulación de la metástasis, lo que nos llevó a incluir una serie de genes partícipes de este proceso. Por último, incluimos el gen EPAS1 (también denominado HIF2 $\alpha$ ) por su intervención en la regulación de la hipoxia, estímulo habitual en el entorno tumoral (Vaupel and Harrison, 2004). Se muestran a continuación los resultados obtenidos mediante la tecnología del microarray de expresión en referencia a la selección de genes realizada. Los gráficos muestran la representación del número de veces que cambia la expresión (**Fig. R18A**) y el potencial estadístico que presenta el cambio (**Fig. R18B**) respectivamente.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1



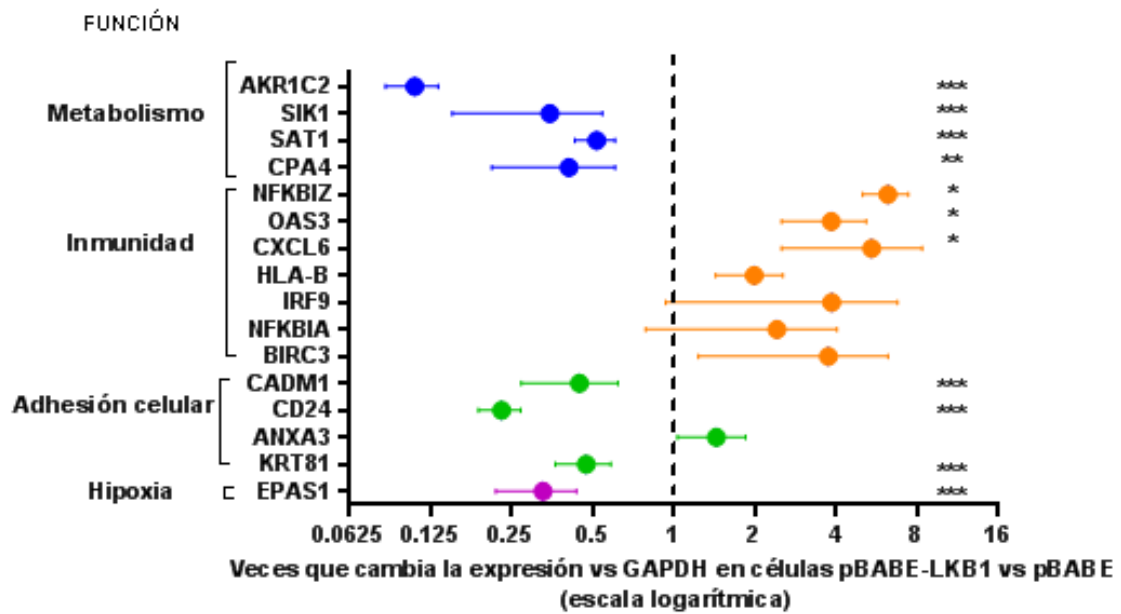
### FIGURA R18. Selección de genes del microarray de RNA

Teniendo en cuenta el valor de  $p$  observado y la función que desarrollan se escogieron 16 genes que en el análisis de expresión génica se mostraban diferencialmente expresados en el grupo pBABA-LKB1 frente al grupo pBABA. Se muestran los valores observados en el array para los genes seleccionados.

**A.** Veces que cambia la expresión en el grupo pBABA-LKB1 frente al grupo pBABA. La línea punteada indica el valor 1.

**B.** Valor de  $p$  ajustado. Representado como logaritmo en base 2 por (-1). La línea punteada indica el valor  $(-1)*\text{Log}_2(0,05)$ .

La coincidencia observada tras el análisis comparativo realizado entre los valores de expresión derivados del microarray y del análisis mediante qRT-PCR, nos permite confirmar la validez de la tecnología de microarray empleada (**Figs. R18 y R19**). Observamos que mediante la técnica de la qRT-PCR 11 de los 16 genes seleccionados presentan el suficiente potencial estadístico para su validación directa. En cuanto a los 5 restantes, pese a no quedar validados estadísticamente, podemos decir que se observa la misma tendencia de expresión mediante ambas técnicas, lo que nos hace suponer que en caso de haber aumentado el valor muestral de los análisis de expresión realizados por qRT-PCR podríamos haber llegado a lograr la significatividad estadística también en estos genes (**Fig. R19**).



**FIGURA R19. Las diferencias observadas en el microarray de expresión se confirman mediante qRT-PCR**

Los genes seleccionados se validaron en células pBABE y pBABE-LKB1 mediante qRT-PCR. Se muestra el número de veces que cambia la expresión en escala logarítmica (n=3).

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

El análisis de los datos obtenidos mediante la tecnología del microarray nos permitió dirigir la investigación del mecanismo de supresión tumoral ejercido por LKB1 en dos direcciones diferentes. Por una parte, quisimos validar a nivel funcional los resultados obtenidos del análisis de enriquecimiento génico, basándonos en la convergencia que pone de manifiesto la potencial regulación ejercida por LKB1 sobre la expresión de genes que intervienen en la respuesta inmune. Para ello investigaremos el grado de activación de la vía del interferón y de NFκB en función de la presencia de LKB1. Por otra parte, de entre la lista de genes elaborada (Figs. R18 y R19), seleccionamos un candidato para mediante su estudio tratar de explicar el potencial mecanismo de acción de LKB1 en la supresión tumoral en el tejido prostático. El candidato fue de entre los genes cuyas funciones permitan explicar el fenotipo observado el que muestre la mayor alteración en la expresión.

### 1.3.2.3.2.1. Validación funcional del cambio de expresión observado en genes implicados en la respuesta inmune

Tal como hemos mencionado, los resultados obtenidos coinciden con los aportados por otros grupos relativos a lo observado en la progresión maligna del tejido pulmonar (Ji et al., 2007). Ambos estudios revelan la expresión diferencial de grupos de genes implicados en la respuesta inmune en función de la presencia/ausencia de LKB1. Estas observaciones sugieren la posibilidad de que parte del mecanismo mediante el que LKB1 actúa sobre la supresión tumoral sea debido a la regulación de

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

otra característica oncogénica descrita por Hanahan y Weinberg y no considerada *a priori* en nuestro estudio, la capacidad de evadir la destrucción inmunitaria mediante la activación del sistema inmune (Hanahan and Weinberg, 2011). En base a ello, nos propusimos validar que la alteración observada tras el estudio de expresión génica tuviera el esperado reflejo funcional sobre las correspondientes rutas biológicas.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Validar a nivel funcional del cambio de expresión de genes implicados en la respuesta inmune

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1

**Metodología:**

- Análisis de enriquecimiento en función de factores de transcripción
- Análisis de localización de proteínas mediante inmunofluorescencia

**Test estadístico:**

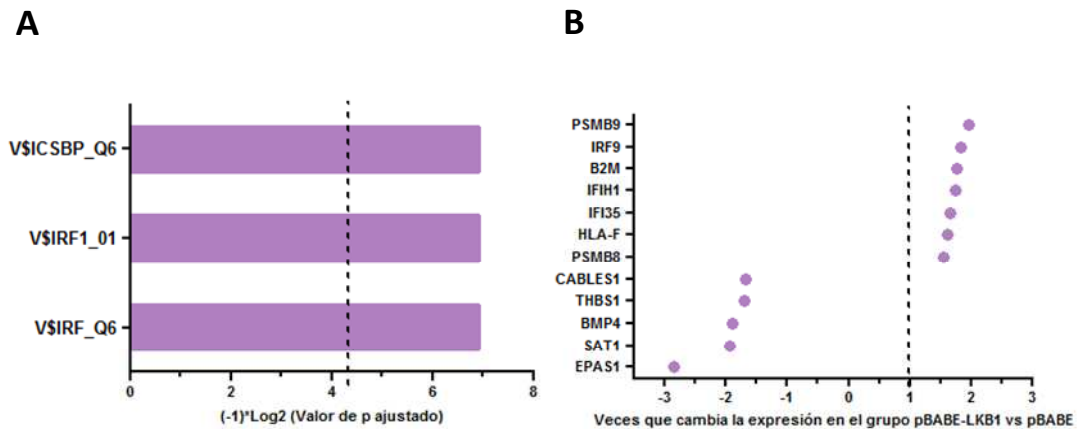
- Análisis enriquecimiento: Test hipergeométrico
- Análisis de localización de proteínas: T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

Con el objetivo de comprobar la funcionalidad de nuestros resultados volvimos a recurrir a los análisis de enriquecimiento realizados mediante la información disponible en la base de datos MsigDB. En este análisis se consideraron las regiones promotoras asociadas a los genes diferencialmente expresados. Los grupos de genes enriquecidos se seleccionaron en función de la presencia de una secuencia de unión a un factor de transcripción definido en la base de datos TRANSFAC (<http://www.biobase-international.com/gene-regulation>)

La clasificación de las regiones promotoras prevalentes en función de los factores de transcripción que se unen a ellas, reveló que los genes potencialmente regulados por LKB1 presentan en estas regiones el enriquecimiento de elementos de respuesta relacionados con la ruta del interferón, mostrando significatividad para los factores de transcripción regulados por interferón 1 y 8 (IRF1 e IRF 8) (**Fig. R20A**).

Esta observación nos hizo retomar los resultados derivados del microarray y analizar sobre ellos el nivel de expresión de estos genes. La siguiente figura muestra la representación gráfica de estos resultados, cuyo análisis sugiere que LKB1 podría regular la expresión de genes que en sus regiones reguladoras presentan secuencias de respuesta a los factores de transcripción regulados por interferón (**Fig. R20B**).





**FIGURA R20. La presencia de LKB1 altera la expresión de genes relacionados con la ruta del interferón**

**A.** Representación gráfica de los grupos de genes enriquecidos en función de la presencia de una secuencia de unión a un factor de transcripción definido en la base de datos TRANSFAC. La línea punteada indica el valor  $(-1) \cdot \text{Log}_2(0,05)$ .

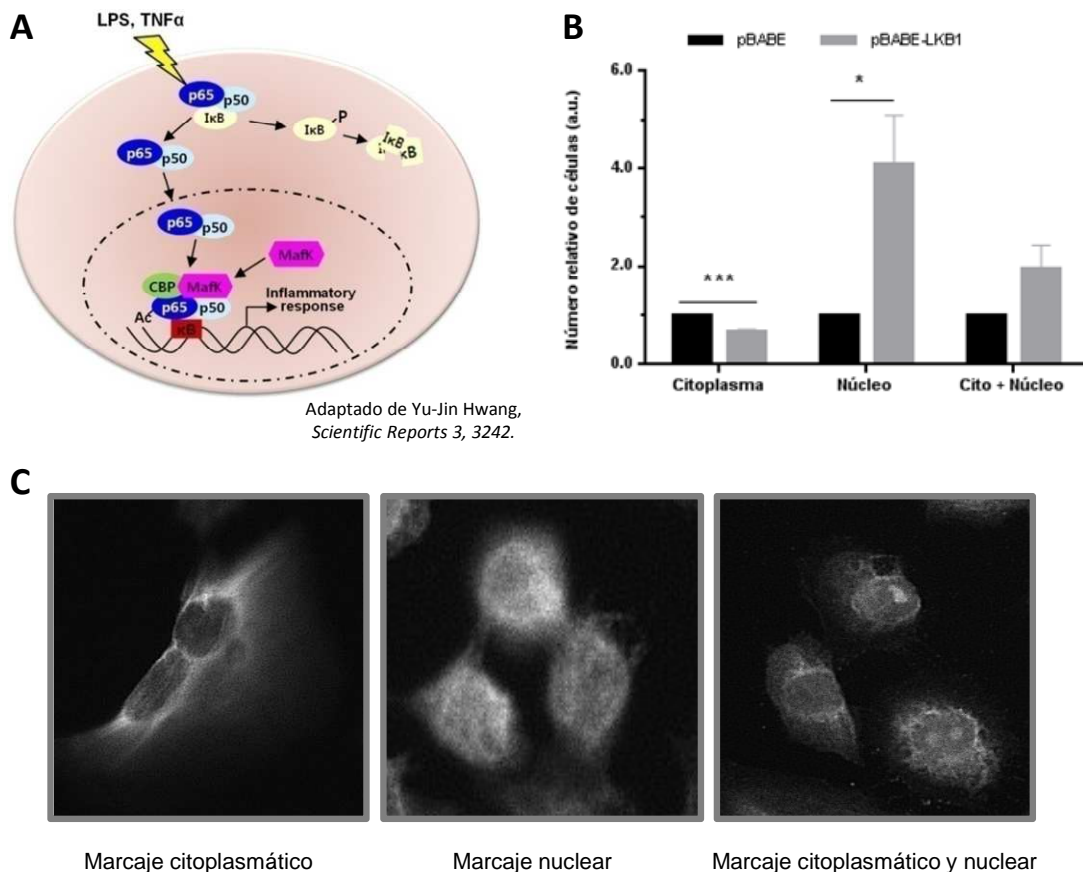
**B.** Representación de las veces que cambian los genes en cuya región promotora se encuentran las secuencias enriquecidas en presencia de LKB1. La línea punteada indica el valor 1.

Los análisis de enriquecimiento llevados a cabo sobre algunas de las bases de datos incluidas en la herramienta MsigDB (*Biocarta*, *cMap* y *Oncogenic Signatures*) mostraron la repetición del término “*hinata\_nfkb\_immu\_inf*”. Esta nomenclatura agrupa una selección de genes inducidos por NFκB (del inglés, “*Nuclear Factor kappa B*”), factor de transcripción regulado durante la respuesta inmune y en procesos inflamatorios (datos no mostrados). Por otra parte la presencia de LKB1 aumenta la expresión en grupos de genes relacionados con la vía del interferón, especialmente con la del interferón tipo I (**Fig. R17**). Los interferones tipo I (IFNs) juegan un papel crítico en la defensa del huésped mediante la modulación de la expresión de genes a través de la activación de transductores de señal y factores de transcripción NFκB (*Yang et al., 2005*). La activación del factor de transcripción NFκB permite a las células desarrollar las respuestas inmunes innata y adquirida contra microorganismos patógenos (*Romano et al., 2004*) (*Blum et al., 2007*) (*Bai et al., 2011*). NFκB también está involucrado en el desarrollo, la proliferación celular, la apoptosis, la señalización del daño, la transmisión sináptica, la plasticidad neuronal y en enfermedades neurodegenerativas (*Walsby et al., 2010*). El complejo NFκB se encuentra inactivo en el citoplasma asociado con su inhibidor IκB. Cuando un estímulo induce la fosforilación de IκB este se degrada por el proteasoma, dejando expuestos los motivos NLS (del inglés, “*Nuclear Localization Signal*”) de NFκB, que se transloca al núcleo para unirse a secuencias consenso κB presentes en el DNA e iniciar la transcripción con la ayuda de coactivadores como CBP/p300 (*Hwang et al., 2013*) (**Fig. R21A**). La actividad de NFκB da como resultado la transcripción de genes que codifican citoquinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, inmunoreceptores, otros factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, proteínas virales y reguladores de la apoptosis (revisado en *Pahl, 1999*). La proteína NFκB incluye cinco monómeros estructuralmente relacionados. Todos comparten el dominio de homología Rel, que les permite su dimerización y la

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

translocación al núcleo (*El-Hage et al., 2008*). El término NFκB habitualmente se refiere al heterodímero de p65/RelA y p50 como el dímero más prevalente localizado en células (*El-Hage et al., 2008*). La activación de la vía se ha asociado con la localización intracelular del complejo NFκB, por lo que la detección inmunocitoquímica se utiliza comúnmente como parámetro de estimación del grado de activación (*Maguire et al., 2011*).

Con el objetivo de confirmar que el cambio observado en la expresión génica y en los análisis de enriquecimiento está asociado a una alteración en la actividad de NFκB, cuantificamos los niveles de p65 nucleares. Observamos que las células pBABE-LKB1 el nivel de p65 nuclear era significativamente mayor en detrimento del citoplasmático, lo cual indica que la vía NFκB muestra un mayor grado de activación en presencia de LKB1 (**Fig. R21B**). Presentamos también imágenes representativas de las localizaciones celulares observadas (**Fig. R21C**).



**FIGURA R21. La expresión de LKB1 en la línea celular DU145 hace aumentar el nivel de p65 nuclear**

**A.** Esquema mostrando la translocación al núcleo de p65 tras la activación de la ruta NF-κB.

**B.** Contaje del número de células en las cuales p65 se localiza en el compartimento celular indicado (n=3).

**C.** Micrografías representativas de la localización de p65 en los compartimentos celulares indicados. Imágenes adquiridas a 100X..

\* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001

Hemos confirmado que el cambio de expresión en genes involucrados en la respuesta inmune es indicativo de una respuesta biológica, la activación de la ruta NFκB. Sería interesante comprobar el significado biológico de la activación de estas rutas de señalización. Hanahan y Weinberg, en su revisión del 2011, presentan una potencial característica tumoral que consideran emergente ya que aún no se ha establecido cómo una regla generalizada incluida a lo largo de la transformación tumoral, la evasión de la respuesta inmune (*Hanahan and Weinberg, 2011*). El papel de la respuesta inmune en la oncogénesis es controvertido. Se ha descrito que virtualmente todas las lesiones neoplásicas presentan infiltraciones de células del sistema inmune, tanto de la inmunidad innata como de la adquirida y por lo tanto mimetizan las condiciones inflamatorias descritas en los tejidos no neoplásicos (*Dvorak, 1986*) (*Pagès et al., 2010*). La inflamación puede contribuir a múltiples características capacitadoras de la progresión tumoral mediante el aprovisionamiento de moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento que mantienen la señal proliferativa y limitan la muerte celular, factores pro-angiogénicos, enzimas modificadoras de la matriz extracelular y señales que activan la transición epitelio-mesénquima (EMT), facilitando de esta manera la angiogénesis, la invasión y la metástasis (*Hanahan and Weinberg, 2011*). Esta observación, paradójicamente, se opone a la bien aceptada teoría de la vigilancia tumoral inmunológica que propone que las células y tejidos están constantemente monitorizados mediante el sistema inmune. Esta vigilancia inmunológica es la responsable de reconocer y eliminar la mayoría de las incipientes células tumorales y por lo tanto de los tumores en sus orígenes. Estudios en modelos experimentales murinos revelan que los ratones inmunodeprimidos son más susceptibles a desarrollar tumores, demostrando que la activación de la respuesta inmune, tanto la innata como la adaptativa, contribuyen a la vigilancia inmunológica y por lo tanto a la erradicación del tumor (*Teng et al., 2008*) (*Kim et al., 2007*). Hanahan y Weinberg sugieren la respuesta a esta paradoja proponiendo que los tumores sólidos que llegan a desarrollarse han evitado la detección por parte del sistema inmune o han sido capaces de limitar su poder destructor, llegando a evadir la erradicación. Según esta teoría, las células en transformación maligna, han adquirido la capacidad de evadir la respuesta inmune, también denominada inmuno-evasión, como una emergente característica tumoral que les permitirá beneficiarse de la contribución de la respuesta inflamatoria en la adquisición de otras de capacidades oncogénicas permitiendo así la progresión del tumor. Sería interesante estudiar el potencial papel de LKB1 en este contexto. En línea con este razonamiento, se ha observado que la delección genética de IKKα, integrante del complejo inhibidor IκB, en modelos murinos da lugar al desarrollo de cáncer de pulmón de células escamosas (*Xiao et al., 2013*). El mecanismo descrito se basa en el aumento de la señalización de la vía NFκB y en una consecuente pérdida de expresión de *Lkb1*. Estos resultados indican que la señalización de la vía NFκB puede ser oncogénica y plantean que la expresión de LKB1 puede ser regulada mediante la activación de NFκB. Lo cual, junto con los resultados obtenidos en la presente tesis, apuntan a una regulación bidireccional LKB1-NFκB.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

Por otra parte, los pacientes afectados de PJS presentan defectos en la señalización de TGF $\beta$ , poniendo de relevancia el control ejercido por LKB1 en la regulación de este factor de crecimiento (Katajisto et al., 2008). Además, estudios derivados de modelos murinos condicionales han revelado que la delección condicional de *Lkb1* en el endotelio anula la secreción de *Tgfb* (Londesborough et al., 2008). TGF $\beta$  se ha descrito como una inmunocitoquina supresiva que promueve la progresión tumoral (Flavell et al., 2010), habiéndose puesto de manifiesto la comunicación funcional establecida entre NF $\kappa$ B y TGF $\beta$  en el cáncer de diversos tejidos (Freudlsperger et al., 2013) (Azuma et al., 1999) (Sovak et al., 1999). Modelos murinos condicionales de pulmón LKB1-PTEN *knockouts* desarrollan cáncer de células escamosas con características de supresión inmune, una de las cuales es la alteración de TGF $\beta$  (Xu et al., 2014). Sería interesante analizar si la presencia de LKB1 altera la señalización de TGF- $\beta$  en nuestro sistema celular. También sería de interés analizar la potencial alteración de la vía NF $\kappa$ B y de TGF $\beta$  en nuestros modelos murinos (*Pten*<sup>pc+/-</sup> *Lkb1*<sup>pc+/-</sup> y *Pten*<sup>pc+/-</sup> *Lkb1*<sup>pc-/-</sup>), y en ese caso, confirmar el significado biológico de la alteración. Para ello, proponemos determinar las poblaciones de células inmunes predominantes con el objetivo de caracterizar si la pérdida de LKB1 puede inducir un estado de supresión inmune que permita la progresión tumoral. Se ha observado que la pérdida de LKB1 en cáncer endometrial da lugar al reclutamiento de macrófagos con actividades promotoras de tumores (Peña et al., 2015). Estas observaciones nos llevan a pensar que la regulación de la respuesta inmune puede ser un mecanismo relevante en la supresión tumoral ejecutada por LKB1.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Validación funcional del cambio de expresión de genes implicados en la respuesta inmune

- Usar inhibidores de NF $\kappa$ B y comprobar si se alteran las capacidades oncogénicas celulares que ayudan en la adquisición de capacidades metastáticas
- Analizar la señalización de TGF- $\beta$  y la vía de NF $\kappa$ B en nuestros modelos murinos (*Pten*<sup>pc+/-</sup> *Lkb1*<sup>pc+/-</sup> y *Pten*<sup>pc+/-</sup> *Lkb1*<sup>pc-/-</sup>). Caracterizar las poblaciones de células inmunes predominantes.

#### 1.3.2.3.2.2. Caracterización del nivel de expresión de CD24 en diferentes modelos de estudio. Estudio de correlación con LKB1

De entre los 16 genes seleccionados anteriormente (Figs. R18 y R19), quisimos seleccionar un candidato cuya función permitiera explicar las consecuencias biológicas observadas en presencia/ausencia de LKB1. Los resultados obtenidos del análisis del modelo murino *Pten*<sup>pc+/-</sup> *Lkb1*<sup>pc-/-</sup> y los obtenidos *in vitro* indican que LKB1 podría inhibir la progresión maligna oponiéndose a la adquisición de la capacidad tumoral de activar la invasión y la metástasis. Basándonos en esta hipótesis, decidimos fijar nuestra

atención sobre genes implicados en estos procesos biológicos. La validación de los datos obtenidos a partir del microarray mediante la técnica de la qRT-PCR confirmó la alteración observada en los genes CD24, CADM1 y KRT81, todos ellos involucrados en la progresión metastática (**Figs. R18 y R19**). Entre estos candidatos CD24 presentaba mediante ambas técnicas una mayor probabilidad y un mayor cambio absoluto en presencia de LKB1. Los resultados obtenidos apuntan a la posibilidad de que LKB1 regule negativamente su expresión, coincidiendo con los mostrados previamente mediante estudios de expresión génica realizados en melanoma (*Liu et al., 2012*) y en cáncer de pulmón (*Ji et al., 2007*). Estos trabajos demuestran que la expresión de CD24 se encuentra regulada negativamente por LKB1 en la progresión tumoral de los tejidos mencionados. Aún más, los resultados derivados de la generación de ratones que presentan hiperactivación de K-Ras y la deficiencia de LKB1 en melanocitos murinos (*Liu et al., 2012*) demuestran en este contexto la expansión de una subpoblación tumoral prometastática caracterizada por la presencia de CD24, (CD24<sup>+</sup>). Los autores confirman la implicación de LKB1 en la regulación de CD24 de modo correlativo y asociado al tipo de célula más que a su señalización. Se observa además que la presencia de CD24 permite un incremento cualitativo de las propiedades metastáticas observadas *in vitro* e *in vivo*.

Estas observaciones nos hicieron dirigir la investigación hacia el estudio de CD24 como gen candidato a mediar en el mecanismo que inhibe la progresión tumoral en la próstata ejercido por LKB1. CD24 ha sido descrita como una proteína de superficie que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática vía glicosil-fosfatidil inositol (GPI). El gen CD24 humano codifica una proteína de 31 aminoácidos con 16 potenciales sitios de O-glicosilación y N- glicosilación. Debido a la amplia decoración en carbohidratos que presenta el peso molecular observado mediante análisis SDS-PAGE varía entre los 30 y los 70 KDa, lo que le confiere características similares a las de las proteínas de la familia de las mucinas (*Kristiansen et al., 2004a*). Debido a su anclaje vía GPI, CD24 se localiza exclusivamente en los dominios de membrana enriquecidos en glicolípidos, también conocidos como balsas de lípidos (*Zarn et al., 1996*). Estos microdominios de membrana están considerados como importantes plataformas de señalización (*Varma and Mayor, 1998*) en los que se ha descrito la localización de moléculas vinculadas con esta función tales como receptores tipo tirosina-quinasa, proteínas G o receptores anclados vía GPI como CD24 (*Simons and Gerl, 2010*). En el tejido normal CD24 se expresa en precursores de linfocitos-B, neutrófilos, células neuronales (*Hernández-Campo et al., 2007*) y en algunas células epiteliales, como en el tejido prostático (*Petkova et al., 2013*). En tumores sólidos humanos de pulmón, cerebro, estomago, colon, mama y ovario se ha observado una alta expresión de CD24 (*Kristiansen et al., 2004*). En el contexto del cáncer de próstata, existen diversos estudios en los que el análisis transcripcional de biopsias de próstata revela un incremento en los niveles de expresión en cáncer (*Schostak et al., 2006*) (*Kristiansen et al., 2004*) (*Kristiansen et al., 2005*) (*Nagy et al., 2009*). Por otra parte, estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* realizados en la última década han facilitado evidencias que revelan su implicación sobre crecimiento, adhesión, migración, invasión

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

y metástasis tumoral (Baumann et al., 2005) (Kristiansen et al., 2004), habiéndose relacionado el incremento de su expresión con un mayor grado de agresividad de la enfermedad (Liu et al., 2012) (Ji et al., 2007) (Baumann et al., 2005) (Baumann et al., 2012) (Bretz et al., 2012). En referencia al cáncer de próstata el nivel transcripcional de CD24 se ha propuesto como marcador pronóstico (Kristiansen et al., 2004). En base a estas observaciones nos planteamos que el aumento en la expresión de CD24 podría explicar los efectos observados en el modelo murino *Pten<sup>pc+/-</sup>;Lkb1<sup>pc-/-</sup>* (Fig. R5). Conversamente, su disminución en células relacionadas con el proceso de agresividad tumoral observada en estas células (Figs. R11 y R12).

Con el objetivo de evaluar si CD24 se encuentra bajo el control de LKB1 decidimos analizar su expresión en función de la presencia/ausencia de la quinasa. La convergencia de los resultados nos permitiría confirmar la regulación ejercida por LKB1 sobre la expresión de CD24, tal como predice nuestra hipótesis.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Caracterizar el nivel de expresión de CD24 en diferentes modelos de estudio y estudiar la correlación con LKB1

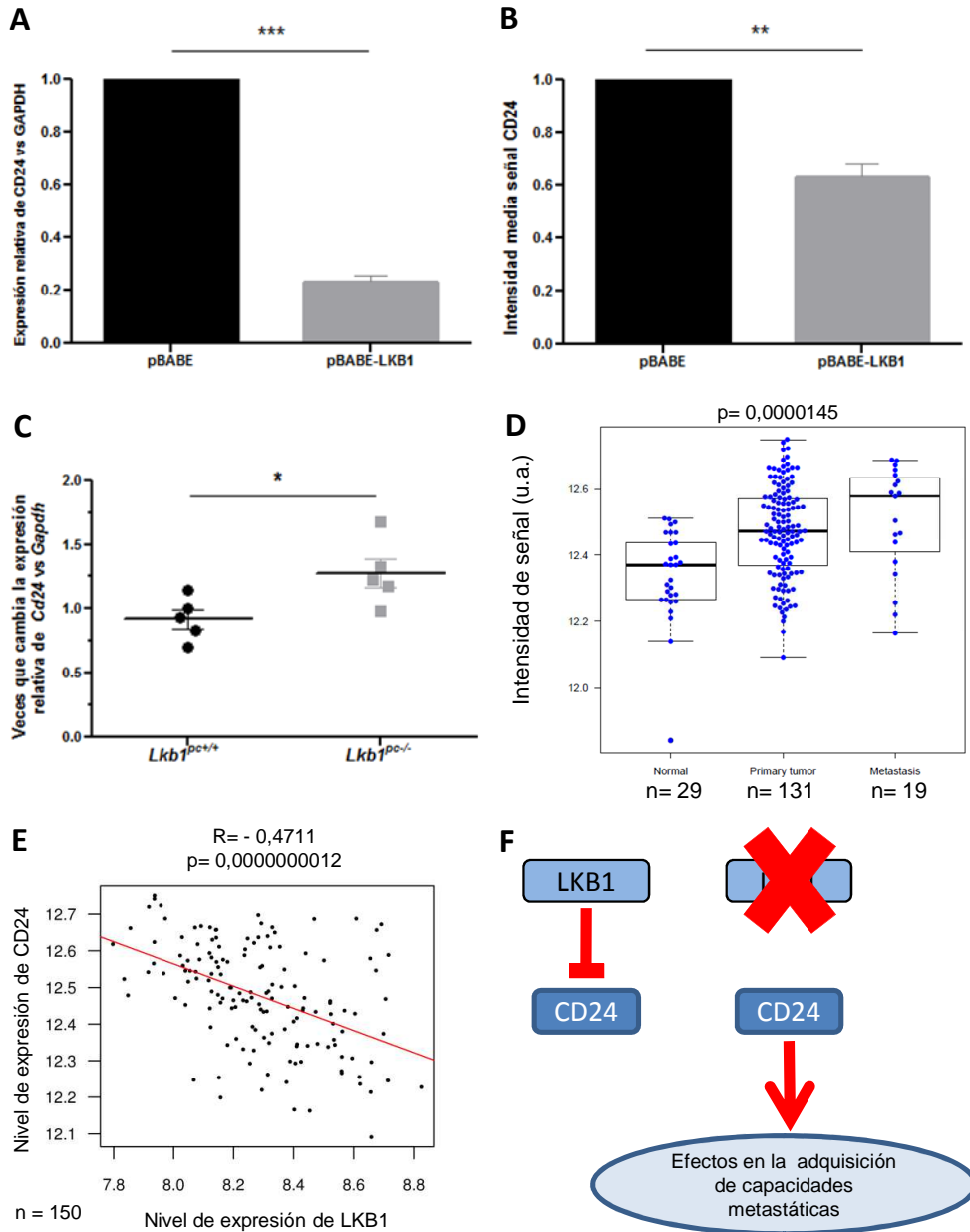
**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1, líneas murinas *Lkb1<sup>pc+/+</sup>* y *Lkb1<sup>pc-/-</sup>* y datos de expresión de especímenes humanos

**Metodología:**

- Estudio de la expresión de CD24 mediante qRTPCR, mediante inmunodetección por FACS y mediante análisis bioinformático

**Test estadístico:**

- Estudio de expresión, modelo *in vitro*: T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución
- Estudio de expresión, modelo *in vivo*: T de Student, análisis estadístico de varianza desigual, asumiendo una cola de distribución
- Análisis de comparación entre múltiples componentes: Test ANOVA
- Análisis de correlación LKB1-CD24: Estadístico de Pearson



**FIGURA R22.** Las diferencias de expresión observadas para CD24 en el microarray se confirman mediante al análisis en células, ratones y pacientes. La expresión de CD24 y de LKB1 correlacionan de manera inversa

**A.** qRTPCR mostrando la diferencia de expresión de CD24 en células pBABE y pBABE-LKB1 (n=3).

**B.** Análisis por FACS de la expresión de CD24 en la membrana citoplasmática en células pBABE y pBABE-LKB1 (n=3).

**C.** Análisis mediante qRTPCR de la diferencia de expresión del gen *Cd24* en tejido de próstata murino de ratones *Lkb1<sup>pc+/+</sup>* y *Lkb1<sup>pc-/-</sup>* de 12 meses (n=5).

**D.** Diagrama de cajas mostrando los niveles de expresión de CD24 en pacientes. El análisis fue realizado a partir de los datos generados por el estudio de Taylor et. al. (*Cancer Cell*, 2010). Se representa la mediana así como los valores máximo y mínimo. N: Sanos; PT: Tumores primarios; Met: Tumores metastáticos.

**E.** Diagrama de dispersión correspondiente al análisis de correlación entre la expresión de CD24 y LKB1. Se consideraron tumores primarios y metastáticos. La línea roja representa la recta de regresión.

**F. Esquema R1.** Esquema en el que se muestra el modelo propuesto según el cual la ausencia de LKB1 podría hacer que CD24 desarrolle sus funciones en polaridad colaborando así en la progresión del cáncer.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

Quisimos estudiar en primer lugar, tanto a nivel de RNA mensajero como a nivel de la proteína que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática, si la presencia LKB1 regula el nivel de expresión de CD24 en células isogénicas DU145. Los resultados obtenidos muestran entre ambos parámetros una relación inversa y estadísticamente significativa (**Fig. R22A y B**). A continuación, nos preguntamos si esta relación se extiende también al tejido prostático murino, para lo cual analizamos el nivel de expresión de CD24 en la próstata de ratones de 12 meses pertenecientes a las líneas *Lkb1<sup>pc+/+</sup>* y *Lkb1<sup>pc-/-</sup>*. Los resultados obtenidos confirman la relación inversa observada entre la expresión de ambos genes (**Fig. R22C**). Por otra parte, con el objetivo ampliar el estudio a especímenes humanos, analizamos el nivel de CD24 sobre uno de los análisis del perfil de expresión en cáncer empleado previamente (*Taylor et al., 2010*). El análisis bioinformático reveló que la expresión de CD24 se encuentra incrementada en pacientes con cáncer primario de próstata y que aumenta aún más a lo largo de la progresión tumoral (**Fig. R22D**). Esta base de datos también nos permitió llevar a cabo el análisis de correlación entre los niveles de expresión de LKB1 y CD24 revelando, con un alto poder estadístico, la correlación inversa existente entre ambos (**Fig. R22E**).

Los resultados obtenidos nos hacen postular un modelo en el que la presencia de LKB1 inhibe la expresión de CD24. En base a este modelo, la pérdida de expresión de LKB1 a lo largo de la transformación maligna induciría potencialmente la expresión de CD24, lo cual podría facilitar a la célula tumoral la adquisición de capacidades metastáticas (**Figs. R22F**). Tal como hemos mostrado anteriormente, algunas de las funciones biológicas que se ven afectadas por la expresión de LKB1 son las de migración, invasión y formación de colonias en condiciones independientes de anclaje. Es factible pensar que la regulación de CD24 pueda ser el mecanismo mediante el que LKB1 inhibe estos parámetros, oponiéndose de esta manera a la capacidad tumoral de activar la invasión y la metástasis.

Los resultados derivados del estudio de los modelos murinos generados indican que la pérdida de LKB1 en el contexto de la heterocigosidad de PTEN confiere a las células la capacidad de metastatizar (**Fig. R5**). Los estudios realizados *in vitro*, a su vez, revelan que la presencia de LKB1 reduce la capacidad de migración e invasión y la de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje (**Figs. R11 y R12**). En células DU145 la caracterización de la población celular propagadora de esferas identifica la expresión de CD24 en la membrana celular de las esferas formadas (*Rybak et al., 2011*), en línea con los resultados mostrados. En base a ello, especulamos que la regulación negativa de CD24 en presencia de LKB1 puede ser la causa de la inhibición de la capacidad de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje. También, hemos demostrado que LKB1 regula el nivel de expresión de CD24 a lo largo de diferentes modelos de estudio de cáncer de próstata (**Fig. R22**). Además, la bibliografía existente apoya la candidatura de CD24 como mediador en el mecanismo antitumoral regulado por LKB1 ya que, tal como indicábamos anteriormente, su expresión se ha relacionado con un incremento de las capacidades tumorales de migrar,



invadir y desarrollar metástasis (*Baumann et al., 2005*). Por otra parte, resultados obtenidos en este trabajo, tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que LKB1 regula estas mismas funciones biológicas.

En conjunto, estas observaciones nos hacen postular que la regulación negativa de LKB1 sobre CD24 podría ser el mecanismo a través del cual LKB1 se opone a la capacidad tumoral de desarrollar metástasis, inhibiendo en consecuencia la progresión del cáncer de próstata.

Los resultados obtenidos muestran que LKB1 incide sobre la regulación transcripcional de CD24 y de genes implicados en la vía NFκB. En cáncer de mama se ha descrito que la activación de NFκB regula negativamente la expresión de CD24, lo cual se refleja en un descenso en la proporción de células madre del cáncer (*Iriondo et al., 2015*). Creemos que sería interesante analizar si este mecanismo se reproduce en nuestro sistema celular.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Estudio del potencial mecanismo de supresión de tumores ejercido por LKB1-CD24

- Construir un sistema de sobreexpresión inducible para CD24 que nos permita su expresión estable en células pBABE y pBABE-LKB1 con el objetivo de estudiar si esta proteína revierte el fenotipo de supresión tumoral observado tras la expresión de LKB1 en nuestro sistema
- Evaluar el nivel transcripcional de CD24 tras la inhibición de la señalización de NFκB en presencia de LKB1

El siguiente cuadro recapitula los resultados obtenidos hasta ahora:

### RESÚMEN DE RESULTADOS

**LKB1 inhibe la progresión y diseminación del cáncer de próstata**

**La pérdida concurrente de PTEN y LKB1 cooperan favoreciendo la progresión del cáncer de próstata**

**El mecanismo de acción de LKB1 en la supresión del cáncer de próstata se ejecuta mediante la oposición a la adquisición de capacidades oncogénicas, potencialmente mediante la inhibición de la expresión de CD24**

**La presencia de LKB1 activa la señalización de NFκB**

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

### 1.3.3. Evaluación de las consecuencias de la expresión de un mutante de LKB1 sin actividad quinasa. Efecto independiente de la actividad quinasa

Estudios previos han descrito en pacientes afectados de PJS la existencia de mutaciones que anulan la capacidad de autofosforilación de LKB1 impidiendo su activación y en consecuencia su función quinasa (Mehenni *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha observado que estos pacientes presentan mayor riesgo a padecer cáncer (Boardman *et al.*, 1998) (Giardiello *et al.*, 1987). Basándonos en estas observaciones nos planteamos la posibilidad de que las mutaciones inactivantes de LKB1 pudieran incidir en la progresión del cáncer de próstata.

#### HIPÓTESIS

**Las mutaciones inactivantes de LKB1 inciden en la patogénesis y progresión del cáncer de próstata.**

Con este objetivo, evaluamos si las capacidades supresoras de tumores mostradas en presencia de la forma salvaje de LKB1 son dependientes de su actividad catalítica. Para ello expresamos en la línea celular DU145 un mutante sin actividad quinasa (K78I) y evaluaremos su comportamiento frente a la línea DU145-pBABE, deficiente en LKB1. La forma mutante expresada, descrita en *Xenopus laevis*, sustituye la lisina del residuo 78 por isoleucina, lo cual afecta al subdominio II del lugar de unión del ATP de la proteína XEEK1 (Mehenni *et al.*, 1998) y anula su capacidad de autofosforilación (Su *et al.*, 1996). Tal como indicábamos en el apartado 1.3.1, mediante infección retroviral, generamos líneas celulares isogénicas que difieren en la expresión de LKB1. Tras comprobar que las formas ectópicas se expresan en un orden de magnitud similar a la de la proteína endógena (**Fig. R8**) y su correcta funcionalidad (**Fig. R9**), procedimos a estudiar el efecto de la expresión del mutante sin actividad catalítica. Si la señalización ejecutada por LKB1 es responsable de la inhibición de las características tumorales descritas para la forma salvaje, la expresión del mutante LKB1 KD debería resultar una fenocopia de la línea celular DU145-pBABE, lo cual avalaría la hipótesis planteada.

En base a este razonamiento, evaluamos las consecuencias biológicas de la expresión de LKB1 KD en la línea celular DU145 en base a los mismos parámetros analizados para la forma salvaje.

### 1.3.3.1. Estudio de los efectos biológicos derivados de la expresión de LKB1 KD

Los resultados mostrados anteriormente indican que el crecimiento celular en condiciones basales se muestra independiente de la presencia de la forma salvaje de LKB1 (Figs. R10). Con el objetivo de estudiar las consecuencias de la expresión de un mutante sin actividad quinasa quisimos confirmar primer lugar que la expresión de LKB1 KD no altera este parámetro.

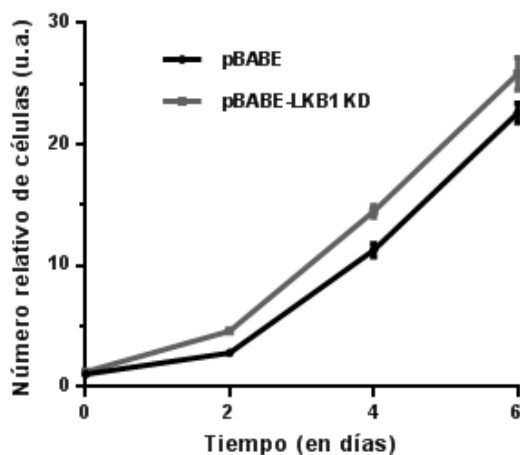
#### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Análisis del número relativo de células

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1 KD

**Metodología:** Ensayo de cristal violeta

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución



**FIGURA R23.** La expresión exógena de LKB1-KD no altera el crecimiento celular en la línea DU145

Crecimiento celular relativo analizada por cristal violeta. Se muestra un experimento representativo y su desviación estándar (n=9).

El análisis del número relativo de células, coincidiendo con los resultados mostrados para la forma salvaje, indica que la presencia de LKB1 KD no influye sobre la tasa de crecimiento celular (Fig. R23). Estos resultados, junto con los presentados para la forma salvaje, indican que el número relativo de células en condiciones basales es independiente de la presencia de LKB1.

Tal como hemos mostrado en el apartado 1.3.2.1, la presencia de LKB1 inhibe características oncogénicas, tales como la capacidad de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje, la de migración y la de invasión (Figs. R11 y R12). Con el objetivo de dilucidar si la actividad quinasa de LKB1 es la responsable del mecanismo de supresión tumoral ejercido, estudiaremos las consecuencias de la expresión de LKB1 KD en función de los citados parámetros. En base a nuestro planteamiento, esperamos que el mutante sin actividad quinasa pierda la capacidad

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

supresora de tumores mostrada por la forma salvaje. Estos resultados avalarían la hipótesis propuesta, según la cual las mutaciones inactivantes de LKB1 inciden en la progresión del cáncer de próstata.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Analizar funcionalmente capacidades oncogénicas en base a la expresión de LKB1 KD

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1 KD

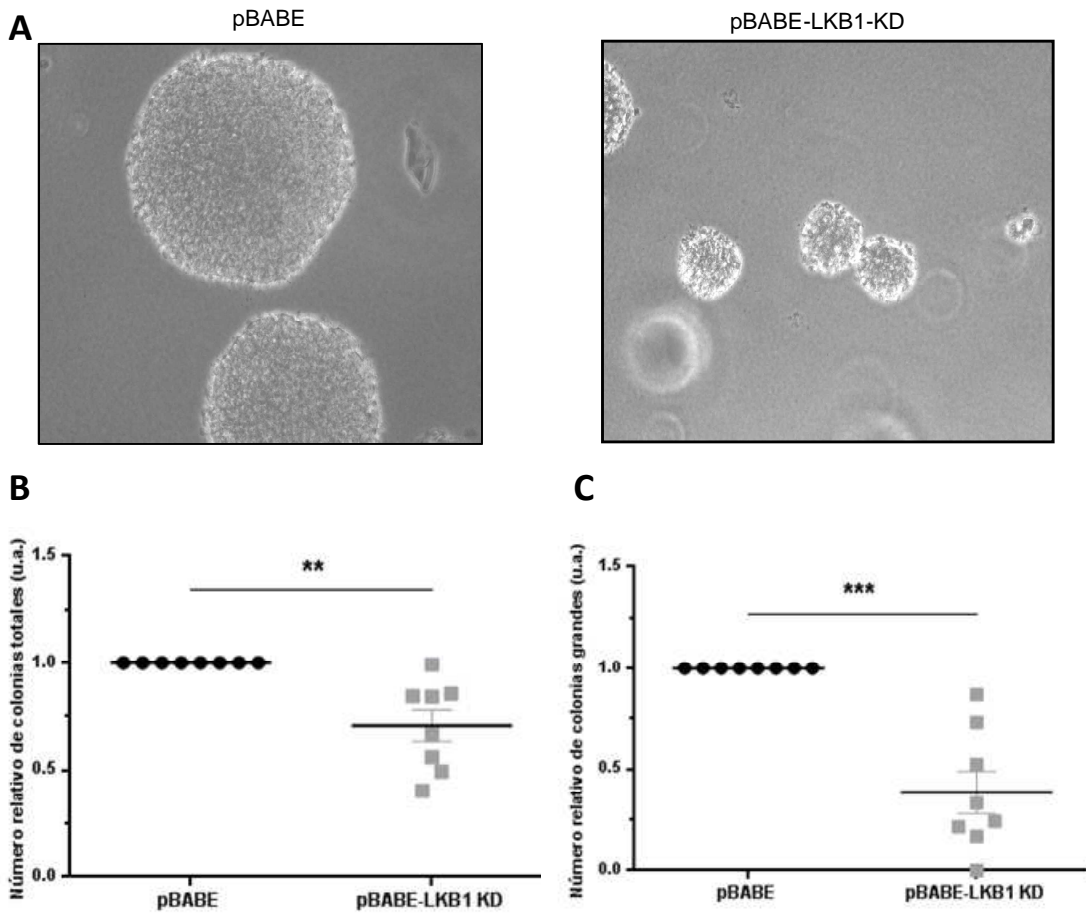
**Metodología:**

- Análisis de la capacidad de crecimiento en condiciones independientes de anclaje: Ensayo de formación de colonias en agar blando
- Cuantificación de las capacidades de migración e invasión: Ensayo en cámaras de Boyden

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico no pareado, asumiendo dos colas de distribución

Una de las características oncogénicas que se muestra inhibida en presencia de la forma salvaje de LKB1 es la capacidad de formar colonias en condiciones independientes de anclaje (**Fig. R11**). En base a ello nos propusimos investigar si esta capacidad tumoral depende de la actividad quinasa de LKB1, para lo cual, crecimos durante 21 días las células en un sustrato de agar blando. Sorprendentemente, los resultados obtenidos muestran que la expresión del mutante catalíticamente inactivo de LKB1 hace disminuir tanto el número como el tamaño de las colonias formadas (**Fig. R24B y C**), tal como se observa en la micrografías representativas (**Fig. R24A**) Dado que la hipótesis planteada no se cumple, la estadística se rehízo usando una estrategia de dos colas. Dicho análisis confirmó la significatividad estadística de los resultados obtenidos (**Fig. R24B y C**).

Observamos que el mutante expresado, carente de actividad catalítica, retiene la capacidad supresora de tumores descrita para la forma salvaje, reflejándose en la disminución del número y del tamaño de las colonias formadas. Estos resultados indican que la presencia de LKB1 KD es capaz de inhibir la formación de colonias en condiciones independientes de anclaje, sugiriendo que el mecanismo que lo ejecuta depende de LKB1 pero no actúa por mediación de su actividad quinasa.



**FIGURA R24. La expresión exógena de LKB1-KD influye sobre el número y sobre el tamaño de las colonias formadas en agar blando**

**A.** Micrografías representativas de las colonias formadas tras crecer 21 días en agar blando. Imágenes adquiridas a 100X.

**B y C.** Cuantificación correspondiente al número total (**B**) y al número de colonias de tamaño grande (**C**) formadas. (n=8) Se consideraron como grandes las colonias que al menos triplicaban el tamaño medio del resto.

\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

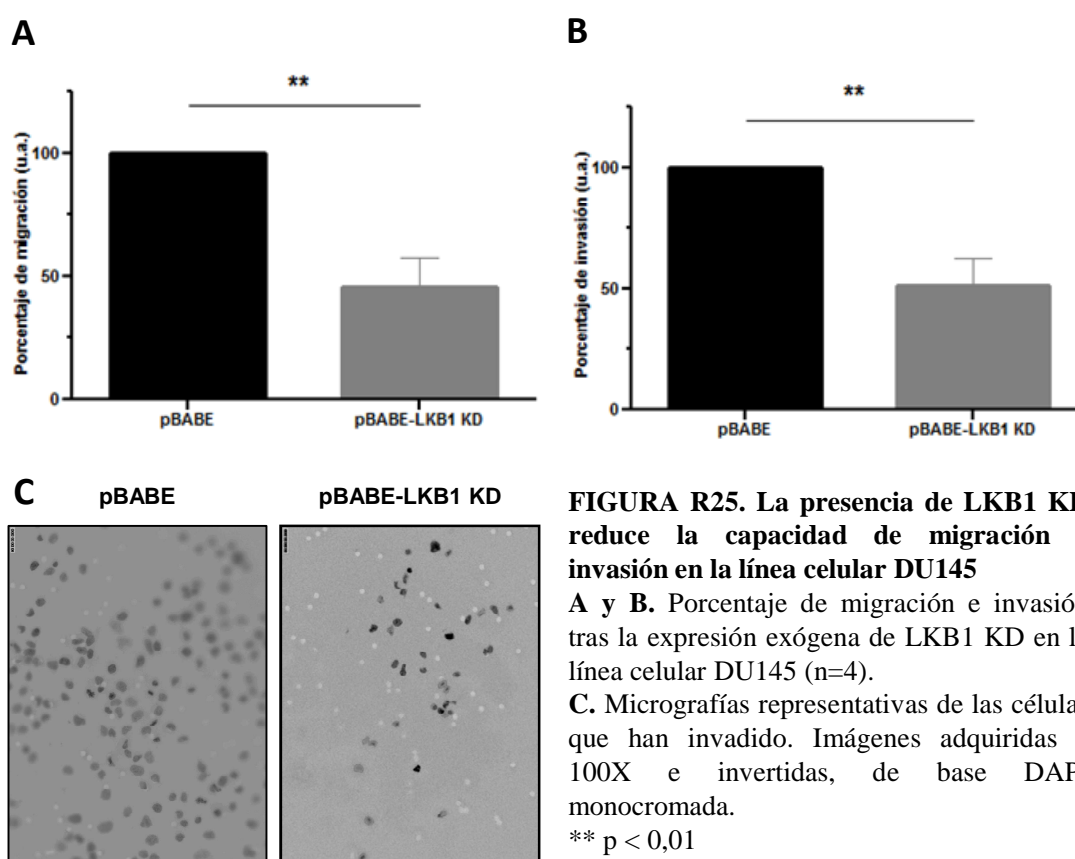
Los resultados obtenidos no apoyan la hipótesis planteada ya que apuntan la posibilidad de que las mutaciones inactivantes de LKB1 permitan ejercer parcialmente la acción supresora de tumores mostrada por la forma salvaje. En base a estos resultados decidimos rechazar la hipótesis inicial y proponer una alternativa en la que se plantea que las mutaciones que inactivan la actividad quinasa de LKB1 inhiben la progresión del cáncer de próstata.

### HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Las mutaciones inactivantes de LKB1 inhiben la progresión del cáncer de próstata

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

Con el objetivo de estudiar si el resto de características tumorales inhibidas por la forma salvaje de LKB1 se encuentran reguladas por la presencia del mutante catalíticamente inactivo quisimos estudiar las consecuencias de su expresión en función de las capacidades de migrar e invadir. Para ello, llevamos a cabo los ensayos correspondientes mediante el empleo de cámaras de Boyden. Observamos que la presencia de LKB1 KD reduce a la mitad, aproximadamente, ambas capacidades celulares, mostrando además un alto poder estadístico. Por lo tanto, también en referencia a estos parámetros el mutante sin actividad quinasa retiene la capacidad supresora de tumores que muestra la forma salvaje (**Fig. R25A y B**).



En resumen, los análisis de las consecuencias biológicas de la expresión de un mutante de LKB1 sin actividad catalítica convergen al mostrar que las capacidades de formar colonias sin el anclaje a la matriz extracelular, de migrar y de invadir son inhibidas en presencia de LKB1 de forma independiente a su actividad quinasa. Los resultados obtenidos avalan la hipótesis alternativa planteada ya que demuestran que mutante de LKB1 K78I retiene la capacidad supresora de tumores en la próstata. Estudios realizados con líneas celulares de melanoma que el nivel de expresión de LKB1 es independiente a la migración hacia factores de crecimiento solubles (quimiotaxis). Din embargo la expresión del mutante K78I demuestra que la capacidad de migrar direccionalmente hacia gradientes de matriz extracelular (haptotaxis) depende de la capacidad quinasa de LKB1. La pérdida de actividad de LKB1 se refleja en la incapacidad para detectar y respetar los límites de la matriz extracelular confiriendo a

las células mayor nivel de plasticidad y capacidad de invasión (*Chan et al., 2014*). El fenotipo diferencial mostrado por el mutante K78I apunta a que su capacidad de supresión tumoral sea dependiente de tejido o exclusiva de la próstata.

Los resultados obtenidos apuntan firmemente hacia la posibilidad de que LKB1 disponga de funciones adicionales más allá de las asociadas con su actividad catalítica. La confirmación de esta teoría podría resultar altamente novedosa ya que en la bibliografía existente todas las competencias atribuidas a LKB1 están vinculadas con su actividad quinasa.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Estudio funcional de las capacidades oncogénicas relacionadas con el desarrollo de metástasis

- Utilizar otras mutaciones inactivantes de LKB1 para corroborar su efecto supresor independiente de actividad quinasa (p.e. el mutante D194A)
- Análisis *in vivo* de las capacidades metastáticas: Ensayo de inyección en la vena de la cola

### 1.3.3.2. Análisis del mecanismo de acción de LKB1 KD en la supresión del cáncer de próstata

Con el objetivo de abordar el estudio del mecanismo de acción del mutante de LKB1 sin actividad catalítica empleamos tres estrategias diferentes. En primer lugar estudiamos si la alteración de la estequiometría del complejo LKB1:STRAD:MO25 es capaz de explicar las funciones supresoras de tumores exhibidas por el mutante de LKB1 sin actividad catalítica. A continuación, y de forma paralela a la estrategia empleada para el estudio del mecanismo de acción de la forma salvaje, analizamos el fenotipo metabólico y el perfil de expresión génica regulado por la presencia de LKB1 KD.

#### 1.3.3.2.1. Análisis de las consecuencias del silenciamiento de MO25 sobre la línea celular deficiente (DU145) o competente (PC3) para LKB1

Tal como se ha descrito en la introducción, LKB1 en las células se encuentra en un complejo heterotrimérico 1:1:1 con la pseudoquinasa STRAD (*Baas et al., 2003*) y la proteína de anclaje MO25 (*Boudeau et al., 2003*) (**Fig. R26A**). La expresión ectópica de LKB1 KD da lugar a la formación del heterotrimero aunque carecería de actividad catalítica, por lo que especulamos que el acomplejamiento de MO25 o STRAD potencialmente podría impedir que la forma libre de estas proteínas llevaran a cabo otra función biológica. En este caso las capacidades supresoras de tumores observadas no serían dependientes de LKB1 en sentido estricto si no de la formación del complejo.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

Basándonos en este razonamiento quisimos descartar la hipótesis de que el efecto supresor de tumores observado en presencia de la forma inactiva de LKB1 estuviera mediado por alguna de las proteínas presentes en el heterotrímero.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Analizar de las consecuencias del silenciamiento de MO25 sobre una línea celular deficiente (DU145) y competente (PC3) para LKB1

**Muestras:** Líneas celulares isogénicas DU145 y PC3 que difieren en la expresión de MO25 $\alpha$

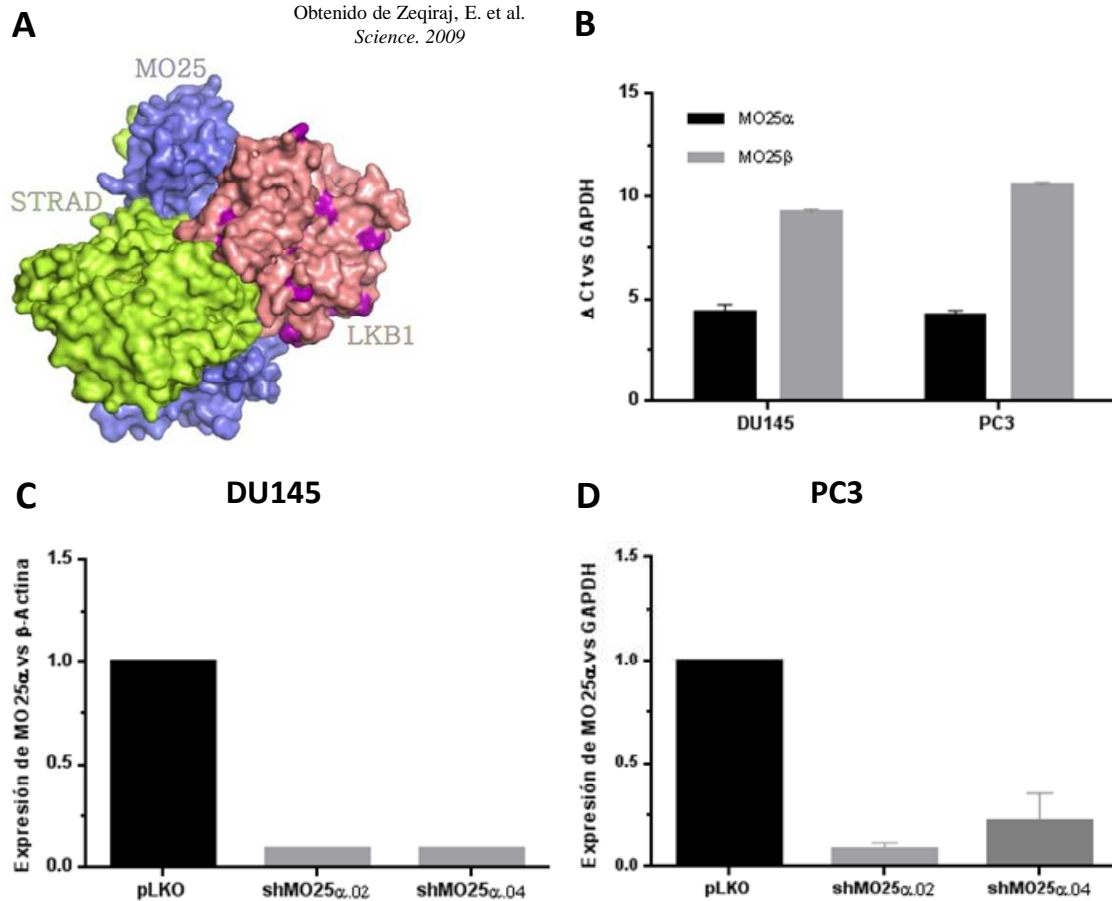
**Metodología:**

- Generación de las líneas celulares: Infección letiviral y selección con puromicina
- Análisis de la expresión de MO25: qRT-PCR
- Análisis de la viabilidad celular: Ensayo de cristal violeta
- Análisis de la capacidad de crecimiento en condiciones independientes de anclaje: Ensayo de formación de colonias en agar blando

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

Según la bibliografía la única proteína a la que se une STRAD es LKB1, lo cual limita sus posibilidades de tener funciones adicionales (*Baas et al., 2003*). Se ha observado además que el *knockout* de LKB1 reduce ampliamente sus niveles de expresión, no así los de MO25, probablemente debido a que STRAD es inestable a menos que no se encuentre en complejo con LKB1 (*Hawley et al., 2003*). Por su parte, MO25 se une y regula diferentes quinasas STE20 (*Filippi et al., 2011*) y sus niveles de expresión se muestran independientes al silenciamiento génico de LKB1 en modelos murinos (*Hawley et al., 2003*). En base a estas observaciones razonamos que el silenciamiento de MO25 potencialmente podría tener potencialmente un reflejo más profundo en la señalización más allá de LKB1. Si el silenciamiento de MO25 (especialmente en células deficientes para LKB1, donde las consecuencias de sus niveles no son atribuibles al complejo LKB1:STRAD:MO25) mimetiza la inhibición del fenotipo tumoral observado en el análisis *in vitro* tras la expresión de LKB1 KD, podría ser indicativo de que el mecanismo de supresión tumoral observado en presencia/ausencia de LKB1 se debe a la disponibilidad de MO25 para participar en otros complejos proteicos.





**FIGURA R26. Estudio de la expresión y silenciamiento de MO25**

**A.** Representación de la superficie molecular del heterotrímero formado por LKB1, STRAD y MO25.

**B.** Cuantificación de la expresión de MO25 $\alpha$  y de MO25 $\beta$  por qRT-PCR. Se muestra un experimento y su desviación estándar. La expresión se muestra en función del Ct (ciclo umbral) por lo que hay que considerar que a mayor número de Ct menor nivel de expresión.

**C. y D.** qRT-PCRs mostrando los niveles de RNA de MO25 $\alpha$  en las líneas celulares DU145 (**C**) y PC3 (**D**) tras la infección con lentivirus portadores de shRNA *scramble* o shRNA contra luncia isoforma  $\alpha$  de MO25 (shMO25 $\alpha$ ). Se utilizaron dos secuencias de silenciamiento diferentes. Se representa la desviación estándar.

En humanos existen dos isoformas conocidas para MO25, MO25 $\alpha$  y MO25 $\beta$ . Ambas se encuentran altamente relacionadas e interactúan con LKB1 de manera similar (Boudeau *et al.*, 2004). Por lo tanto, en primer lugar quisimos determinar el silenciamiento de cuál de las dos isoformas podría tener mayores consecuencias a nivel biológico y para ello evaluamos la abundancia de cada una de ellas en las líneas celulares DU145 y PC3. Los análisis de expresión realizados muestran que ambas líneas celulares mantienen un grado de expresión similar para las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\Delta$ Ct medio isoforma  $\alpha$  = 4,33 y 4,20 y  $\Delta$ Ct medio isoforma  $\beta$  = 9,21 y 10,57 en DU145 y PC3 respectivamente), en consecuencia, la diferencia en el número de ciclos es similar en ambas líneas, situándose entre 5 y 6 ciclos. Considerando que cada 3 ciclos equivalen a 10 veces de diferencia en abundancia de transcrito, podemos estimar que MO25 $\alpha$  es

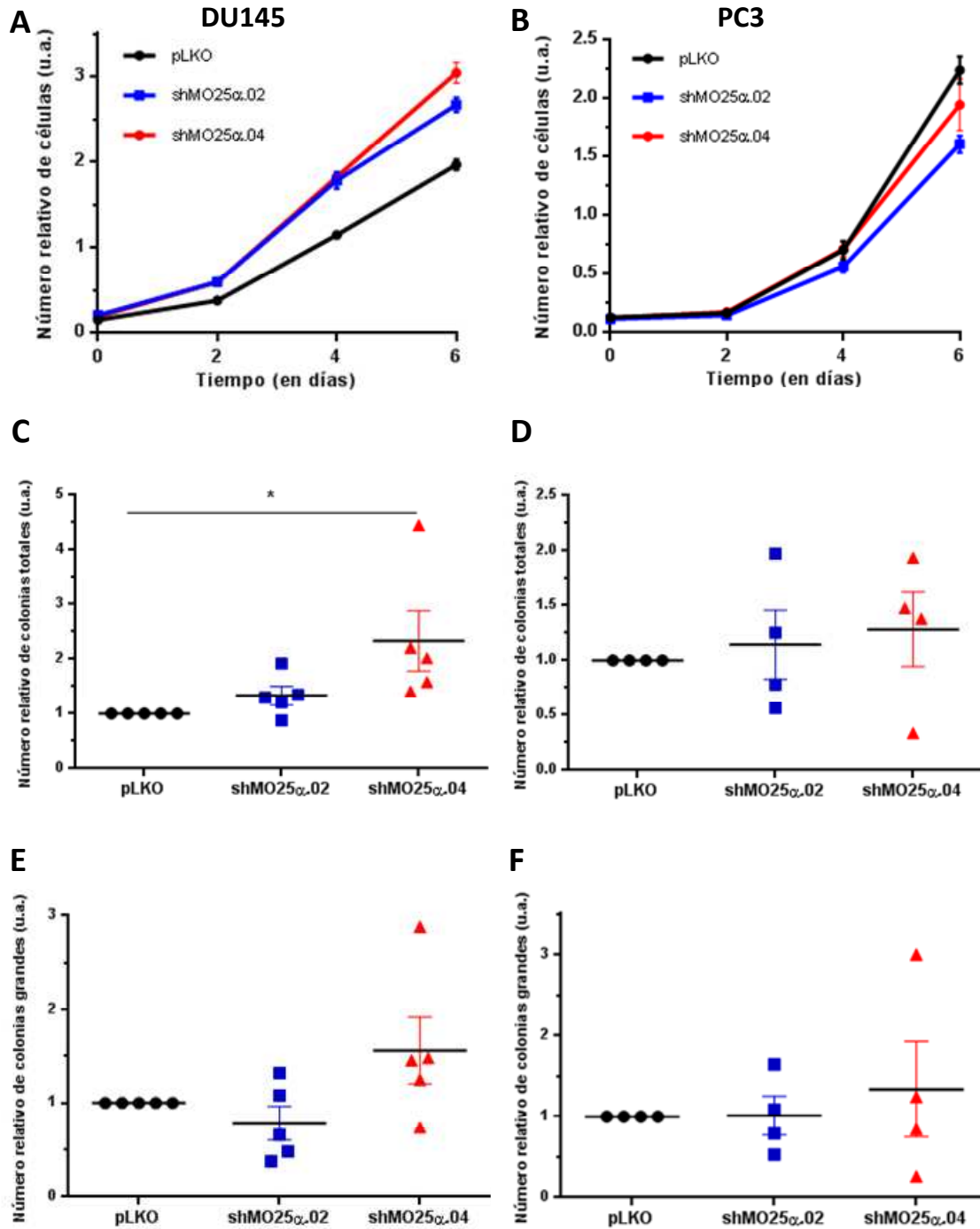
## Resultados y Discusión- Objetivo 1

aproximadamente 80-100 veces más abundante que MO25 $\beta$  (**Fig. R26B**). A pesar de la diferencia de observada a nivel de RNA mensajero quisimos verificar diferencia de expresión a nivel de proteína. Para ello silenciamos MO25 $\beta$  y analizamos su expresión mediante un anticuerpo que reconoce ambas isoformas. En línea con el análisis realizado a nivel transcripcional (**Fig. R26B**), observamos que el silenciamiento de MO25 $\beta$  no afecta al nivel de expresión de MO25 total (datos no mostrados), lo cual apunta el bajo nivel de expresión de MO25 $\beta$ .

Basándonos en la diferencia de expresión observada decidimos silenciar la isoforma  $\alpha$  de MO25. Con ese objetivo infectamos las líneas celulares DU145 y PC3 con lentivirus portadores de secuencias de silenciamiento para MO25 $\alpha$ . Tras la selección con puromicina evaluamos la efectividad del silenciamiento mediante análisis de expresión. Mediante esta estrategia seleccionamos de entre las cinco secuencias de silenciamiento probadas las dos que mostraban una mayor disminución en los niveles de RNA mensajero (**Fig. R26C y D**).

A continuación evaluamos las consecuencias del silenciamiento de MO25 $\alpha$  en función del crecimiento celular y de la capacidad de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje. Los resultados muestran que el número total de células es independiente del silenciamiento de MO25 $\alpha$  en ambas líneas celulares (**Fig. R27A y B**), coincidiendo con lo observado tras la sobreexpresión de LKB1 en la línea celular DU145 (**Figs. R10 y R23**). Este resultado apunta a que la regulación del complejo LKB1:MO25:STRAD no afecta a la viabilidad celular en cáncer de próstata. En cuanto a la capacidad de formación de colonias en condiciones independientes de anclaje observamos que el silenciamiento de MO25 $\alpha$  no inhibe esta característica tumoral, ni en términos de número de colonias (**Fig. R27C y D**) ni en tamaño de las mismas (**Fig. R27E y F**).

Observamos que el silenciamiento de MO25 $\alpha$  no se refleja en la inhibición de la capacidad de formar colonias en condiciones independientes de anclaje. Los resultados obtenidos descartan la implicación de otros complejos dependientes de MO25 para la acción independiente de quinasa de LKB1. En base a este razonamiento nos propusimos averiguar si el mecanismo ejecutor podría actuar a través de la regulación del fenotipo metabólico o a través del control del perfil transcripcional.



**FIGURA R27. El silenciamiento de MO25 $\alpha$  no disminuye la agresividad en las líneas celulares DU145 y PC3**

**A. y B.** Crecimiento celular relativo analizado por cristal violeta en células DU145 (**A**) y PC3 (**B**). Se muestra un experimento representativo con su desviación estándar (n= 3).

**C. y D.** Cuantificación correspondiente al número total de las colonias formadas por células DU145 (**C**) y PC3 (**D**) tras silenciar MO25 $\alpha$  (n=3).

**E. y F.** Cuantificación correspondiente al número de colonias de tamaño grande formadas por células DU145 (**E**) y PC3 (**F**) tras silenciar MO25 $\alpha$  (n=3). Se consideraron como grandes las colonias que al menos triplicaban el tamaño medio del resto.

\* p < 0,05

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

### 1.3.3.2.2. Caracterización del fenotipo metabólico regulado por LKB1 KD

Mediante esta estrategia nos propusimos confirmar si, al igual que sucede para la forma salvaje (**Fig. R14**), la presencia de LKB1 KD no se refleja en la alteración del perfil metabólico.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Caracterizar el fenotipo metabólico

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1 KD

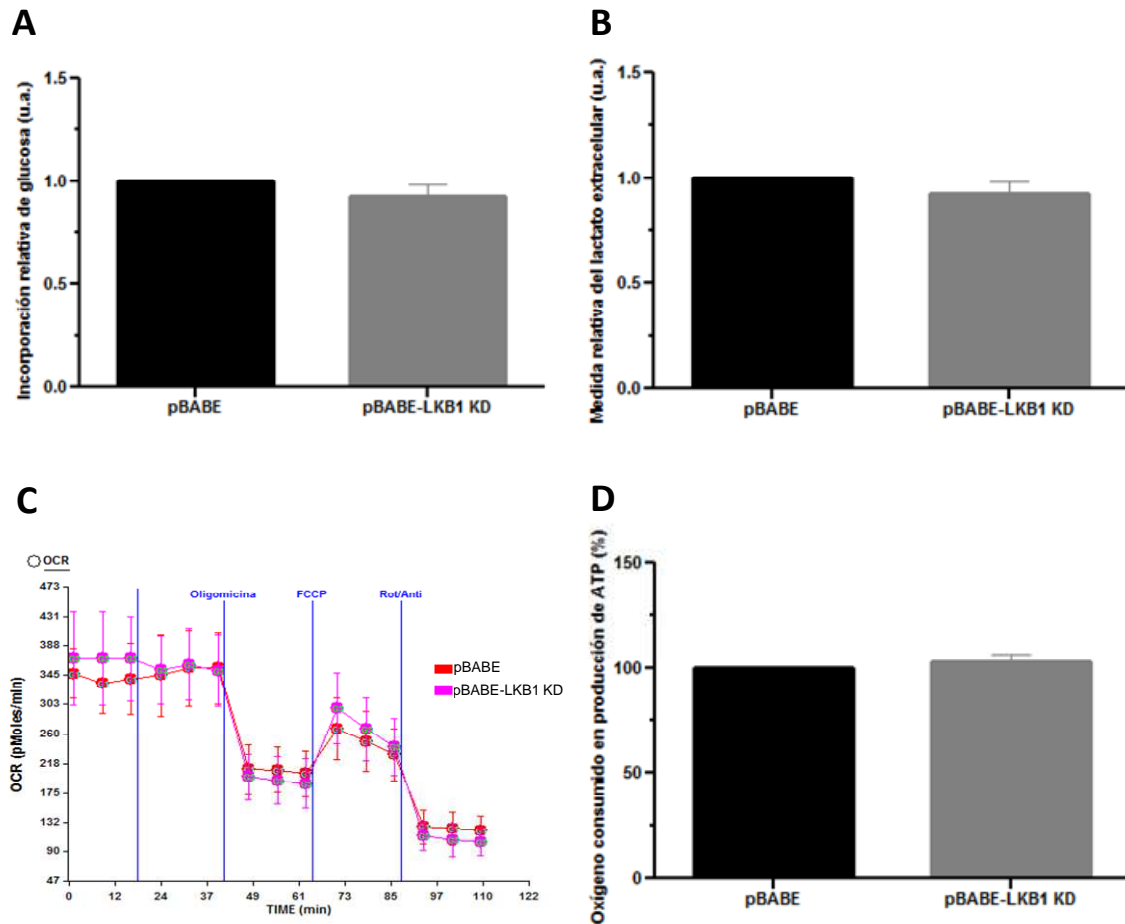
**Metodología:**

- Medida de la incorporación de glucosa: Cuantificación de los niveles de 2DG- $H^3$  intracelular
- Medida del lactato extracelular: Técnicas colorimétricas
- Estudio de la actividad metabólica en tiempo real: Análisis del flujo extracelular mediante el sistema *Seahorse*

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución.

Con el objetivo de caracterizar el perfil metabólico celular se llevaron a cabo análisis de incorporación de  $^3H$ -2DG, de acidificación del medio extracelular y de cuantificación del oxígeno consumido en tiempo real mediante el sistema *Seahorse XF24*. En ninguno de los ensayos se observaron diferencias en función de la presencia del mutante catalíticamente inactivo (**Fig. R28**).

Los resultados obtenidos indican que la regulación del perfil metabólico, en las condiciones estudiadas, es independiente de la presencia del LKB1 KD. Investigaremos a continuación si la regulación transcripcional podría ser el mecanismo ejecutado por este mutante catalíticamente inactivo para inhibir la adquisición de capacidades agresivas (formación de colonias en condiciones independientes de anclaje, migración e invasión)



**FIGURA R28. La presencia de LKB1 KD no altera el metabolismo basal en la línea celular DU145**

**A.** La incorporación de 2 desoxi-D-glucosa marcada con <sup>3</sup>H se midió mediante un contador de centelleo. Los resultados se muestran en nmoles de glucosa por mg de proteína por minuto (n=7).

**B.** Medida la concentración del lactato extracelular al cabo de 24 horas de la siembra (n=7).

**C.** Gráfico correspondiente a un experimento representativo realizado con el sistema *Seahorse*. Se representa el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo así como la desviación estándar.

**D.** Porcentaje de oxígeno destinado a la producción de ATP. Las medidas se realizaron utilizando el método de análisis *Seahorse* (n=3).

<sup>3</sup>H: Tritio. OCR: Ratio de consumo de oxígeno. FCCP: carbonilcianuro 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona. Rot/Anti: Rotenona/Antimicina A

### 1.3.3.2.3. Caracterización del perfil de expresión génica regulado por LKB1 KD

Con el objetivo de investigar el mecanismo supresor de tumores ejecutado por LKB1 de forma independiente a su actividad quinasa, analizamos mediante la tecnología del microarray de *Illumina* el perfil de expresión génica regulado por la presencia de LKB1 KD. De esta manera esperamos identificar genes candidatos a mediar en el mecanismo de acción de estudio.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Caracterizar el perfil de expresión génica regulado por LKB1 KD

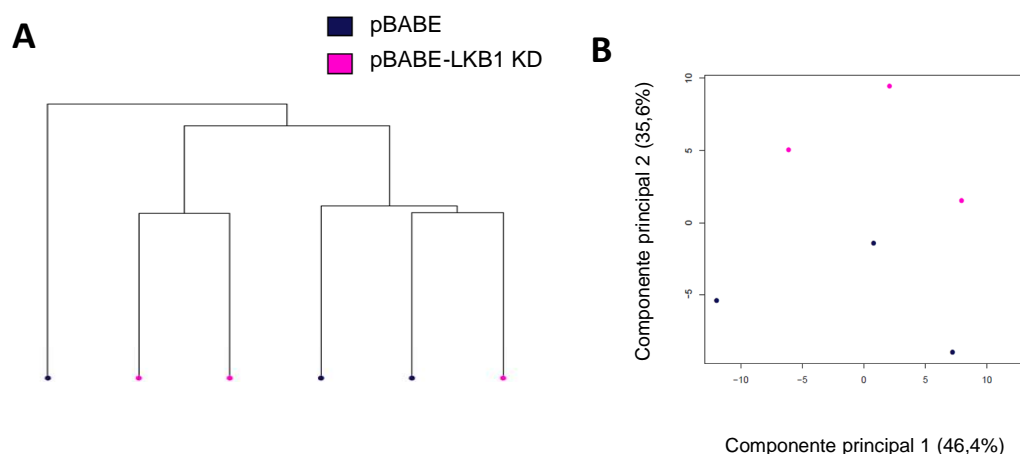
**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1 KD

**Metodología:** Microarray de expresión del genoma completo según tecnología de Illumina. Validación de los resultados mediante qRTPCR

**Test estadístico:**

- Análisis de agrupación muestral: Algoritmo Pearson
- Análisis de expresión diferencial: Estadístico empírico t de Bayes moderado
- Análisis de enriquecimiento funcional: Test hipergeométrico
- Análisis de expresión por qRTPCR: T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

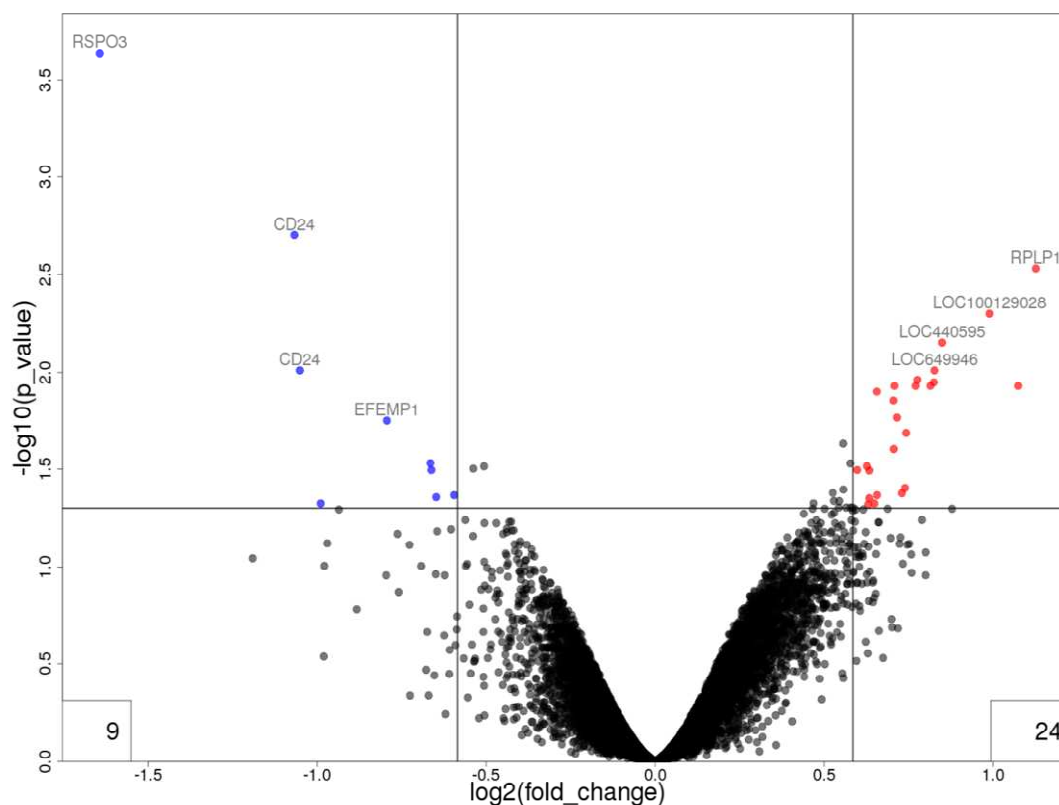
Tras normalizar los datos derivados del microarray se llevó a cabo un análisis no supervisado de los mismos, lo cual reveló la existencia de dos grupos en función de la presencia de LKB1 KD (**Fig. R29**). De esta manera confirmamos que existe un perfil de expresión regulado específicamente por la presencia de LKB1 e independiente de su actividad quinasa.



**FIGURA R29.** El análisis estadístico no supervisado de los datos derivados del microarray revela la existencia de un perfil de expresión regulado por la presencia de LKB1 KD

A y B. Representación gráfica del análisis de agrupación jerárquica (A) y del análisis de componentes principales (B).

A continuación procedimos a realizar el análisis de expresión diferencial que mostró significatividad estadística ( $p$  ajustado  $< 0,05$ ) para un número limitado de genes, detectándose 24 incrementados y 9 disminuidos (**Fig. R30**).



**FIGURA R30. El análisis mediante microarray de RNA de las diferencias en la expresión genética entre el grupo pBABE-LKB1 KD el pBABE resulta en un total de 33 genes diferencialmente expresados**

Gráfico Volcano en el que se muestran los genes que se expresan de manera diferencial en el grupo pBABE-LKB1 KD con respecto al grupo pBABE. Los genes expresados diferencialmente a la baja se representan en azul y los expresados diferencialmente al alza se representan en rojo.

Umbral considerados:  $-1,5 > \text{ veces que cambia la expresión } > +1,5$ ; valor de p ajustado  $< 0,05$

Acorde con el escaso número de genes diferencialmente expresados, los análisis de enriquecimiento no mostró grupos de genes enriquecidos de forma consistente (datos no mostrados). Los resultados obtenidos nos llevaron a considerar que la inhibición de las capacidades oncogénicas observada en presencia de LKB1 KD podría ser debida a la acción de genes discretos y no de grupos de genes. En base a ello, decidimos seleccionar de entre la lista de genes diferencialmente expresados genes candidatos a intervenir en el mecanismo supresor de tumores que actúa en presencia de LKB1 KD. Razonamos que el análisis del perfil transcripcional regulado por la expresión de la forma salvaje de LKB1 muestra tanto la regulación de la expresión génica dependiente de su actividad quinasa y como la independiente de la misma, lo cual nos hizo retomar el grupo de genes seleccionados para la validación de la tecnología del microarray (**Figs. R18 y R19**). Decidimos por lo tanto cotejar la lista de genes diferencialmente expresados en presencia de LKB1 y de LKB1 KD con el objetivo de detectar genes coincidentes en ambas listas. El análisis comparativo reveló la presencia de dos genes que figuraban diferencialmente expresados en ambos estudios, EPAS1 y CD24. Para

## Resultados y Discusión- Objetivo 1

ambos genes se observa que su expresión disminuye significativamente en presencia de LKB1 (Figs. R18) y de LKB1 KD (Tabla R1). Las funciones atribuidas a estos genes candidatos además podrían explicar el mecanismo supresor de tumores observado en presencia de LKB1 KD, tal como se discutirá a lo largo de los próximos apartados de este trabajo.

	Veces que cambia	Valor de p ajustado
CD24	-2,095	0,0019
EPAS1	-1,985	0,0473

**Tabla R1.** Tabla en la que se indican las veces que cambian y con qué probabilidad los genes EPAS1 (o HIF2 $\alpha$ ) y CD24 en el grupo pBABE-LKB1 KD vs pBABE.

Tras la selección de los genes candidatos quisimos determinar si la presencia de LKB1 KD correlaciona con su expresión en diferentes los modelos de estudio empleados, basados en su presencia/ausencia. De esta manera trataremos de evaluar la potencial implicación de estos genes en el mecanismo supresor de tumores ejecutado en bajo el control de LKB1 de forma independiente a su actividad quinasa.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Caracterizar el nivel de expresión de EPAS1 y CD24 en diferentes modelos de estudio y estudiar la correlación con LKB1

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE y pBABE-LKB1 KD, líneas murinas *Lkb1*<sup>pc+/+</sup> y *Lkb1*<sup>pc-/-</sup> y datos de expresión de muestras humanas

**Metodología:**

- Estudio de la expresión de EPAS1 y CD24 mediante qRTPCR y mediante análisis bioinformáticos
- Estudios de correlación mediante análisis bioinformáticos.

**Test estadístico:**

- Estudio de expresión, modelo *in vitro*: T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución
- Estudio de expresión, modelo *in vivo*: T de Student, análisis estadístico de varianza desigual, asumiendo una cola de distribución
- Análisis de comparación entre múltiples componentes: Test ANOVA
- Análisis de correlación: Estadístico de Pearson

#### 1.3.3.2.3.1. Caracterización del nivel de expresión de EPAS1 en diferentes modelos de estudio. Estudio de correlación con LKB1

EPAS1 (del inglés, “*Endothelial PAS domain protein 1*”), también denominado HIF2 $\alpha$ , es un factor de transcripción que regula la respuesta adaptativa a la hipoxia (Schönenberger and Kovacs, 2015), habiéndose relacionado ampliamente el incremento

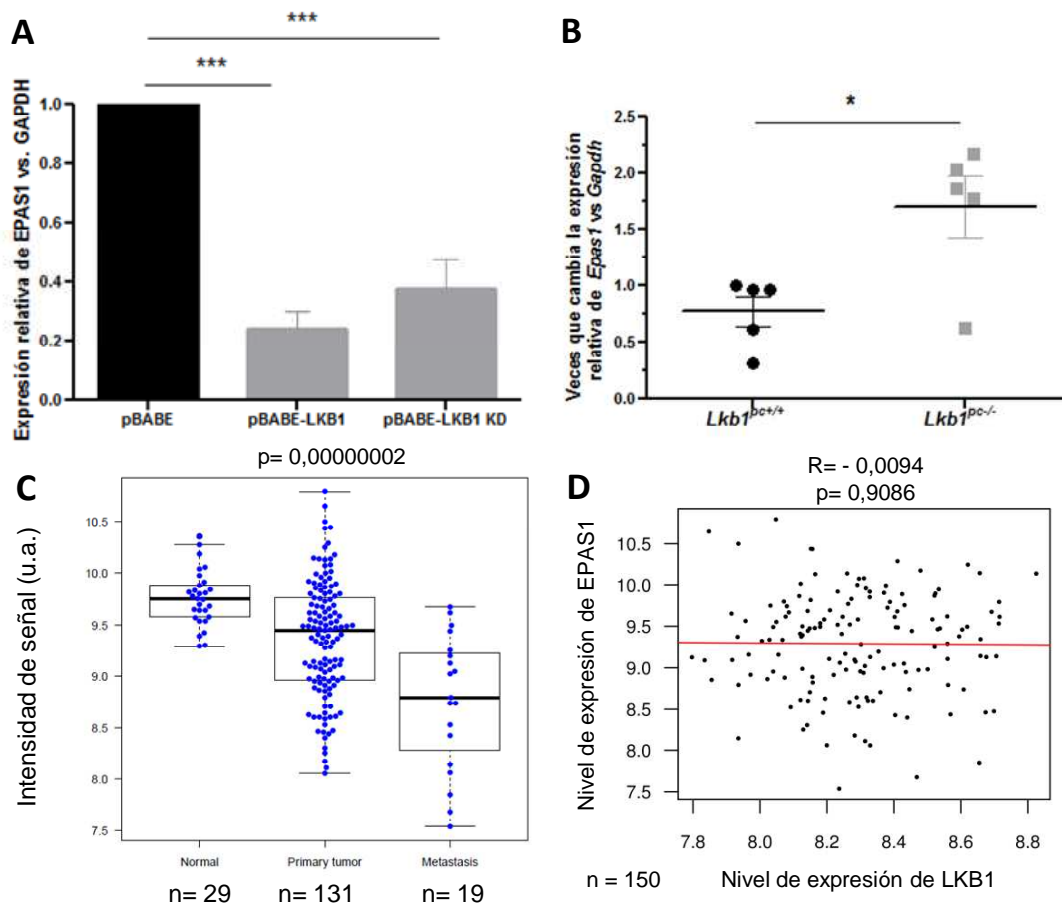


de su nivel de expresión con la progresión tumoral en un amplio número de tejidos (revisado en (Bertout *et al.*, 2008) y en (Cairns *et al.*, 2011)). En base a ello, especulamos que la disminución en los niveles de EPAS1 podría tener un efecto en la supresión tumoral. Con el objetivo de investigar si la regulación de EPAS1 es dependiente LKB1 e independiente de su actividad quinasa nos propusimos evaluar el nivel de expresión de EPAS1 en los diferentes modelos de estudio empleados en función de la presencia/ausencia de LKB1.

El análisis de expresión de EPAS1 en células isogénicas DU145 que difieren en la expresión de la forma salvaje o del mutante inactivo de LKB1 validó a través de una técnica adicional y en otro conjunto muestras, los resultados obtenidos mediante la tecnología del microarray. El análisis mediante qRTPCR confirmó que la expresión de EPAS1 disminuye en presencia de LKB1 de forma independiente a su actividad quinasa (**Fig. R31A**). Estos resultados coinciden además con los obtenidos en la validación del microarray realizado con el objetivo de analizar el perfil de expresión regulado por la forma salvaje de LKB1 (**Fig. R19**). A continuación, nos preguntamos si LKB1 podría regular la expresión de EPAS1 en la próstata de murina. Para ello analizamos el nivel de expresión de EPAS1 en el en el lóbulo anterior de la próstata de ratones *Lkb1<sup>pc+/+</sup>* y *Lkb1<sup>pc-/-</sup>* de 12 meses de vida. El análisis de los resultados reveló un aumento significativo en los niveles de expresión en función de la delección de LKB1 (**Fig. R31B**). Finalmente con el objetivo de trasladar estos análisis a especímenes humanos recurrimos a la base de datos de perfiles de expresión en cáncer de próstata empleada previamente en este trabajo (Taylor *et al.*, 2010). El análisis bioinformático realizado mostró cómo la expresión de EPAS1 disminuye significativamente a medida que progresa el cáncer de próstata (**Fig. R31C**). Esta base de datos también nos permitió llevar a cabo un análisis de correlación entre la expresión de EPAS1 y LKB1, el cual reveló la ausencia de correlación (**Fig. R31D**).

Los resultados obtenidos avalan la posibilidad de que LKB1 pueda regular negativamente a nivel transcripcional la expresión de EPAS1, sin embargo el análisis de correlación en especímenes de cáncer de próstata indica que la regulación propuesta no es relevante en este contexto. Con el objetivo de confirmar estos resultados proponemos construir un sistema de sobreexpresión inducible para EPAS1 y emplearlo en este mismo modelo celular. La retención del fenotipo supresor de tumores tras la inducción confirmaría que la regulación de EPAS1 es independiente del mecanismo que actúa en la inhibición de la progresión tumoral.

## Resultados y Discusión- Objetivo 1



**FIGURA R31. Las diferencias de expresión observadas para EPAS1 en el microarray se confirman en células DU145, en ratones y en pacientes. La expresión de EPAS1 y de LKB1 no correlacionan**

**A.** qRT-PCR mostrando la diferencia de expresión de CD24 en células pBABE y pBABE-LKB1 (n=6).

**B.** Análisis por qRT-PCR de la diferencia de expresión del gen *Epas1* en tejido de próstata murino de ratones *Lkb1*<sup>pc+/+</sup> y *Lkb1*<sup>pc-/-</sup> de 12 meses (n=5).

**C.** Diagrama de cajas mostrando los niveles de expresión de EPAS1 en pacientes. El análisis fue realizado a partir de los datos del estudio de Taylor *et. al.* (*Cancer Cell*, 2010). Se representa la mediana así como los valores máximo y mínimo.

**D.** Diagrama de dispersión correspondiente al análisis de correlación entre la expresión de EPAS1 y LKB1 considerando tumores primarios y metastáticos. La línea roja representa la línea de regresión.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

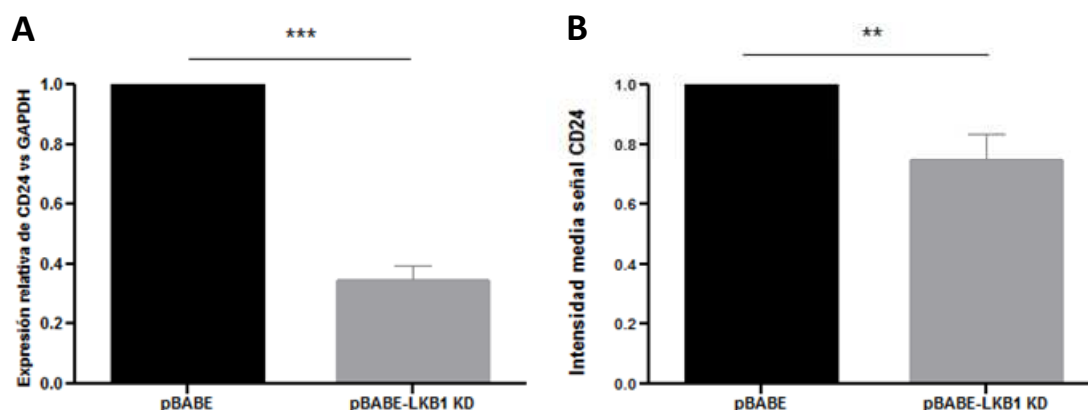
### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Caracterización del perfil de expresión génica regulado por LKB1 KD

- Construir un sistema de sobreexpresión inducible para EPAS1 para su empleo en nuestro sistema celular de líneas isogénicas DU145

### 1.3.3.2.3.2. Caracterización del nivel de expresión de CD24 en función de la presencia de LKB1 KD

El análisis de expresión diferencial en función de la presencia de LKB1 KD reveló de nuevo la regulación negativa ejercida sobre CD24, tal como había mostrado el análisis correspondiente a la forma salvaje (**Fig. R16**). Tal como mostrábamos en el apartado 3.2.3.2. de esta tesis, los resultados obtenidos apuntan firmemente a la posibilidad de que el nivel transcripcional de CD24 se encuentre regulado por la presencia/ausencia de la forma salvaje de LKB1 (**Fig. R22**). Quisimos investigar si este control se podía ejercer de una forma independiente a su actividad quinasa para lo cual analizamos el nivel de expresión de CD24 en presencia del mutante inactivo de LKB1. El análisis se llevó a cabo tanto a nivel de RNA mensajero como a nivel de proteína anclada a la membrana, revelando que la presencia de LKB1 KD se refleja en la inhibición de la expresión de CD24 a ambos niveles (**Fig. R32**).



**FIGURA 32. Las diferencias de expresión observadas para CD24 en el microarray se confirman mediante el análisis por qRT-PCR y por FACS en células DU145**

**A y B.** Análisis mediante qRT-PCR de la diferencia de expresión de CD24 (**A**) y análisis por FACS de la expresión en la membrana citoplasmática (**B**) en células pBABE y pBABE-LKB1 KD (n=3).

\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

Podemos concluir que la regulación de CD24 se muestra independiente de la función quinasa de LKB1, ya que la presencia de un mutante de LKB1 sin actividad catalítica es suficiente para inhibir la expresión de CD24 en células tumorales de próstata. Por otra parte el análisis transcripcional de biopsias muestra una correlación negativa entre la expresión de CD24 y LKB1 (**Fig. R22E**), apuntando la relevancia de la regulación descrita en el cáncer de la próstata. Con el objetivo de investigar esta cuestión proponemos utilizar el sistema de sobreexpresión propuesto en el apartado 1.3.1 en el contexto de LKB1 KD. El rescate de las funciones afectadas por LKB1 KD tras la expresión de CD24 indicaría que la regulación negativa de CD24 es el mecanismo responsable de los efectos observados en la supresión del cáncer de próstata en presencia de LKB1 e independientes de su actividad quinasa.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Caracterización del perfil de expresión génica regulado por LKB1

- Utilizar un sistema de sobreexpresión de CD24 que nos permita su inserción estable en células pBABE y pBABE-LKB1 KD con el objetivo de estudiar si se revierte el fenotipo de supresión tumoral observado tras la expresión de LKB1 en este sistema
- Validar la regulación de CD24 con otros mutantes de LKB1 sin actividad catalítica (p.e. D194A)

El estudio realizado nos permite concluir que LKB1 desempeña un papel supresor de tumores más allá de su actividad quinasa ya que demostramos que un mutante sin actividad catalítica mantiene parcialmente el fenotipo antitumoral exhibido por la expresión de la forma salvaje. Estos resultados sugieren que parte de la capacidad supresora de LKB1 es, al menos en parte, independiente de su actividad catalítica. Cabe destacar lo novedoso de los resultados obtenidos ya que en la bibliografía existente no se ha descrito ninguna función de LKB1 independiente de su acción quinasa, quizá debido a que este pueda ser un fenotipo restringido a la próstata. En línea con este razonamiento y en discrepancia con los resultados obtenidos en la presente tesis, el análisis del perfil transcripcional tras la sobreexpresión de LKB1 en células de cáncer de pulmón carentes de su expresión revela que los niveles de CD24 y EPAS1 aumentan en presencia de la forma salvaje. Sin embargo, en presencia del mutante sin actividad quinasa los niveles de expresión de ambos genes prácticamente no varían, observándose, en todo caso, un ligero aumento (*Ji et al., 2007*).

El siguiente cuadro recapitula los resultados obtenidos en referencia al estudio de la actividad independiente de quinasa ejercida por LKB1.

### RESÚMEN DE RESULTADOS

**LKB1 regula funciones celulares mediante un mecanismo independiente a su actividad quinasa**

**El mutante inactivo de LKB1 K78I inhibe determinadas características oncogénicas**

**La activación de la señalización de NFκB observada en presencia de LKB1 es dependiente de su actividad quinasa**

Con el objetivo de validar la hipótesis alternativa propuesta sería conveniente extender estas observaciones a otros mutantes de LKB1 sin actividad catalítica, proponemos como candidatos el mutante sin actividad catalítica D194A (*Lizcano et al., 2004*) y los mutantes descritos en pacientes con PJS (W308C, D176N y L67P)

(Mehenni et al., 1998). La validación de los resultados permitiría confirmar la hipótesis de que las mutaciones inactivantes de LKB1 no son oncogénicas en el tejido prostático.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Evaluación del efecto independiente de la actividad quinasa de LKB1

- Validar los resultados obtenidos mediante la sobreexpresión de otros mutantes de LKB1 sin actividad catalítica
- Validación de los resultados en células derivadas del modelo genético: Infección de cultivos primarios de células de próstata derivadas de ratones  $Pten^{pc+/-}Lkb1^{pc-/-}$  con construcciones que expresen LKB1 y LKB1 KD, para su posterior inyección subcutánea o intraprostática.

En resumen, nuestros resultados indican que LKB1 suprime la progresión tumoral de la próstata afectando a las capacidades de crecimiento en condiciones de ausencia de anclaje, migración e invasión por un mecanismo independiente de su actividad quinasa.

### CONCLUSIÓN

**La pérdida de expresión de LKB1, y no la de su actividad quinasa, contribuye a la progresión del cáncer de próstata favoreciendo la adquisición de capacidades oncogénicas**



## Objetivo 2

*Explorar el potencial uso de LKB1  
como biomarcador terapéutico  
en cáncer de próstata*



## **2. OBJETIVO 2: EXPLORAR EL POTENCIAL USO DE LKB1 COMO BIOMARCADOR TERAPÉUTICO EN CÁNCER DE PRÓSTATA**





La estratificación de pacientes con el objetivo de definir la terapia a aplicar en el tratamiento del cáncer de próstata se realiza en base a parámetros clínicos (edad, estado de salud general o antecedentes familiares) y patológicos (grado y estadio del tumor). Casi en ningún caso se consideran las características genéticas del tumor y esto genera variaciones entre criterios clínicos (*Sedelaar and Schalken, 2015*). Por ello, necesitamos definir biomarcadores que contribuyan a la decisión de la terapia más beneficiosa para el paciente en cada caso y a monitorizar su efectividad, abriendo las puertas de la práctica clínica a la medicina de precisión.

### Medicina de precisión: Definición

La medicina de precisión es una metodología clínica cuyo principal objetivo consiste en aunar los índices patológicos establecidos con el análisis del perfil molecular individualizado para dar lugar a estrategias de diagnóstico, de pronóstico y de terapia a la medida de las necesidades de cada paciente (*Mirnezami et al., 2012*)

La investigación en cáncer de próstata está dando los primeros pasos hacia la estratificación de pacientes en base a clasificadores moleculares que contribuyan a definir terapias selectivas (*Kaufman et al., 2015*). Sin embargo, en otros tipos tumorales se han logrado establecer protocolos que permiten predecir la respuesta terapéutica en función de marcadores moleculares. En la práctica clínica diaria la decisión de la terapia a aplicar en el tratamiento del cáncer de mama se condiciona a los resultados observados tras el análisis del tumor. Como ejemplo la sobreexpresión del gen HER2 es indicativa de una respuesta positiva ante la terapia con trastuzumab (*Drebin et al., 1985*) (*Vogel et al., 2002*).

### HIPÓTESIS

**La presencia/ausencia de LKB1 contribuye a definir terapias selectivas en el tratamiento del cáncer de próstata**

Existen 2 estrategias para determinar la terapia frente a la que los tumores deficientes en LKB1 pueden tener una respuesta diferencial:

1. Estudiar la vía por la que opera el gen. El análisis de los resultados obtenidos potencialmente permite identificar potenciales puntos débiles en las bases moleculares del tumor con el fin de atacarlo de manera selectiva.
2. Emplear técnicas de alto rendimiento. El uso de herramientas bioinformáticas para el análisis de datos facilita la aplicación del concepto de letalidad sintética en la terapia contra el cáncer.

## Resultados y Discusión- Objetivo 2

En este objetivo decidimos explorar ambas posibilidades.

### 2.1. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE LKB1 COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA FRENTE A TERAPIAS BASADAS EN EL ESTRÉS METABÓLICO

Una de la funciones principales de LKB1 es regular la activación de la vía que detecta limitaciones energéticas (*Velden et al., 2011*). Es por lo tanto factible pensar que terapias que alteran este parámetro podrían resultar efectivas en tumores de próstata deficientes para LKB1. Tal y como demuestran estudios previos, las células que carecen de LKB1 son más sensibles a la apoptosis inducida por agentes que limitan la generación de ATP (*Shaw et al., 2004*) (*Shackelford et al., 2013*). Para explicar estos resultados los autores proponen que las células deficientes en LKB1 son incapaces de detectar el estrés energético. Esto conlleva que no pueden activar mecanismos que favorezcan la recuperación de la homeostasis energética, llevando al colapso metabólico y a la muerte. De esta manera se abre la posibilidad del uso de LKB1 como herramienta molecular válida para estratificar pacientes que respondan positivamente a la terapia del tipo mencionado. En línea con la idea del uso de LKB1 como clasificador molecular, se ha publicado que células de cáncer de pulmón no pequeñas (*Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC*), deficientes para LKB1, responden ante la inducción del estrés metabólico por fenformina con una activación de la apoptosis (*Shackelford et al., 2013*). Según los datos obtenidos en el análisis del microarray de tejidos, la expresión de LKB1 varía en cáncer de próstata, habiendo observado que en el 38% de los tumores no se detecta su expresión (**Fig. R1**). Basándonos en los estudios mencionados, quisimos realizar en cáncer de próstata una prueba de concepto del modelo propuesto por *Shaw et al.* Para ello sometimos a células competentes o deficientes para LKB1 a diferentes formas de estrés metabólico. El objetivo radica en comprobar si la presencia de la quinasa determina una respuesta diferencial ante este tipo de estrés.

#### 2.1.1. Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador de efectividad terapéutica frente al tratamiento con fenformina

Nuestra primera estrategia para inducir estrés metabólico fue el tratamiento con fenformina. Tanto la metformina como su análogo fenformina son biguanidas que actúan a nivel de la mitocondria, inhibiendo de manera transitoria el complejo I de la cadena de transporte de electrones (*Owen et al., 2000*) (*Dykens et al., 2008*). Como consecuencia, se inhibe la producción de ATP mitocondrial y se incrementa la concentración de AMP intracelular que es capaz de unirse a la subunidad gamma reguladora de AMPK permitiendo así su activación (*Hawley et al., 2010*). Ambos compuestos mejoran el control glicémico, siendo la metformina el medicamento más aceptado para el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 (*revisado en Pernicova and*

*Korbonits, 2014*). En algunos países, la fenformina comenzó a utilizarse como anti-diabético pero fue retirada del mercado debido a la alta incidencia de acidosis láctica. El efecto inhibitorio de la fenformina es 50 veces mayor que el de la metformina. Ambos compuestos son internalizados principalmente mediante transporte activo, a través del transportador de cationes orgánicos OCT1, pero la fenformina muestra una mayor afinidad y actividad de transporte, con una marcada diferencia en la cinética de internalización con respecto a la metformina (*Sogame et al., 2009*) (*Pernicova and Korbonits, 2014*). La metformina se internaliza principalmente por células hepáticas y es más dependiente de transporte activo que la fenformina, siendo esta última accesible para un mayor número de tejidos (*Segal et al., 2011*).

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivos:** Evaluación de la respuesta frente a fenformina (0,1-1 mM) en función de la expresión de LKB1

- Análisis de la viabilidad celular
- Análisis del grado de proliferación
- Análisis del porcentaje de apoptosis

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE, pBABE-LKB1 y pBABE-LKB1 KD

**Metodología:**

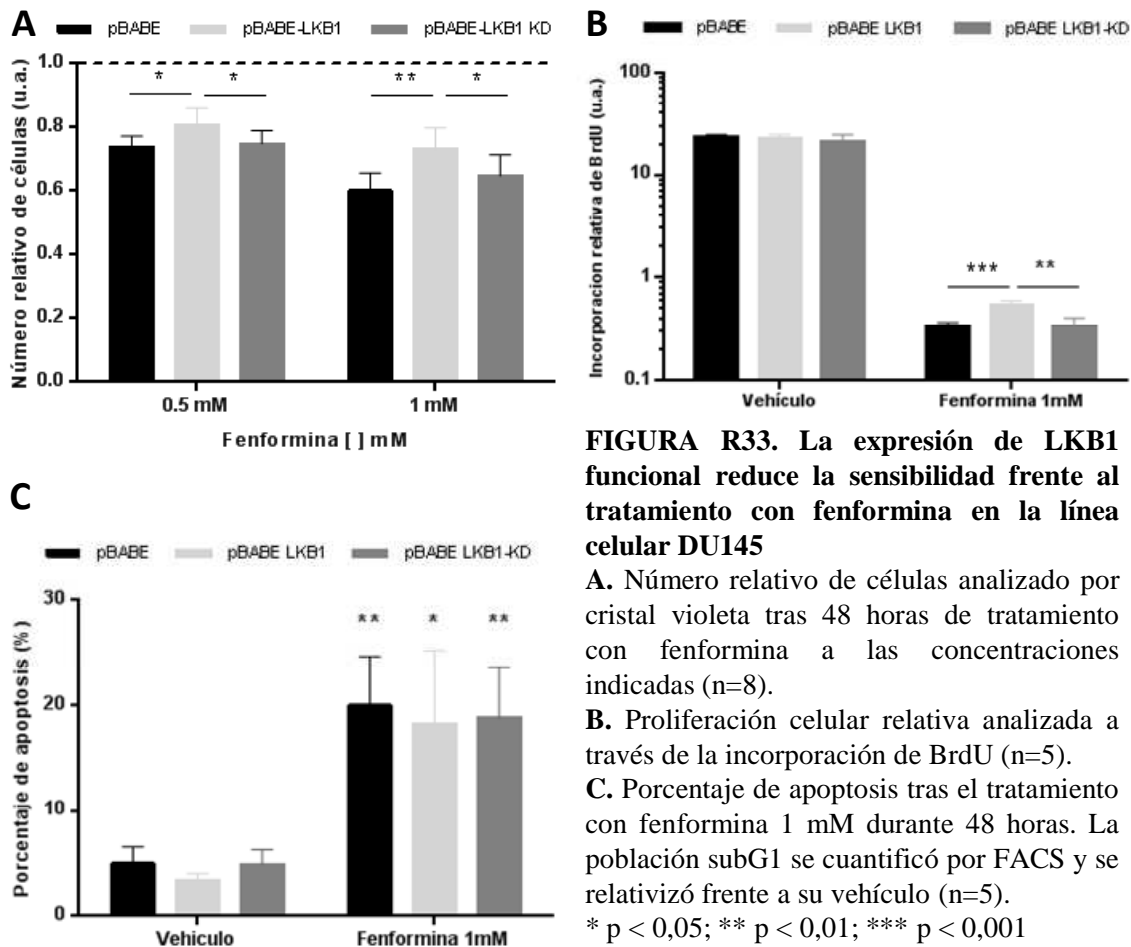
- Ensayo de cristal violeta
- Ensayo de incorporación de BrdU
- Cuantificación de la población SubG1 mediante FACS

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

Con el objetivo de seleccionar las condiciones experimentales adecuadas, realizamos ensayos en base a dosis y tiempo observando una respuesta al cabo de 48 horas de tratamiento con fenformina 1 mM (datos no mostrados). El análisis de la densidad celular relativa (**Fig. R33A**) mostró un mayor número de células viables en la línea que expresa LKB1 funcional. Esta diferencia, estadísticamente significativa, era dependiente de la dosis empleada. Dado que el número relativo de células corresponde al equilibrio entre las que se han dividido y las que han muerto, quisimos determinar si la diferencia observada en nuestros resultados se debía a la proliferación o a la apoptosis. El ensayo de proliferación (**Fig. R33B**) no mostró diferencias en la incorporación de BrdU en estado basal. Sin embargo, tras el tratamiento con fenformina las células que expresaban LKB1 funcional presentaron un menor descenso en la proliferación. Por otra parte, la presencia de LKB1 no dio lugar a diferencias significativas en el porcentaje de células en apoptosis, ni a las 24 horas del tratamiento (datos no mostrados), ni a las 48 (**Fig. R33C**).

A pesar de la ausencia de apoptosis no podemos destacar que el tratamiento pudiera inducir otras vías de muerte celular como la necrosis.

## Resultados y Discusión- Objetivo 2



**FIGURA R33. La expresión de LKB1 funcional reduce la sensibilidad frente al tratamiento con fenformina en la línea celular DU145**

**A.** Número relativo de células analizado por cristal violeta tras 48 horas de tratamiento con fenformina a las concentraciones indicadas (n=8).

**B.** Proliferación celular relativa analizada a través de la incorporación de BrdU (n=5).

**C.** Porcentaje de apoptosis tras el tratamiento con fenformina 1 mM durante 48 horas. La población subG1 se cuantificó por FACS y se relativizó frente a su vehículo (n=5).

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

La fenformina se retiró del uso clínico por su incidencia en acidosis láctica (*Pernicova and Korbonits, 2014*), aún así podría ser de utilidad como fármaco anticancerígeno ya que la dosis administrada y la duración del tratamiento pueden ser muy diferentes respecto a su uso anterior como antidiabético. Creemos que sería recomendable evaluar la aplicación de fenformina en terapia combinada, ya que si se encuentra un efecto sinérgico con otro citotóxico se podría disminuir su concentración. Además, aunque en cáncer de próstata no induzca la apoptosis selectiva en células carentes de LKB1, es posible que las sensibilice frente a la acción de otros fármacos.

### 2.1.2. Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador de efectividad terapéutica frente al estrés provocado por la restricción nutricional

Decidimos explorar también otras vías de inducción del estrés metabólico con el fin de determinar si la expresión de LKB1 da lugar a una respuesta diferencial.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Objetivo:** Análisis de la viabilidad celular a las 72 horas de la inducción de diferentes formas de estrés metabólico

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE, pBABE-LKB1 y pBABE-LKB1 KD

**Mecanismos de inducción del estrés metabólico:**

- Privación de suero (1% SFB)
- Tratamiento con 2-Deoxi-D-glucosa (5 mM)
- Privación de glucosa y uso de suero dializado

**Metodología:** Ensayo de cristal violeta

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

#### 2.1.2.1 Privación de suero

En primer lugar nos preguntamos si las células que mantienen la funcionalidad de LKB1 son más resistentes ante la privación de suero (**Fig. R34A**). Tras crecer las células durante 72 horas en DMEM completado con 1% de suero fetal bovino (SFB) no observamos diferencias significativas en el número total de células viables. En las tres líneas la densidad celular se redujo de media en torno a un 55%, mostrándose independiente de la presencia de LKB1.

#### 2.1.2.2 Inhibición de la glicólisis

Las células tumorales basan su metabolismo principalmente en la glucosa y en la glutamina como fuente de energía y carbono (*Ruiz-Perez et al., 2014*), lo que nos llevó a pensar que inhibiendo atacando específicamente la glicólisis quizá pudiéramos observar una respuesta diferencial marcada por la presencia de LKB1. La inhibición de la glicólisis activa AMPK que a su vez controla la fosforilación de enzimas y factores de transcripción implicados en el metabolismo de carbohidratos (*Luo et al., 2010*). Si se cumple el modelo propuesto por *Shaw et al.*, podemos predecir que las células deficientes en LKB1 no podrían activar AMPK y no serían capaces de adaptarse al estrés entrando así en un estado de crisis metabólica.

Con el fin de alterar el estado metabólico a través de la inhibición de la glicólisis hemos empleado dos estrategias.

##### 2.1.2.2.1- Tratamiento con 2-Deoxy-D-glucosa

La 2-Deoxy-D-glucosa (2-DG) es un inhibidor específico de la glicólisis. Este compuesto es captado por transportadores de glucosa y es fosforilado por la primera enzima de la ruta, la hexoquinasa. La 2-DG fosforilada no podrá ser metabolizada en la glicólisis, actuando como un inhibidor competitivo de la enzima e inhibiendo la vía

## Resultados y Discusión- Objetivo 2

metabólica (Mühlenberg *et al.*, 2015). En este caso, la presencia de LKB1 tampoco dio lugar a una diferencia en el número de células viables tras el tratamiento, observándose una disminución media de, aproximadamente, el 60% en las tres líneas celulares (**Fig. R34B**).

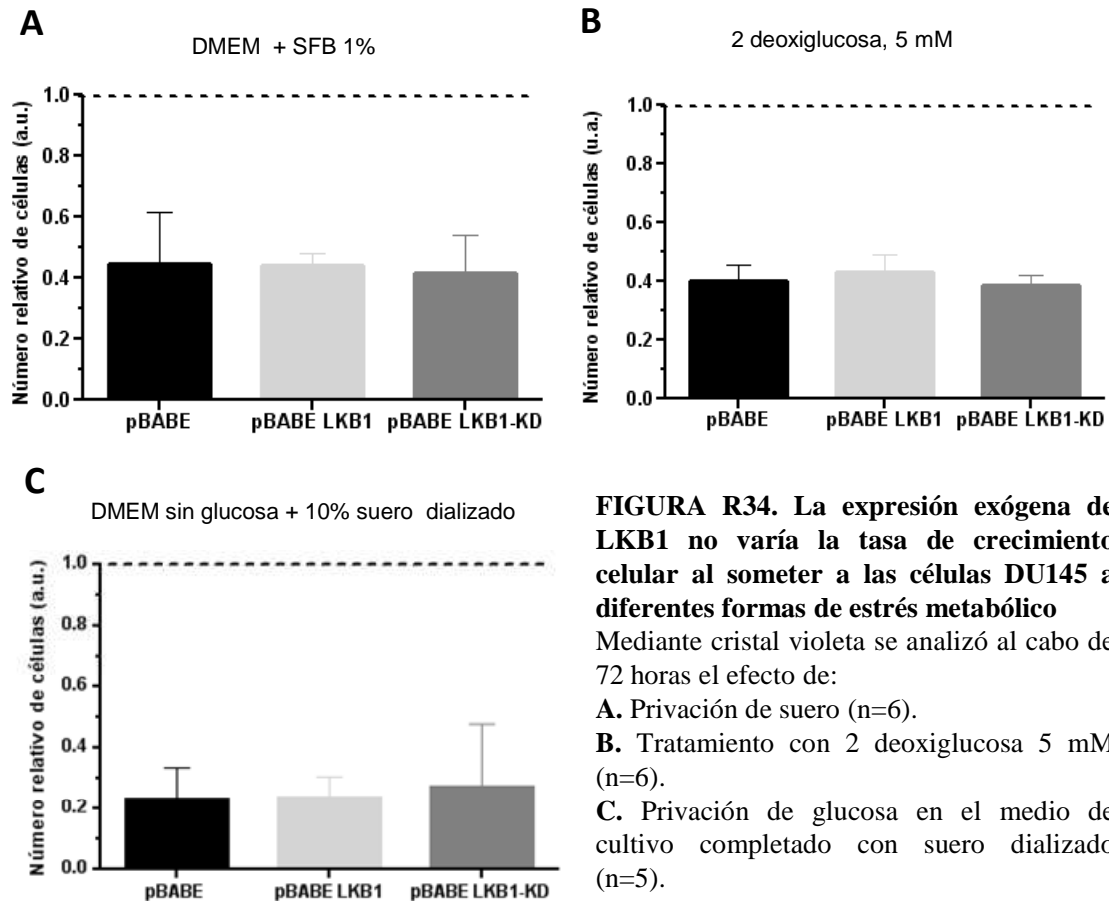
El empleo de concentraciones inferiores de 2DG mediante las que se observaba una disminución del 20% de la densidad celular tampoco reveló diferencias en función de la presencia de LKB1 (datos no mostrados).

### 2.1.2.2.2. Crecimiento en condiciones de privación de glucosa y empleo de suero dializado.

La ausencia de glucosa en el medio hace que la glicólisis se mantenga inhibida mientras que la diálisis del suero reduce significativamente las concentraciones de moléculas pequeñas ( $MW \leq 10$  KDa) disminuyendo los nutrientes y factores de crecimiento disponibles y aumentando en consecuencia el nivel de estrés metabólico (Xie *et al.*, 2014). El empleo de este modelo experimental tampoco reveló ninguna respuesta diferencial (**Fig. R34C**). El descenso en el número de células se mostró independiente de la presencia de LKB1. La comparación con las células control, crecidas en medio con glucosa completado con un 10% de suero, mostró en todos los casos una disminución del número total de células del 80% aproximadamente.

Los resultados obtenidos indican que LKB1, en el contexto del cáncer de próstata, es un biomarcador que predice una respuesta positiva frente al tratamiento con fenformina. Sin embargo no resulta efectivo ante otras terapias basadas en la inducción del estrés energético. En el presente trabajo no hemos confirmado la activación de AMPK ni hemos indagado en el mecanismo que potencialmente la ejecuta tras la inducción del estrés metabólico. Por ello, únicamente podemos especular que la explicación para el efecto observado podría radicar en la capacidad de AMPK de ser activada a través de diferentes mecanismos según el tipo de estímulo recibido por la célula.

El crecimiento de las células en galactosa las hace más dependientes de la fosforilación oxidativa (Dykens *et al.*, 2008). Especulamos que en estas condiciones la presencia de LKB1 pueda tener un reflejo más acusado en la respuesta celular frente las terapias basadas en el estrés metabólico, especialmente en el caso del tratamiento con fenformina.



**FIGURA R34. La expresión exógena de LKB1 no varía la tasa de crecimiento celular al someter a las células DU145 a diferentes formas de estrés metabólico**

Mediante cristal violeta se analizó al cabo de 72 horas el efecto de:

- A.** Privación de suero (n=6).
- B.** Tratamiento con 2 deoxiglucosa 5 mM (n=6).
- C.** Privación de glucosa en el medio de cultivo completado con suero dializado (n=5).

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador de efectividad terapéutica frente terapias basadas en el estrés metabólico

- Comprobar la activación de AMPK en respuesta a los diferentes tratamientos
- Explorar el mecanismo de activación de AMPK y evaluar la implicación de LKB1 tras la inducción
- Evaluar el efecto de la presencia de LKB1 ante el tratamiento con fenformina en las diferentes líneas isogénicas mantenidas en galactosa

Los datos obtenidos indican que LKB1, en el contexto del cáncer de próstata, podría ser un estratificador molecular de efectos moderados. Mostramos datos preliminares sobre su validez para predecir una respuesta positiva frente al tratamiento con fenformina, no así ante otras estrategias terapéuticas basadas en el estrés energético.

### 2.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE LKB1 COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Las posibilidades que ofrece hoy en día la bioinformática, entendida como la aplicación de la tecnología informática a los procesos biológicos, nos ha permitido generar, gestionar y manejar una gran cantidad de datos, especialmente los derivados de tecnologías de alto rendimiento. Las herramientas bioinformáticas pueden incrementar la eficacia en el desarrollo de terapias personalizadas en cáncer, tanto en términos de tiempo como de inversión económica.

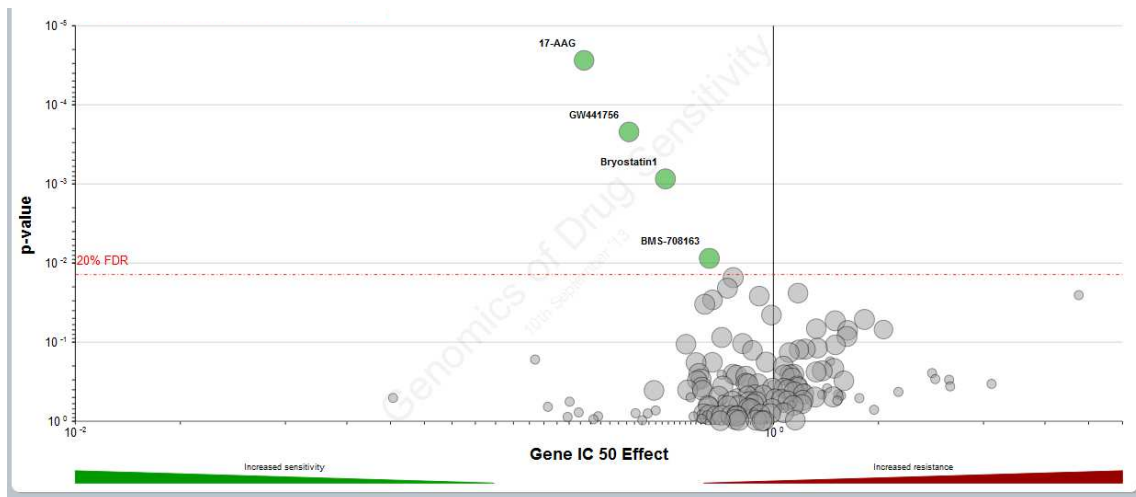
Con el fin de valorar la capacidad de LKB1 como biomarcador terapéutico frente a fármacos aplicados en clínica revisamos la base de datos generada a partir del proyecto “Genómica de la sensibilidad a fármacos en cáncer” (“*Genomics of drug sensitivity in cancer*”) (Garnett et al., 2012). Este proyecto es un programa de investigación académica desarrollado en colaboración entre el Instituto Sanger “Wellcome Trust” y el Centro del Cáncer del hospital general de Massachusetts. Su objetivo consiste en identificar qué características moleculares de los tumores predicen respuesta a agentes citotóxicos. Los autores evalúan el estado mutacional de una serie de genes, entre los que se encuentra LKB1, como marcadores moleculares que dictan sensibilidad a determinados fármacos en células tumorales (Garnett et al., 2012). Estos resultados están en línea con nuestra hipótesis de la aplicación de LKB1 en el desarrollo de terapias dirigidas.

Las bases teóricas de este proyecto radican en el concepto de letalidad sintética aplicado en la terapia contra el cáncer. Este concepto tiene su origen en estudios con *Drosophila melanogaster*, en los cuales la combinación de mutaciones en dos o más genes deriva en la muerte celular (Lucchesi, 1968). En los últimos tiempos la idea de letalidad sintética ha sido explorada en el ámbito del desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos que ataquen de manera selectiva tumores con una mutación genética específica, en la identificación de nuevas dianas terapéuticas y en la caracterización de genes asociados con la respuesta al tratamiento (McLornan et al., 2014).

Tal como hemos indicado, todos los compuestos analizados se aplican en la clínica o están bajo evaluación preclínica, por lo que si se establece que la interacción fármaco-mutación es sintéticamente letal, la terapia podría ser aplicada en un plazo de tiempo reducido. En el estudio se contrasta la respuesta de 662 líneas tumorales humanas frente a 130 fármacos. Para llevar a cabo una descripción multiparamétrica de la sensibilidad al fármaco, incluyendo la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC<sub>50</sub>) y la pendiente de la curva dosis respuesta, se midió el efecto del tratamiento sobre la viabilidad celular a las 72 horas. Con el objetivo de identificar asociaciones entre genes individuales relacionados con el cáncer y la sensibilidad a un fármaco se aplicó el análisis multivariante de la varianza (MANOVA), incorporando los dos parámetros mencionados anteriormente.



Al consultar en esta base de datos qué fármacos podrían resultar más efectivos en tumores nulos para LKB1 (<http://www.cancerrxgene.org/translation/Gene/STK11>), se nos muestra un diagrama de Volcano en el que en el eje X figura el efecto que tiene la mutación sobre la diferencia en la IC<sub>50</sub> y en el eje Y el potencial estadístico de la asociación del fármaco con el estado mutacional de LKB1. Los dos compuestos que mostraban un mayor efecto y una mayor probabilidad eran GW441756, inhibidor selectivo de tirosina quinasa A (TrkA) y 17-AAG, inhibidor de HSP90, proteína de respuesta a choque térmico (**Fig. R35**).



**FIGURA R35. Existe un grupo de fármacos ante los que LKB1 puede actuar como marcador de sensibilidad a la respuesta**

Diagrama Volcano de los resultados analizados con el test estadístico MANOVA mostrando la probabilidad que tiene un fármaco de ser efectivo en tumores que no expresan LKB1. Cada círculo representa el resultado de una única combinación fármaco-gen, y su tamaño el número de líneas celulares analizadas.

MANOVA: Análisis multivariante de la varianza

Razonamos que nuestro modelo celular, basado en la línea DU145 de la que derivamos tres líneas isogénicas, podía resultar adecuado para verificar que la presencia de LKB1 es el factor clave que dictamina la sensibilidad a los fármacos propuestos y validar así su capacidad como marcador de respuesta frente a los mismos en cáncer de próstata.

## Resultados y Discusión- Objetivo 2

### DISEÑO EXPERIMENTAL:

**Objetivo:** Análisis de la viabilidad celular tras 48 horas de tratamiento con fármacos que, junto con la carencia de LKB1, potencialmente inducen letalidad sintética

**Muestras:** Líneas celulares DU145 pBABE, pBABE-LKB1 y pBABE-LKB1 KD

**Compuestos:**

- Inhibidor de TrkA: GW441756 (0,1-10  $\mu$ M)
- Inhibidores de HSP90:
  - 17-DMAG (10-50 nM)
  - Geldanamicina (10-100 nM)

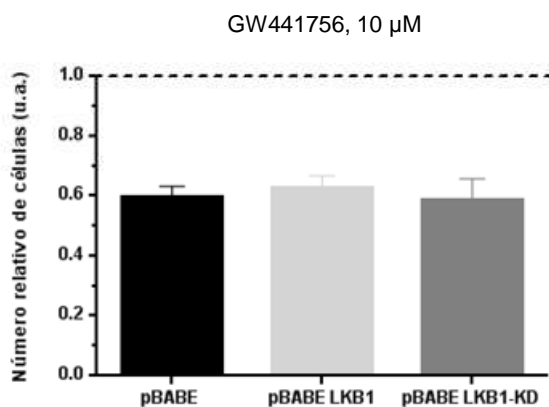
**Metodología:** Ensayo de cristal violeta

**Test estadístico:** T de Student, análisis estadístico asumiendo una cola de distribución

### 2.2.1. Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador predictivo de sensibilidad ante la inhibición de TrkA

TrkA es el receptor del factor de crecimiento neurotrófico (NGF) y su inhibición sensibiliza a las células de cáncer de mama frente a paclitaxel e inhibe la metástasis (Zhang *et al.*, 2015). Para confirmar que la sensibilidad al fármaco era determinada por la presencia de LKB1, las células isogénicas DU145 fueron tratadas durante 48 horas con GW441756 y se determinó el número total de células viables (**Fig. R36**). A la vista de estos resultados, LKB1 no contribuye a una respuesta diferencial frente al tratamiento.

Entendemos que la validez de estas predicciones está condicionada al tejido de origen del cáncer. Por lo tanto, sería recomendable analizar la expresión de TrkA en el tejido prostático ya un bajo nivel de expresión podría justificar los resultados obtenidos.



**FIGURA R36.** La presencia de LKB1 no dicta una respuesta diferencial frente al tratamiento con el inhibidor de tirosina quinasa A (TrkA) GW441756

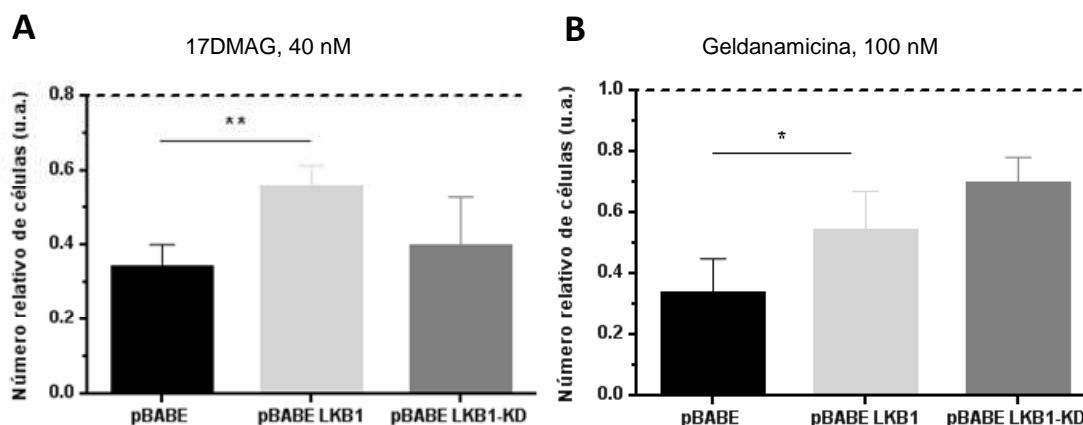
Efecto del tratamiento con GW441756, 10  $\mu$ M sobre el crecimiento celular analizado por cristal violeta a las 48 horas (n=6).

### 2.2.2. Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador predictivo de sensibilidad ante la inhibición de HSP90

HSP90 es una chaperona ubicua y altamente conservada a lo largo de la evolución (*Sreedhar et al., 2004*). Las proteínas chaperonas ayudan en el plegamiento de proteínas inmaduras, lo que proporciona una conformación adecuada y evita la agregación (*revisado en (Young et al., 2001)*). Actúan como moduladores alostéricos y participan en el tráfico intracelular, en la activación/inhibición y en la degradación/estabilización de sus proteínas clientes (*Young et al., 2001*). El grupo de proteínas clientes descrito para HSP90 es muy amplio e incluye gran cantidad de moléculas cuya desregulación se ha visto implicada en la aparición y/o en la progresión del cáncer, tales como v-SRC, BCR-ABL, p53 mutado, ERBB2 (HER-2), AKT, HIF-1 $\alpha$  o B-RAF (*Blagosklonny, 2002*). En base a estudios que muestran que inhibidores de HSP90 inducen la ubiquitinación y la degradación proteasomal de numerosas oncoproteínas (*Stravopodis et al., 2007*), se ha sugerido que la importancia de HSP90 en cáncer radica en promover la estabilidad y la actividad de oncogenes (*Richter and Buchner, 2001*). Estas observaciones han promovido el avance en el desarrollo de inhibidores específicos de HSP90. La geldanamicina, antibiótico producido por levaduras, y su análogo sintético 17-AAG tienen potentes efectos antiproliferativos y apoptóticos en líneas celulares de origen tumoral y en xenografts de células humanas implantadas en ratón (*Tatokoro et al., 2012*). Con el objetivo de mejorar la solubilidad y evitar efectos secundarios tóxicos, se han desarrollado análogos de estos compuestos como el 17-DMAG que es el que utilizaremos en nuestros experimentos.

Las células DU145 que expresaban o no LKB1 funcional fueron tratadas con 17-DMAG y se cuantificó el número total de células viables (**Fig. R37A**). Observamos una respuesta diferencial basada en la presencia de LKB1 funcional, la cual confiere menor sensibilidad al tratamiento. La comparación entre células pBABE y pBABE-LKB1 resulta en una diferencia estadísticamente significativa. Con el objetivo de extender esta observación, evaluamos la respuesta citotóxica a geldanamicina (**Fig. R37B**). De nuevo observamos una mayor sensibilidad ante la inhibición de HSP90 en células carentes de LKB1, estadísticamente significativa con un rango de confianza del 95%. Sorprendentemente, las líneas celulares pBABE y pBABE-LKB1 KD mostraron una clara diferencia en la respuesta al fármaco. Estos resultados sugirieron que la mera presencia de LKB1 podría ser suficiente para provocar una respuesta diferencial frente a geldanamicina, independientemente de su actividad quinasa.

## Resultados y Discusión- Objetivo 2



**FIGURA R37. La presencia de LKB1 puede dictar una respuesta diferencial frente al tratamiento con inhibidores de HSP90**

**A. y B.** Crecimiento celular relativo analizado por cristal violeta tras el tratamiento con 17DMAG, 40 nM (n=4) (A) y con geldanamicina, 100 nM durante 48 horas (n=3) (B).

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

Los datos obtenidos revelan que existe una sensibilidad exacerbada de células deficientes en LKB1 ante la inhibición de HSP90. Curiosamente, este efecto es comparable al de la fenformina, cuyo razonamiento mecanístico está ampliamente justificado. Sería de gran interés determinar el mecanismo de acción implicado en esta respuesta diferencial, y establecer si resulta de un potencial interés clínico para la estratificación de pacientes frente al tratamiento con inhibidores de HSP90.

### PERSPECTIVAS Y MEJORAS EXPERIMENTALES

Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador de sensibilidad ante la inhibición de TrkA

- Realizar un análisis de la expresión de TrkA

Evaluación del potencial uso de LKB1 como biomarcador de sensibilidad ante la inhibición de HSP90

- Comprobar la inhibición de HSP90
- Evaluar la respuesta a inhibidores de HSP90 en células competentes para LKB1 tras su silenciamiento
- Ampliar el estudio realizando el tratamiento con otros inhibidores de HSP90 (Radicicol, Herbimicina A)
- Identificar la proteína cliente involucrada en la sensibilidad frente a la inhibición de HSP90
- Evaluar el efecto diferencial de los inhibidores de HSP90 en nuestras líneas murinas

En resumen, nuestros resultados extienden a cáncer de próstata la observación de que la expresión de LKB1 contribuye a incrementar la respuesta antitumoral ante la fenformina, no así ante otros tratamientos inductores del estrés metabólico. Por otra parte, consideramos significativo haber mostrado que la inhibición de HSP90 puede tener una actividad antitumoral condicionada por la expresión de LKB1. Curiosamente, observamos que frente al tratamiento con geldanamicina el mutante de LKB1 sin actividad catalítica mantiene la capacidad protectora mostrada por la forma salvaje, apuntando la posibilidad de que LKB1 ejerza funciones independientes a las de señalización.

### CONCLUSIONES

**La expresión de LKB1 dicta en cáncer de próstata una respuesta diferencial frente a fenformina**

**Se ha establecido una actividad de similar potencia ante la inhibición de HSP90**



# *Discusión General*







## LKB1 COMO SUPRESOR DE TUMORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA: ESPECULACIONES SOBRE EL MECANISMO

### Haploinsuficiencia, inactivación bialélica y reducción de la expresión de LKB1: Implicación en la progresión tumoral

LKB1 es un gen haploinsuficiente para el desarrollo de PJS en humanos ya que su heterocigosidad se asocia a la aparición de alteraciones características que incluyen el desarrollo de pólipos (hamartomas) gastrointestinales (*Entius et al., 2001*). La haploinsuficiencia también ha sido demostrada en modelos murinos, habiéndose observado que la heterocigosidad sistémica de *Lkb1* se refleja en el desarrollo de pólipos gastrointestinales benignos que retienen la expresión del alelo salvaje (*Rossi et al., 2002*) (*Miyoshi et al., 2002*) (*Bardeesy et al., 2002*). La generación de ratones hipomórficos para LKB1 (*Lkb1<sup>hyp/hyp</sup>*), en los cuales la expresión de LKB1 se reduce aproximadamente 5-10 veces, ha demostrado que LKB1 es un gen haploinsuficiente obligado para el desarrollo de hamartomas ya que los ratones hipomorfos *Lkb1<sup>hyp/hyp</sup>* no desarrollan pólipos intestinales (*Huang et al., 2008*).

En el contexto de la progresión tumoral se ha observado que el hipomorfismo sistémico de *Lkb1* no promueve el desarrollo de lesiones precancerosas (a excepción de linfomas presentes también en animales salvajes) (*Huang et al., 2008*). Sin embargo, la inactivación bialélica condicional de LKB1 da lugar a la transformación neoplásica en un amplio número de tejidos incluyendo pulmón (*Ji et al., 2007*), epidermis (*Liu et al., 2012*) (*Gurumurthy et al., 2008*), páncreas (*Hezel et al., 2008*) glándula mamaria (*McCarthy et al., 2009*), endometrio (*Contreras et al., 2010*) y próstata (*Pearson et al., 2008*). Estas observaciones indican que unos niveles de expresión de LKB1 mínimos son suficientes para mantener la supresión tumoral, mientras que la pérdida completa da lugar a la iniciación del cáncer de una forma dependiente de tejido. En el modelo murino *Lkb1* condicional de próstata generado hasta la fecha las lesiones neoplásicas detectadas son consecuencia de la delección del gen en la práctica totalidad del tracto genito-urinario (**Pearson et al., 2008a**). Por lo que, tal como hemos discutido en el apartado 1.2.1, este modelo no permite determinar el papel de LKB1 como supresor de tumores en la próstata de forma específica.

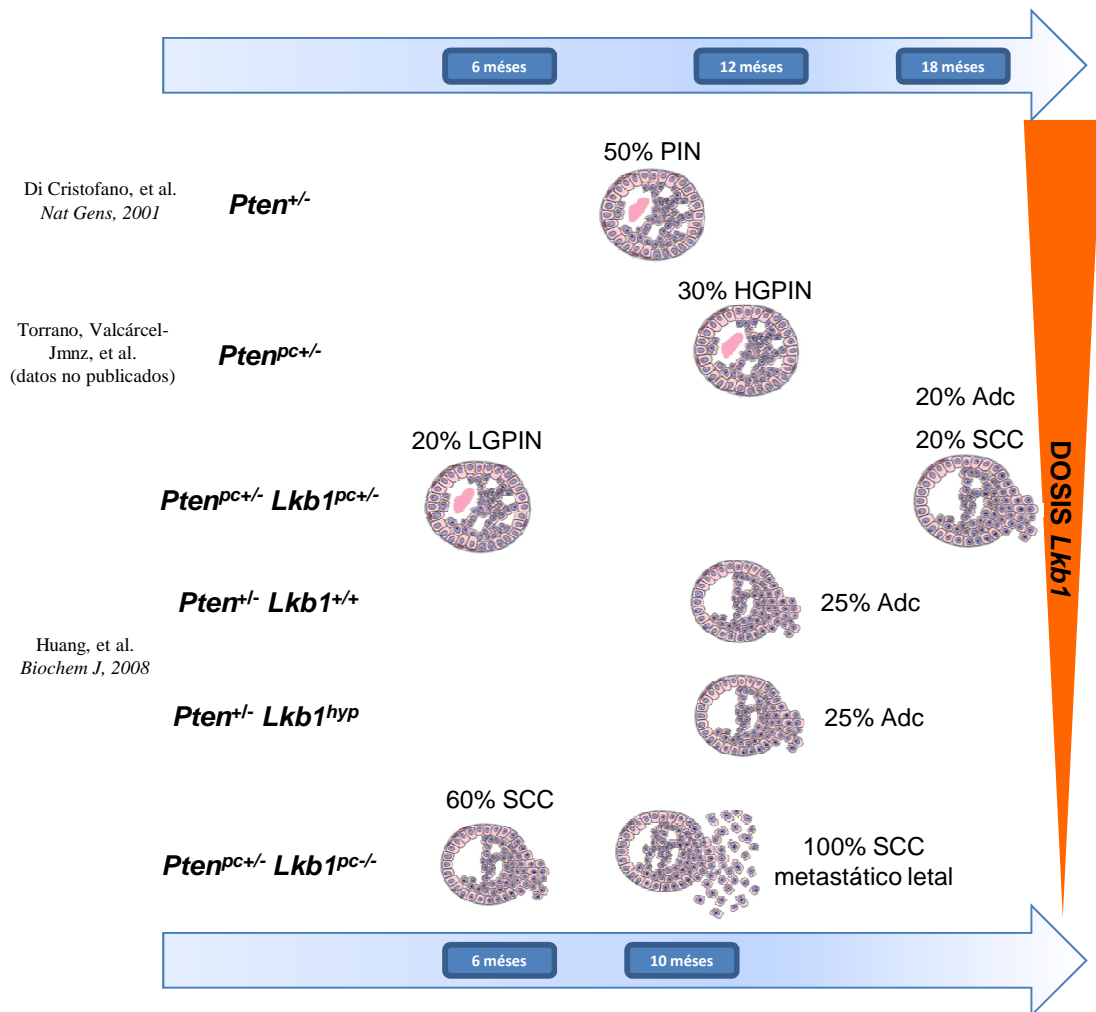
En cáncer de próstata, al igual que estudios anteriores (*Park et al., 2009*), hemos observado que existe un grupo de tumores carentes de la expresión de LKB1 a nivel de proteína así como un descenso en el nivel transcripcional de diferentes cohortes. Estos resultados apuntan la posibilidad de que LKB1 ejerza funciones como supresor de tumores de próstata. Los resultados derivados de la presente tesis indican que la pérdida bialélica de *Lkb1* como único evento genético no da lugar a lesiones neoplásicas, por tanto LKB1 no es un factor determinante en la iniciación del cáncer de próstata.

## Discusión general

Por otra parte hemos estudiado las consecuencias de la pérdida de LKB1 en concurrencia con la haploinsuficiencia de PTEN poniendo de manifiesto la cooperatividad existente entre ambos genes en la supresión del cáncer de próstata. En línea con los resultados obtenidos en la presente tesis, en el cáncer de otros tejidos se ha descrito que la pérdida bialélica de LKB1 coopera con otras alteraciones genéticas en la progresión tumoral, habiéndose demostrado la cooperatividad tanto con genes supresores de tumores (PTEN (Xu et al., 2014) y p53 (Wei et al., 2005)) como con oncogenes (B-Raf (González-Sánchez et al., 2013) y K-ras (Liu et al., 2012) (Ji et al., 2007)). También se ha observado que la dosis de LKB1 puede influir de manera crítica en la susceptibilidad al cáncer (Ji et al., 2007) (Liu et al., 2012). Tanto en cáncer de pulmón como en melanoma se observa que en la progresión tumoral dirigida por la sobreexpresión de K-Ras la hemicigosidad de LKB1 facilita la transformación y la metástasis tumoral mientras que la inactivación bialélica condicional se asocia con un tiempo de latencia más corto y con un espectro histológico diferente característico de tumores diferenciados (Ji et al., 2007) (Liu et al., 2012). Estas observaciones nos hacen pensar que el mecanismo supresor de tumores ejecutado por LKB1 puede depender del contexto tisular y/o de la combinación de alteraciones oncogénicas, alternando entre el modelo que cumple la hipótesis de dos eventos (inactivación bialélica) y el modelo de haploinsuficiencia.

En el contexto del cáncer de próstata el hipomorfismo de *Lkb1* no es suficiente para hacer progresar el cáncer de próstata dirigido por la haploinsuficiencia de *Pten* (genotipo *Pten*<sup>+/-</sup>;*Lkb1*<sup>hyp/hyp</sup>) (Huang et al., 2008). Este dato apunta la posibilidad de que el cáncer de próstata requiera la pérdida de ambos alelos de LKB1 para promover la progresión tumoral. Recordemos que el modelo sistémico murino indica que la haploinsuficiencia de *Pten* (*Pten*<sup>+/-</sup>) da lugar al desarrollo de PIN a los meses con un 50% de penetrancia (Di Cristofano et al., 2001). El modelo condicional de próstata (*Pten*<sup>pc+/-</sup>) generado en nuestro laboratorio ha permitido salvar la letalidad del modelo *Pten*<sup>+/-</sup> debida a la aparición de lesiones linfoproliferativas, revelando que las lesiones PIN no progresan (Torrano and Valcarcel-Jimenez datos no publicados y datos preliminares de esta tesis doctoral), o dan lugar a cáncer con poca penetrancia y larga latencia (como se demuestra en el genotipo analizado a 18 meses *Pten*<sup>pc+/-</sup>;*Lkb1*<sup>pc+/-</sup>) (Esq. D1). En línea con estas observaciones, los resultados obtenidos en la presente tesis indican que la haploinsuficiencia combinada de *Pten* y *Lkb1* es indistinguible del fenotipo tumoral observado en animales *Pten*<sup>pc+/-</sup>. Los resultados obtenidos muestran una mayor penetrancia de las lesiones debido a la posibilidad de realizar un estudio de mayor longevidad. La haploinsuficiencia de *Lkb1*, al igual que el hipomorfismo, no se refleja en la aceleración de la progresión tumoral ni en una mayor agresividad del fenotipo resultante (Huang et al., 2008) (Esq. D1). Sin embargo la pérdida bialélica de *Lkb1*, en combinación con la haploinsuficiencia de *Pten*, facilita la transformación y la metástasis tumoral asociándose con una letalidad temprana e invariablemente con el desarrollo de cáncer de células escamosas. Estos resultados indican la haploinsuficiencia de *Pten* no altera el modelo de dos eventos observado en la supresión tumoral ejecutada por *Lkb1*, ya que la progresión tumoral se acelera únicamente en caso

de la pérdida completa. Estos resultados su conjunto apuntan la posibilidad de que pérdida bialélica de LKB1 sea el mecanismo favorecedor de la progresión tumoral y no la disminución de su expresión (**Esq. D1**).



**Esquema D1: Implicación del nivel de expresión de *Lkb1* en cooperación con la haploinsuficiencia de *Pten* sobre la agresividad del cáncer de próstata murino**

Se indican los estudios de referencia, el genotipo y el fenotipo observado en la próstata en relación a la edad del ratón

PIN: Neoplasia intraepitelial de próstata; HGPIN: PIN de alto grado; LGPIN: PIN de bajo grado; Adc: Adenocarcinoma de próstata; SCC: Cáncer de células escamosas

Diferentes estudios demuestran que los modelos que presentan heterocigosis (sistémica o condicional) para LKB1 retienen la expresión del alelo salvaje (*Rossi et al., 2002*) (*Ji et al., 2007*) (*Wei et al., 2005*). Lo cual también se ha descrito en material derivado de pacientes con PJS (*Sato et al., 2001*). Estas observaciones sugieren que LKB1 es un gen haploinsuficiente para el desarrollo de pólipos y apuntan la posibilidad de que la pérdida bialélica de LKB1 pueda facilitarle al tumor la adquisición de algún tipo de ventaja selectiva adicional. La caracterización histológica de nuestro modelo doble heterocigoto a diferentes tiempos muestra la diferenciación progresiva a cáncer de células escamosas, llegando a representar el 50% de los tumores examinados (20% de

## Discusión general

las muestras). La pérdida completa revela la progresiva e invariable diferenciación hacia cáncer de células escamosas, letal a los 10 meses (**Esq. D1**). Estos resultados se encuentran en línea con estudios anteriores que han revelado la posibilidad de que *Lkb1* ejerza funciones en la diferenciación tumoral, apuntando la tipología tumoral de tipo escamosa (*Ji et al., 2007*) (*Liu et al., 2012*) (*Xu et al., 2014*) (*Esteve-Puig et al., 2014*) (*Gurumurthy et al., 2008*). Los resultados obtenidos en la presente tesis apuntan a que la pérdida bialélica de LKB1 podría determinar el desarrollo de cáncer de células escamosas, caracterizado por su alta agresividad y capacidad de metastatizar.

Por lo tanto, en el tejido prostático el mecanismo de pérdida de expresión de LKB1 influye sobre el fenotipo tumoral. Los resultados obtenidos en la presente tesis sitúan a LKB1 entre los genes supresores de tumores que tienen que perder ambos alelos para permitir la progresión tumoral. Estos genes, que cumplen la hipótesis de dos eventos (*two-hit hypothesis*), plantean un modelo discreto de supresión tumoral en el que únicamente la pérdida bialélica permite la progresión del cáncer (*Knudson, 1971*). En el contexto del cáncer de próstata se ha demostrado que PTEN sigue un modelo de supresión tumoral continuo en el cual cambios mínimos en su nivel de expresión se reflejan en el fenotipo resultante (*Trotman et al., 2003*) (*Berger et al., 2011*). Cabe destacar la cooperatividad demostrada entre los diferentes mecanismos de supresión tumoral que concurren en la próstata.

### Importancia y dificultades de la evaluación de los genes supresores de tumores como biomarcadores pronósticos

En el campo de la oncología clínica es muy importante identificar marcadores moleculares para la evaluación de la prognosis de los pacientes con cáncer. Por lo tanto, a lo largo de los últimos años se ha investigado ampliamente y se han establecido asociaciones entre alteraciones oncogénicas en células tumorales y la prognosis de los pacientes en diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, la amplificación del oncogen N-myc actualmente está disponible para pacientes con neuroblastoma (*Brodeur et al., 1984*) (*Seeger et al., 1985*) y la amplificación/sobreexpresión del oncogen HER-2 es también un marcador de agresividad en cánceres de ovario y de mama (*Slamon et al., 1987*) (*Slamon et al., 1989*). También habría que considerar la inactivación por metilación un mecanismo de alteración génica tumoral. Asimismo deberíamos considerar que el significado biológico de las diferentes mutaciones en un mismo gen supresor de tumores podría ser distinto en función del tipo de cáncer. Los resultados obtenidos en el presente trabajo apuntan a la posibilidad de que en el contexto del cáncer de próstata no todas las mutaciones de LKB1 reduzcan el potencial supresor. Nuestros resultados muestran además que el mecanismo de pérdida de expresión incide sobre el fenotipo tumoral resultante, por lo tanto para realizar un pronóstico correcto en este caso no sería suficiente con la evaluación del nivel de expresión habría que conocer también el mecanismo mediante el cual se ha perdido. Por lo tanto, con el objetivo de establecer un

pronóstico en base al análisis de genes supresores de tumores es importante dilucidar de una forma crítica la asociación de fenotipos tumorales con sus genotipos tumorales.

### Cooperación LKB1-PTEN en la supresión tumoral, ¿es una convergencia de vías?

La mutación de LKB1 en la línea germinal provoca el desarrollo de PJS, pero existen más síndromes humanos caracterizados por el desarrollo de hamartomas (revisado en Jelsig et al., 2014). Entre ellos, la enfermedad de Cowden y la esclerosis tuberosa presentan un fenotipo muy similar al PJS (Stojcev et al., 2013). Estos síndromes son causados por mutaciones inactivantes germinales en los genes supresores de tumores PTEN y TSC1 o TSC2 respectivamente. Los cuatro genes (PTEN, LKB1, TSC1 y TSC2) actúan regulando negativamente la misma ruta de señalización, mTORC1, que permite la adaptación celular ante la variación de los niveles de factores de crecimiento y de nutrientes (revisado en Dibble and Manning, 2013). En el desarrollo tumoral se ha observado que la inactivación de TSC1 y TSC2 y de PTEN se asocian con una elevada actividad de mTOR (revisado en Manning and Cantley, 2003) (Cantley and Neel, 1999). La deficiencia de LKB1 también provoca la activación aberrante de la vía mTORC1 tanto *in vitro*, como en pólipos gastrointestinales derivados de modelos murinos heterocigotos (*Lkb1<sup>+/-</sup>*) (Shaw et al., 2004). Estas observaciones han llevado a plantear que la desregulación de la vía mTORC1, donde convergen las rutas de señalización controladas por los supresores de tumores, es la responsable del desarrollo de pólipos y de la tendencia a desarrollar cáncer característica de las alteraciones genéticas citadas.

El modelo murino generado en la presente tesis, *Pten<sup>pc+/-</sup> Lkb1<sup>pc-/-</sup>*, permite constatar que la pérdida combinada de ambos genes es sinérgica a favor de la progresión del cáncer de próstata. La pérdida completa de LKB1 revela que el mecanismo de supresión tumoral ejercido en la próstata incluye la inhibición de la adquisición de capacidades metastáticas, mientras que la vía mTORC1 ejerce sus funciones en el control del crecimiento y de la proliferación celular (Laplante and Sabatini, 2012). Recordemos que los tumores deficientes para PTEN en la próstata son adenocarcinomas no metastáticos (Gray et al., 1998) (Trotman et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la pérdida bialélica de LKB1 provoca el desarrollo de cáncer de células escamosas altamente invasivo, sugiriendo la acción de vías independientes. El modelo murino *Pten<sup>pc+/-</sup> Lkb1<sup>pc+/-</sup>* generado en la presente tesis presenta un 40% de lesiones cancerosas en las cuales se observa la presencia de adenocarcinomas y de cáncer de células escamosas a partes iguales. Sin embargo queda patente que la pérdida completa de LKB1 en este modelo predispone invariablemente a la aparición de cáncer de células escamoso, el cual se diferencia en función de la progresión tumoral (**Esq. D1**). Estos resultados plantean la posibilidad de que la pérdida de heterocigosidad de *Lkb1* pudiera detectarse en el 20% de los SCC identificados en el modelo doble

## Discusión general

heterocigoto. La validación de esta especulación se encontraría en línea con el modelo mecanístico planteado en base a los resultados obtenidos en la presente tesis. Según esta nueva hipótesis la pérdida bialélica de *Lkb1* podría comprometer la diferenciación tumoral hacia una tipología escamosa. En línea con nuestros resultados, modelos murinos en cáncer de pulmón han permitido demostrar que la pérdida bialélica de LKB1 y PTEN desarrolla sistemáticamente tumores con características escamosas (*Xu et al., 2014*). La diferenciación hacia cáncer de tipo escamoso también se ha observado en la progresión tumoral de pulmón y piel, en el contexto de la inactivación bialélica de *Lkb1* concurrente con la activación oncogénica de *K-Ras* (*Ji et al., 2007*) (*Liu et al., 2012*). La convergencia de resultados independientemente del contexto genético adicional apunta a que la pérdida completa de *Lkb1* derive en la ejecución de un mecanismo independiente a *Pten*. Por otra parte, estudios previos han revelado que la heterocigosidad sistémica de LKB1 sensibiliza ante el tratamiento con carcinógenos determinando la aparición de cáncer de células escamosas de piel (*Gurumurthy et al., 2008*) (*Esteve-Puig et al., 2014*). Uno de estos estudios demuestra además que el tumor pierde el alelo salvaje de LKB1, lo cual sugiere que con el objetivo de permitir la progresión tumoral es necesaria la inactivación bialélica (*Gurumurthy et al., 2008*). También se ha observado que la delección genética de IKK $\alpha$ , inhibidor de la vía NF $\kappa$ B, provoca mediante la regulación negativa de la expresión de LKB1 el desarrollo de carcinomas de células escamosas de pulmón (*Xiao et al., 2013*). Los resultados derivados apuntan la posibilidad de que la pérdida de LKB1 pueda ser uno de los mecanismos que determine el desarrollo de cáncer de células escamosas, cuestión que no podemos analizar mediante los estudios basados en la delección genética. La convergencia de estos resultados nos lleva a pensar que la inactivación bialélica de LKB1 determina la tipología tumoral a favor del desarrollo de cáncer de células escamosas. Por otra parte, observamos que el hipomorfismo de *Lkb1* en el contexto de la haploinsuficiencia de *Pten* no se refleja en la aparición de tumores de histología escamosa. El análisis comparativo entre los fenotipos presentes en animales hipomórficos y en animales expuestos a la delección de alelos apunta la posibilidad de que el mecanismo responsable de la diferenciación tumoral pueda ser la pérdida de alélica de *Lkb1* y no la disminución de sus niveles de expresión (**Esq. D1**).

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que la delección de LKB1 como único evento genético no induce la formación de tumores, sugiriendo que la pérdida combinada de PTEN y de LKB1 facilita la adquisición de capacidades oncogénicas complementarias que permiten la progresión tumoral. Especulamos que la concomitancia de la pérdida bialélica de LKB1 y otro insulto oncogénico (exposición a carcinógenos y/o alteraciones genéticas en supresores de tumores y oncogenes) determina el desarrollo de cáncer de células escamosas de una forma independiente a PTEN.

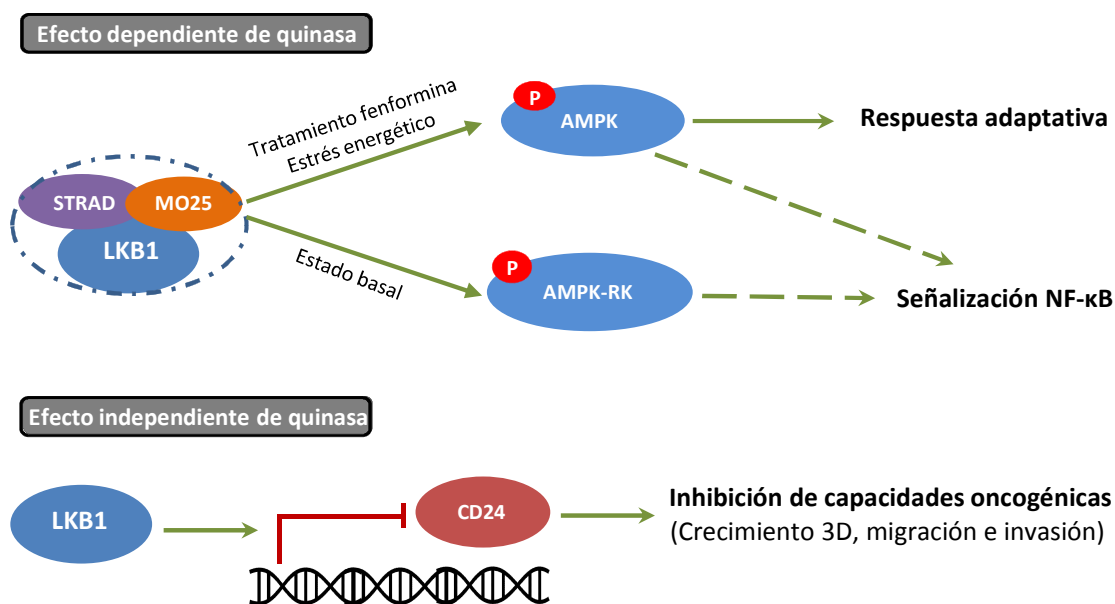
## EFFECTO INDEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE LKB1: IMPLICACIONES Y ESPECULACIONES SOBRE EL MECANISMO

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que, en el contexto del cáncer de próstata, LKB1 tiene funciones independientes a las de su actividad como quinasa. Dichas funciones se reflejan a nivel transcripcional en la regulación negativa de la expresión de CD24. En línea con nuestros resultados, estudios anteriores han implicado a LKB1 en la regulación transcripcional de genes dependientes de p53 (*Tiainen et al., 2002*) (*Cheng et al., 2009*). Es más, LKB1 ha sido identificado junto con AMPK y p53 en un complejo unido a la cromatina en las regiones promotoras de los genes diana de p53, p21 y CPT1c. Tanto la fosforilación de p53 como la de la histona 2B han sido propuestos como mecanismos de control de la transcripción génica (*Bungard et al., 2010*).

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que el mutante K78I, sin actividad catalítica, retiene algunas capacidades supresoras de tumores mostradas por la forma salvaje. La mutación K78I, descrita en *Xenopus laevis*, afecta al lugar de unión del ATP de la proteína (*Mehenni et al., 1998*), anulando su capacidad de autofosforilación (*Su et al., 1996*). Para explicar el potencial mecanismo de acción proponemos un modelo en el cual la formación del heterotrímero LKB1:STRAD:MO25 podría desempeñar un papel en la regulación de las funciones de LKB1 dependientes e independientes de su actividad quinasa. Estudios previos han demostrado que la formación del complejo es la responsable de la actividad quinasa de LKB1 (*Zeqiraj et al., 2009*). LKB1 acomplejada puede ejecutar su actividad dependiente de quinasa. Los resultados obtenidos de la presente tesis indican esta actividad en cáncer de próstata se refleja tanto en estado basal (activación de la vía NFκB) como en situaciones de estrés energético (activación ante el tratamiento con fenformina). Con el objetivo de explicar los resultados referentes a la actividad independiente de quinasa, planteamos que el conjunto de moléculas de LKB1 no unidas a MO25 y STRAD podría ser responsable de los efectos observados. Proponemos que sus funciones no catalíticas podrían deberse a su implicación en el control transcripcional génico, potencialmente mediante la regulación negativa de CD24. La inhibición transcripcional de CD24 podría explicar los efectos observados en la supresión de ciertas capacidades oncogénicas (formación de colonias en condiciones independientes de anclaje, migración e invasión). Estudios previos relacionan CD24 con el mantenimiento de las características de las células madre en la oncogénesis de diversos tejidos (*Vesuna et al., 2009*) (*Lim et al., 2014*) (*Gao et al., 2010*), apoyando la posibilidad de que la diferencia observada en la capacidad clonogénica sea debida a la regulación negativa de CD24. La implicación de CD24 en la diferenciación de las células madre del cáncer le convierte en un potencial candidato a explicar la aparición de tumores de tipo escamoso. La expresión de CD24 se

## Discusión general

encuentra regulada específicamente en la población de células madre de este tipo de cáncer (Han et al., 2014) (Todoroki et al., 2016). CD24 también ha sido propuesto como biomarcador de pronóstico en cánceres escamosos de diversos tejidos (Sano et al., 2009) (Shi et al., 2012). Estas observaciones plantean la posibilidad de que la pérdida bialélica de LKB1, a través de la regulación de CD24, potencialmente influya en la elección del linaje de las células progenitoras del cáncer. Por otra parte observamos que la presencia de LKB1 se refleja en la reducción del tamaño de las colonias formadas en ausencia de anclaje, sugiriendo que en estas condiciones LKB1 podría desempeñar algún papel en regulación de la proliferación tumoral, cuestión que potencialmente también podría ser explicado mediante la regulación de CD24. (Esq. D2).



### Esquema D2: Modelo propuesto para la regulación de la actividad dependiente e independiente de quinasa observada en la supresión tumoral de la próstata

Los conectores rojos indican inhibición y los verdes activación. Las flechas punteadas indican potenciales vías de activación

LKB1 posee una región NLS (residuos 38-43) y ha sido localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma de diversas líneas celulares (Tiainen et al., 1999) (Marignani et al., 2001) (Karuman et al., 2001). Se han descrito además varios mecanismos para la regulación de la localización celular de LKB1 (Liu et al., 2012) (Zhan et al., 2012) (Dorfman and Macara, 2008). De entre ellos, por la relevancia en nuestro sistema celular, cabe destacar el descrito en la línea DU145 donde se ha observado que STRAD $\alpha$  regula la localización de la quinasa. Análisis comparativos entre la actividad quinasa observada tras la expresión ectópica de LKB1 en células deficientes (HeLa) y la actividad de la proteína endógena en células competentes (HEK293) indican que la actividad de LKB1 depende ampliamente de la disponibilidad de MO25 y/o STRAD (Hawley et al., 2003). STRAD $\alpha$  se ha descrito como inestable si no está unido a LKB1 (Hawley et al., 2003) pero cabe la posibilidad de que este



parámetro se encuentre alterado en cáncer de próstata. En células HeLa (deficientes para LKB1) se ha descrito que en ausencia de LKB1 no expresan STRAD pero la expresión ectópica de LKB1 induce su expresión (*Hawley et al., 2003*). A su vez, estudios comparativos en las líneas celulares HeLa y LS174T-W4 (carentes de expresión inherente de LKB1 pero inducible con doxiciclina (*Baas et al., 2004*)) han mostrado que LKB1 se localiza en el núcleo si se expresa en ausencia de MO25 y STRAD. Sin embargo, la co-expresión con STRAD $\alpha$  hace que la quinasa se relocalice al citoplasma (*Baas et al., 2004*) (*Boudeau et al., 2003*) (*Dorfman and Macara, 2008*). Estos resultados sugieren que el transporte núcleo-citoplasma juega un papel en la regulación de las funciones de LKB1. En línea con este razonamiento se han detectado 12 mutantes de LKB1 en pacientes con PJS que no interactúan con STRAD y son nucleares constitutivos (*Boudeau et al., 2004*). Desconocemos el nivel de expresión de STRAD en nuestro sistema celular así como si este incrementa en presencia de LKB1. Aunque hemos generado un sistema celular con un nivel de sobre-expresión de LKB1 equiparable al endógeno, especulamos que la expresión ectópica de LKB1 podría acomplejar la totalidad de las moléculas de STRAD presentes. De esta manera el conjunto de moléculas de LKB1 libres potencialmente podría translocarse al núcleo, donde estaría en disposición de ejercer funciones independientes a las de su actividad como quinasa. En este caso, la deregulación de la estequiometría del complejo LKB1:MO25:STRAD y la consecuente alteración en la localización celular de LKB1 podría ser el mecanismo de acción responsable de la supresión tumoral dependiente de LKB1 KD. En línea con este razonamiento proponemos analizar el nivel de expresión, la estabilidad y la localización celular de STRAD en nuestro sistema celular, así como la localización de LKB1 y si ésta varía en caso de la co-expresión con STRAD. De todas formas, observamos que la regulación de Cd24 en función de la presencia de *Lkb1* se mantiene en el modelo empleado para los estudios *in vivo*, lo cual nos conduce a razonar que el modelo celular empleado no presenta artefactos. El mantenimiento de la regulación LKB1-CD24 *in vivo* sugiere que la hipótesis planteada en base a la función nuclear de *Lkb1* podría ser correcta ya que en situaciones de expresión endógena *Lkb1* mantiene funciones atribuidas a su capacidad independiente de quinasa. Aunque al carecer de datos derivados de la expresión de LKB1 KD *in vivo* no podemos determinar su validez.

En una familia con PJS se ha detectado la mutación SL26 (*Hemminki et al., 1998*). Este mutante es incapaz de unirse a STRAD y es nuclear constitutivo (*Nezu et al., 1999*) (*Baas et al., 2003*) pero retiene la capacidad catalítica de LKB1 (*Nezu et al., 1999*). SL26 es incapaz de mediar en el arresto del ciclo celular dependiente de LKB1 (*Baas et al., 2003*), sugiriendo que esta función está supeditada a su localización citoplasmática. Con el objetivo de evaluar la implicación de la localización celular de LKB1 sobre el mecanismo de acción llevado a cabo por el mutante K78I sería interesante analizar el fenotipo exhibido por el mutante SL26 en nuestro sistema celular. Si ambas formas (K78I y SL26) resultan fenocopias podríamos atribuir los resultados obtenidos a la localización nuclear de LKB1. Esta observación abriría las puertas a la posibilidad de que las mutaciones que inactivan el dominio quinasa de LKB1 no sean

## Discusión general

las únicas que retienen parcialmente la capacidad supresora de tumores mostrada por la forma salvaje.

Cabe destacar que el mutante K78I presenta un comportamiento diferencial en nuestro sistema celular respecto a otros modelos de estudio de cáncer donde ha sido estudiado tales como pulmón (*Ji et al., 2007*) y melanoma (*Chan et al., 2014*). En el cáncer de estos tejidos no se ha llegado a publicar que el mutante de LKB1 K78I ejerza funciones en la supresión tumoral. Además el análisis del perfil transcripcional regulado por la presencia de LKB1 realizado en pulmón muestra que la regulación de *Cd24* es dependiente de la forma salvaje de *Lkb1* no así del mutante sin actividad catalítica (*Ji et al., 2007*), apuntando a una función dependiente de tejido. Por otra parte, las mutaciones inactivantes de LKB1 son un evento frecuente en otros tipos de cáncer (*revisado en Alessi et al., 2006*) (*Sanchez-Céspedes et al., 2002*), no así en los tumores de próstata. En base a estas observaciones especulamos que el fenotipo de supresión tumoral mostrado por la forma mutante pueda ser exclusivo de la próstata.

Por otra parte, en el contexto del cáncer de próstata no se detectan mutaciones en el gen (*Boudeau et al., 2003*). Sin embargo, tanto estudios anteriores (*Park et al., 2009*), como los resultados obtenidos en la presente tesis permiten observar la reducción de la expresión de LKB1 a nivel de proteína. Los resultados obtenidos del estudio de la actividad independiente de quinasa de LKB1 revelan que un mutante sin actividad catalítica retiene la capacidad supresora de tumores mostrada por la forma salvaje. Estas observaciones podrían explicar por qué durante el desarrollo del cáncer de próstata se selecciona el descenso en los niveles de expresión de la proteína frente a las mutaciones como mecanismo favorecedor de la progresión tumoral. En cuanto al mecanismo ejecutado para reducir la expresión, especulamos que el cáncer de próstata selecciona la inactivación bialélica de LKB1, tal como desarrollábamos en el apartado 1 de la discusión. En base a los datos obtenidos en el presente trabajo cabe destacar la posibilidad de que la frecuencia de la pérdida de LKB1 en cáncer pueda incrementar con respecto a estudios previos en caso de limitar el análisis a tumores de tipología escamosa.

## LKB1 COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA

### LKB1 como biomarcador predictivo de efectividad terapéutica frente a terapias basadas en la activación de AMPK

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que LKB1, en el contexto del cáncer de próstata, es un biomarcador válido para predecir una respuesta positiva frente al tratamiento con fenformina, no así ante otras terapias basadas en el estrés energético.

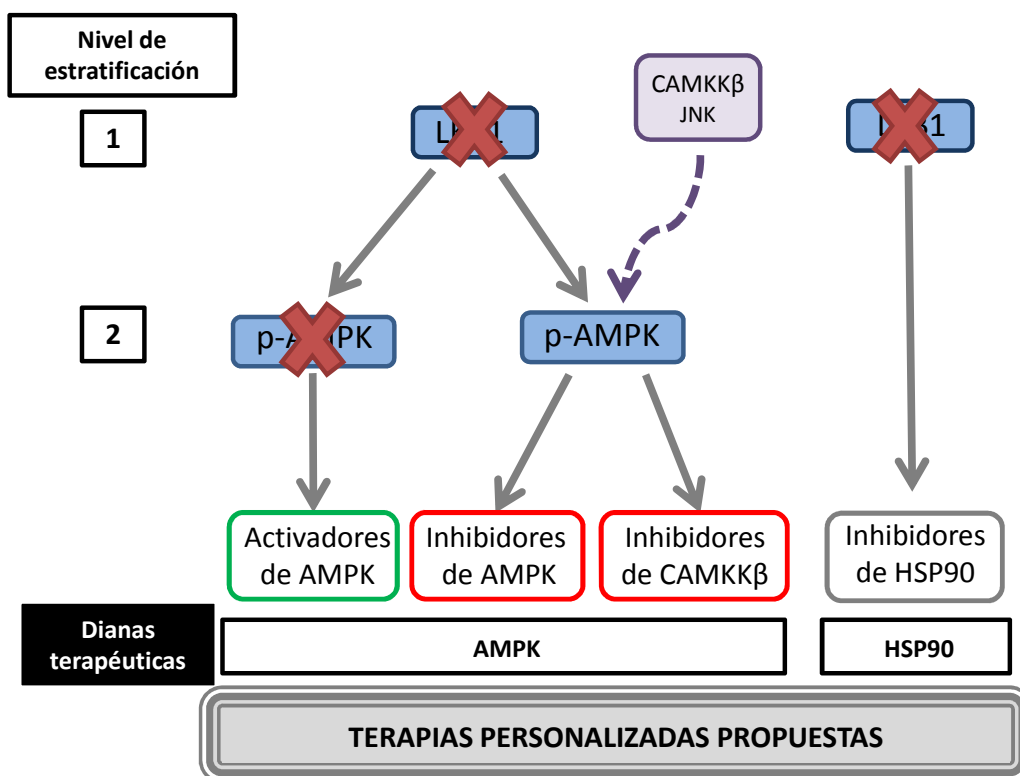
Tal y como demuestran estudios previos, las células que carecen de LKB1 son más sensibles a la apoptosis inducida por agentes que limitan la generación de ATP (*Shaw et al., 2004*). En cáncer de próstata observamos que el tratamiento con fenformina en células carentes de LKB1 tiene un efecto diferencial citostático y no proapoptótico, en contraposición a lo observado en cáncer de pulmón (*Shackelford et al., 2013*). Por tanto especulamos que su empleo en clínica como terapia para tumores de próstata carentes de expresión de LKB1 podría depender de su potencial cooperatividad con otros fármacos en la promoción de la apoptosis selectiva en este contexto.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo indican que LKB1, en el contexto del cáncer de próstata, es un biomarcador válido para predecir una respuesta positiva frente al tratamiento con fenformina, no así ante otras terapias basadas en el estrés energético. La explicación para estos resultados puede radicar en la capacidad de activación de AMPK a través de diferentes mecanismos según el tipo de estímulo recibido por la célula (*Li et al., 2013*) (*Ramírez-Peinado et al., 2011*) (*Aykin-Burns et al., 2009*). Sin embargo, no se ha descrito el mecanismo que actúa en células de cáncer de próstata. En el caso de la fenformina el único mecanismo que se conoce para la activación de AMPK tras el tratamiento es el incremento en los niveles de AMP intracelular que se une a AMPK permitiendo su activación (*Hawley et al., 2010*) (*Dykens et al., 2008*). Es posible que LKB1 sea indispensable en la activación de AMPK en respuesta al cambio en los niveles de AMP mientras que en respuesta a otros tipos de estrés metabólico es puedan que existir otras quinasas capaces de cumplir esta función como CAMKK $\beta$  (*Xi et al., 2013*), c-JUN (*Yun et al., 2005*) o DNA-PK (*Amatya et al., 2012*).

Las evidencias recogidas por este y otros trabajos, nos llevan a formular un modelo de clasificación de tumores que nos ayude a decidir la terapia adecuada en base a la respuesta prevista. En este modelo se propone a LKB1 como marcador que, en un primer nivel de estratificación, discrimina entre tumores con diferentes estrategias moleculares. Creemos que en el caso del tejido prostático es importante la estratificación en base a marcadores adicionales y proponemos como segundo marcador el grado de activación de AMPK, basando este razonamiento en 3 observaciones: i) a la luz de nuestros resultados, el tratamiento con fenformina no produce la apoptosis selectiva en células deficientes para LKB1, tal como esperaríamos de un biomarcador terapéutico, aunque disminuye su proliferación; ii) en ratones condicionales del tracto genito-urinario deficientes para LKB1 se ha observado un alto nivel de AMPK activo en las neoplasias epiteliales resultantes (*Pearson et al., 2008*), lo cual sugieren que LKB1 puede no ser el principal regulador de AMPK en la próstata; iii) mediante análisis inmunohistoquímico se ha observado que existe un grupo de tumores de próstata en los que los niveles de fosforilación de AMPK son muy elevados (*Park et al., 2009*), siendo propuesto como factor de supervivencia tumoral. Se ha observado además el papel positivo que AMPK juega en el desarrollo del cáncer de próstata ya que su activación promueve el crecimiento celular (*Chhipa et al., 2010*) y su inhibición reduce la supervivencia (*Park et al., 2009*).

## Discusión general

En el tratamiento de cáncer de próstata, la actual investigación está dirigida principalmente al desarrollo de fármacos que potencian la activación de AMPK pero en base a los estudios que revelan un papel oncogénico de AMPK esta estrategia debería ser reconsiderada. En células tumorales de pulmón también se ha observado que AMPK puede exhibir un papel positivo en la progresión tumoral. El estudio demuestra que en condiciones de estrés de energía y de estrés provocado por pérdida de adherencia, la activación de AMPK ayuda a mantener los niveles de NADPH, atenuando el estrés oxidativo mediante la regulación del equilibrio entre síntesis y oxidación de ácidos grasos facilitando y así la adaptación y supervivencia celular (Jeon *et al.*, 2012). En estas condiciones de estrés la hiperactivación basal de AMPK podría ayudar al desarrollo tumoral. Especulamos la activación farmacológica de AMPK produce un efecto citoestático (Zadra *et al.*, 2014).



**Esquema D3: Niveles de estratificación sugeridos y potenciales soluciones terapéuticas propuestas en el tratamiento de tumores de próstata deficientes para LKB1**

En azul se muestran los marcadores moleculares y en morado las quinasas que se han propuesto como activadoras de AMPK en ausencia de LKB1. La flecha punteada indica una posible vía de activación aberrante en cáncer de próstata

Creemos que si queremos desarrollar terapias efectivas que ataquen selectivamente los tumores deficientes para LKB1 tenemos que determinar también el grado de activación de AMPK. En caso de observar un bajo grado de activación puede ser conveniente el tratamiento combinado con fenformina ya que en ese escenario la ausencia de LKB1 podría sensibilizar a las células frente al fármaco. Si el grado de

activación de AMPK es alto en el tumor, incluso en ausencia de LKB1, las células serán capaces de detectar el cambio en los niveles energéticos, ya que otra quinasa cumple esta función posibilitando la adaptación. Esta terapia podría incluso resultar beneficiosa para el tumor ya que le podría ayudar a vencer el estrés oxidativo. La opción indicada podría consistir en el tratamiento con inhibidores de AMPK o con inhibidores de las proteínas candidatas a suplir la función de LKB1. De entre las quinastas propuestas en la bibliografía CAMKK $\beta$  es la que soporta un mayor número de evidencias, por lo que pensamos que sería interesante explorar el uso de inhibidores específicos de CAMKK $\beta$ , como STO-609 que tengan utilidad clínica y comprobar si en el contexto de cáncer de próstata también muestra los efectos antitumorales observados en otros tejidos (*Jeon et al., 2012*). Otro candidato a considerar en nuestro contexto tisular sería JNK que en células DU145 ha demostrado ser capaz de activar AMPK (*Yun et al., 2005*) **(Esq. D3)**.

Las células deficientes en LKB1 exhiben una mayor sensibilidad ante la inhibición de HSP90, lo que le convierte en una potencial diana terapéutica para el tratamiento de tumores de próstata carentes de LKB1 **(Esq. D3)**. Discutiremos a continuación el potencial mecanismo y la implicación de la inhibición de HSP90 en ausencia de LKB1.

### **LKB1 como biomarcador predictivo de efectividad terapéutica frente a fármacos basados en la inhibición de HSP90**

Los ensayos basados en la inhibición de HSP90 muestran que la ausencia de LKB1 se refleja en una mayor sensibilidad al tratamiento. En el caso de la geldanamicina se observa un claro efecto independiente de la actividad quinasa de LKB1.

Actualmente existen varios ensayos clínicos que caracterizan el potencial de compuestos inhibidores de HSP90 como fármacos antitumorales (*Sidera and Patsavoudi, 2014*). Sería interesante estudiar su efecto sobre tumores carentes de LKB1 ya que los resultados obtenidos de la presente tesis predicen que los tumores carentes de LKB1 presentan una mayor sensibilidad ante los tratamientos basados en la inhibición de HSP90 **(Esq. D3)**.

HSP90 presenta multitud de dianas, por lo tanto sin un estudio más profundo resulta imposible predecir cuál de ellas podría mediar en el mecanismo que permite una respuesta diferencial ante su inhibición en función de la presencia de LKB1. De todas formas, en base a los resultados obtenidos en la presente tesis discutiremos la potencial implicación de la regulación de CD24 y de la señalización de NF $\kappa$ B en la protección que ejerce LKB1 ante la inhibición de HSP90. Discutiremos también los mecanismos moleculares que potencialmente podrían permitir la protección.

## Discusión general

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se ha descrito que HSP90 se asocia con CD24 (*Chen et al., 2009*) por lo que el empleo de inhibidores de HSP90 podría alterar su estabilidad. En caso de que la presencia de LKB1 contrarreste el potencial efecto de los inhibidores de HSP90 sobre la estabilidad de CD24 se podría explicar la respuesta diferencial observada ante este tratamiento ya que CD24 es capaz de regular la proliferación tumoral (*Baumann et al., 2005*). Por otra parte, CD24 también se ha implicado en la regulación de la muerte celular programada, habiéndose demostrado su capacidad para activar las vías apoptóticas a través de diversos mecanismos (despolarización de la membrana mitocondrial, producción de ROS, o mediante la supresión de la ruta de señalización antiapoptótica NFκB) (*Ju et al., 2011*). En este contexto, la presencia de LKB1 podría dictar una respuesta diferencial ya que, tal como apuntaremos a continuación, potencialmente es capaz de contrarrestar los efectos pro-apoptóticos ejecutados por CD24. Por una parte, la presencia de LKB1 provoca la hiperactivación de AMPK, potenciando de esta manera la producción de NADH, la acumulación de poder reductor y la inhibición del estrés provocado por la acumulación de ROS. CD24 a través de la regulación de la vía NFκB promueve la supervivencia celular (*Ju et al., 2011*). Esta observación y los resultados obtenidos en la presente tesis nos llevan a especular que este podría ser el mecanismo responsable de la respuesta diferencial observada ante el tratamiento con inhibidores de HSP90 en función de la presencia de LKB1. Los resultados obtenidos en la presente tesis (discutidos en el apartado 1.3.2.3.2.1.) así como la convergencia con estudios anteriores (*Xu et al., 2014*) (*Xiao et al., 2013*), apuntan la posibilidad de que la pérdida de LKB1 regule la señalización de NFκB y promueva la evasión de la respuesta inmune. La regulación diferencial de la respuesta inmune en función de la presencia de LKB1 potencialmente podría reflejarse en una sensibilidad exacerbada a la inhibición de HSP90 (*Liu et al., 2014*). Estas observaciones dan pie a la posibilidad de que la letalidad sintética mostrada entre la deficiencia de LKB1 y la inhibición de HSP90 pueda ser efectiva también frente a otros tratamientos cuyo mecanismo terapéutico se base en la activación de la respuesta inmune.

# Conclusiones







Los resultados obtenidos en la presente tesis confirman la hipótesis de partida, demostrando que LKB1 actúa como supresor del cáncer de próstata. Los resultados obtenidos se resumen en los siguientes puntos:

- ✚ La expresión de LKB1 se encuentra disminuida a nivel transcripcional y proteico en cáncer de próstata
- ✚ La pérdida de *Lkb1* como único evento genético no es un factor determinante en la iniciación del cáncer de próstata
- ✚ *Lkb1* y *Pten* cooperan en la supresión del cáncer de próstata metastático de células escamosas
- ✚ La expresión de LKB1, independientemente de su actividad quinasa, inhibe aspectos de la biología tumoral de próstata asociados con la agresividad
- ✚ Proponemos la regulación negativa de CD24 como mecanismo potencialmente responsable de la acción de LKB1 en la supresión tumoral de la próstata
- ✚ La carencia de LKB1 sensibiliza a las células frente a fenformina y a la inhibición de HSP90

### Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran la implicación causal de LKB1 en la supresión del cáncer de próstata y su asociación a la patogénesis del cáncer de próstata metastático de células escamosas. Se proponen además nuevas estrategias terapéuticas basadas en la expresión de esta quinasa que contribuyan potencialmente a la estratificación de pacientes para la aplicación de medicina de precisión.



# *Bibliografía*





Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* *14*, 2410–2434.

Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2002). Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet.* *TIG 18*, S1–S5.

Abate-Shen, C., Banach-Petrosky, W.A., Sun, X., Economides, K.D., Desai, N., Gregg, J.P., Borowsky, A.D., Cardiff, R.D., and Shen, M.M. (2003). Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer Res.* *63*, 3886–3890.

Abate-Shen, C., Shen, M.M., and Gelmann, E. (2008). Integrating differentiation and cancer: The Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* *76*, 717–727.

Abdulkadir, S.A., Magee, J.A., Peters, T.J., Kaleem, Z., Naughton, C.K., Humphrey, P.A., and Milbrandt, J. (2002). Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 1495–1503.

Alessi, D.R., Sakamoto, K., and Bayascas, J.R. (2006). LKB1-dependent signaling pathways. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 137–163.

Alimonti, A., Nardella, C., Chen, Z., Clohessy, J.G., Carracedo, A., Trotman, L.C., Cheng, K., Varmeh, S., Kozma, S.C., Thomas, G., et al. (2010). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *120*, 681–693.

Alvarado-Kristensson, M., Rodríguez, M.J., Silió, V., Valpuesta, J.M., and Carrera, A.C. (2009). SADB phosphorylation of gamma-tubulin regulates centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1081–1092.

Amatya, P.N., Kim, H.-B., Park, S.-J., Youn, C.-K., Hyun, J.-W., Chang, I.-Y., Lee, J.-H., and You, H.J. (2012). A role of DNA-dependent protein kinase for the activation of AMP-activated protein kinase in response to glucose deprivation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1823*, 2099–2108.

Aykin-Burns, N., Ahmad, I.M., Zhu, Y., Oberley, L.W., and Spitz, D.R. (2009). Increased levels of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem. J.* *418*, 29–37.

Azuma, M., Motegi, K., Aota, K., Yamashita, T., Yoshida, H., and Sato, M. (1999). TGF-beta1 inhibits NF-kappaB activity through induction of IkappaB-alpha expression in human salivary gland cells: a possible mechanism of growth suppression by TGF-beta1. *Exp. Cell Res.* *250*, 213–222.

Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., and Clevers, H.C. (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J.* *22*, 3062–3072.

Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., and Clevers, H.C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* *116*, 457–466.

## Bibliografía

Bai, L., Xu, S., Chen, W., Li, Z., Wang, X., Tang, H., and Lin, Y. (2011). Blocking NF- $\kappa$ B and Akt by Hsp90 inhibition sensitizes Smac mimetic compound 3-induced extrinsic apoptosis pathway and results in synergistic cancer cell death. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 16, 45–54.

Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R., and DePinho, R.A. (2002). Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 419, 162–167.

Barnes, A.P., Lilley, B.N., Pan, Y.A., Plummer, L.J., Powell, A.W., Raines, A.N., Sanes, J.R., and Polleux, F. (2007). LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129, 549–563.

Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R.S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I.W., et al. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 307, 1621–1625.

Bashir, M.N. (2015). Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 5137–5141.

Bastacky, S.I., Wojno, K.J., Walsh, P.C., Carmichael, M.J., and Epstein, J.I. (1995). Pathological features of hereditary prostate cancer. *J. Urol.* 153, 987–992.

Basu, S., and Tindall, D.J. (2010). Androgen action in prostate cancer. *Horm. Cancer* 1, 223–228.

Baumann, P., Cremers, N., Kroese, F., Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R., Uede, T., Yagita, H., and Sleeman, J.P. (2005). CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 65, 10783–10793.

Baumann, P., Thiele, W., Cremers, N., Muppala, S., Krachulec, J., Diefenbacher, M., Kassel, O., Mudduluru, G., Allgayer, H., Frame, M., et al. (2012). CD24 interacts with and promotes the activity of c-src within lipid rafts in breast cancer cells, thereby increasing integrin-dependent adhesion. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 435–448.

Berger, A.H., and Pandolfi, P.P. (2011). Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *J. Pathol.* 223, 137–146.

Berger, A.H., Knudson, A.G., and Pandolfi, P.P. (2011). A continuum model for tumour suppression. *Nature* 476, 163–169.

Berry, S.J., Coffey, D.S., Walsh, P.C., and Ewing, L.L. (1984). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urol.* 132, 474–479.

Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C. (2008). The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 967–975.

Bhavsar, A., and Verma, S. (2014). Anatomic Imaging of the Prostate. *BioMed Res. Int.* 2014.

Biernat, J., Wu, Y.-Z., Timm, T., Zheng-Fischhöfer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L., and Mandelkow, E.-M. (2002). Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4013–4028.

Blagosklonny, M.V. (2002). Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. *Leukemia* *16*, 455–462.

Blum, K.A., Johnson, J.L., Niedzwiecki, D., Canellos, G.P., Cheson, B.D., and Bartlett, N.L. (2007). Single agent bortezomib in the treatment of relapsed and refractory Hodgkin lymphoma: cancer and leukemia Group B protocol 50206. *Leuk. Lymphoma* *48*, 1313–1319.

Boardman, L.A., Thibodeau, S.N., Schaid, D.J., Lindor, N.M., McDonnell, S.K., Burgart, L.J., Ahlquist, D.A., Podratz, K.C., Pittelkow, M., and Hartmann, L.C. (1998). Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann. Intern. Med.* *128*, 896–899.

Bostwick, D.G., Liu, L., Brawer, M.K., and Qian, J. (2004). High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Rev. Urol.* *6*, 171–179.

Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C., and Alessi, D.R. (2003). MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J.* *22*, 5102–5114.

Boudeau, J., Sapkota, G., and Alessi, D.R. (2003). LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. *FEBS Lett.* *546*, 159–165.

Boudeau, J., Scott, J.W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D.G., Prescott, A.R., van Aalten, D.M.F., and Alessi, D.R. (2004). Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *J. Cell Sci.* *117*, 6365–6375.

Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H.J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T.C., Koivisto, P., Lack, E.E., Kononen, J., et al. (2000). Loss of NKX3.1 Expression in Human Prostate Cancers Correlates with Tumor Progression<sup>1,2</sup>. *Cancer Res.* *60*, 6111–6115.

Bretz, N., Noske, A., Keller, S., Erbe-Hofmann, N., Schlange, T., Salnikov, A.V., Moldenhauer, G., Kristiansen, G., and Altevogt, P. (2012). CD24 promotes tumor cell invasion by suppressing tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in a c-Src-dependent fashion. *Clin. Exp. Metastasis* *29*, 27–38.

Bright, N.J., Carling, D., and Thornton, C. (2008). Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *283*, 14946–14954.

Bright, N.J., Thornton, C., and Carling, D. (2009). The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* *196*, 15–26.

Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* *224*, 1121–1124.

## Bibliografía

Bubendorf, L., Schöpfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T.C., and Mihatsch, M.J. (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum. Pathol.* *31*, 578–583.

Bungard, D., Fuerth, B.J., Zeng, P.-Y., Faubert, B., Maas, N.L., Viollet, B., Carling, D., Thompson, C.B., Jones, R.G., and Berger, S.L. (2010). Signaling Kinase AMPK Activates Stress-Promoted Transcription via Histone H2B Phosphorylation. *Science* *329*, 1201–1205.

Burdova, A., Bouchal, J., Tavandzis, S., and Kolar, Z. (2014). TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Biomed. Pap.*

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 85–95.

Cantley, L.C., and Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 4240–4245.

Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 18–24.

Carling, D., Sanders, M.J., and Woods, A. (2008). The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int. J. Obes.* *2005 32 Suppl 4*, S55–S59.

Carracedo, A., Alimonti, A., and Pandolfi, P.P. (2011). PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res.* *71*, 629–633.

Carver, B.S., Tran, J., Gopalan, A., Chen, Z., Shaikh, S., Carracedo, A., Alimonti, A., Nardella, C., Varmeh, S., Scardino, P.T., et al. (2009). Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat. Genet.* *41*, 619–624.

Casey, O.M., Fang, L., Hynes, P.G., Abou-Kheir, W.G., Martin, P.L., Tillman, H.S., Petrovics, G., Awwad, H.O., Ward, Y., Lake, R., et al. (2012). TMPRSS2- driven ERG expression in vivo increases self-renewal and maintains expression in a castration resistant subpopulation. *PloS One* *7*, e41668.

Cauchin, E., Toucheffeu, Y., and Matysiak-Budnik, T. (2015). Hamartomatous Tumors in the Gastrointestinal Tract. *Gastrointest. Tumors* *2*, 65–74.

Chalhoub, N., and Baker, S.J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *4*, 127–150.

Chamie, K., Williams, S.B., and Hu, J.C. (2015). Population-Based Assessment of Determining Treatments for Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* *1*, 60–67.

Chan, K.T., Asokan, S.B., King, S.J., Bo, T., Dubose, E.S., Liu, W., Berginski, M.E., Simon, J.M., Davis, I.J., Gomez, S.M., et al. (2014). LKB1 loss in melanoma disrupts directional migration toward extracellular matrix cues. *J. Cell Biol.* *207*, 299–315.



Chen, G.-Y., Tang, J., Zheng, P., and Liu, Y. (2009). CD24 and Siglec-10 Selectively Repress Tissue Damage–Induced Immune Responses. *Science* 323, 1722–1725.

Chen, Y., Chi, P., Rockowitz, S., Iaquinta, P.J., Shamu, T., Shukla, S., Gao, D., Sirota, I., Carver, B.S., Wongvipat, J., et al. (2013). ETS factors reprogram the androgen receptor cistrome and prime prostate tumorigenesis in response to PTEN loss. *Nat. Med.* 19, 1023–1029.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730.

Chen, Z., Carracedo, A., Lin, H.-K., Koutcher, J.A., Behrendt, N., Egia, A., Alimonti, A., Carver, B.S., Gerald, W., Teruya-Feldstein, J., et al. (2009). Differential p53-independent outcomes of p19(Arf) loss in oncogenesis. *Sci. Signal.* 2, ra44.

Cheng, H., Liu, P., Wang, Z.C., Zou, L., Santiago, S., Garbitt, V., Gjoerup, O.V., Iglehart, J.D., Miron, A., Richardson, A.L., et al. (2009). SIK1 couples LKB1 to p53-dependent anoikis and suppresses metastasis. *Sci. Signal.* 2, ra35.

Chhipa, R.R., Wu, Y., Mohler, J.L., and Ip, C. (2010). Survival advantage of AMPK activation to androgen-independent prostate cancer cells during energy stress. *Cell. Signal.* 22, 1554–1561.

Chiaverotti, T., Couto, S.S., Donjacour, A., Mao, J.-H., Nagase, H., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., and Balmain, A. (2008). Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 172, 236–246.

Clegg, N.J., Couto, S.S., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Carver, B.S., Taylor, B.S., Ellwood-Yen, K., Gerald, W.L., Sander, C., and Sawyers, C.L. (2011). MYC cooperates with AKT in prostate tumorigenesis and alters sensitivity to mTOR inhibitors. *PloS One* 6, e17449.

Collins, S.P., Reoma, J.L., Gamm, D.M., and Uhler, M.D. (2000). LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochem. J.* 345 Pt 3, 673–680.

Conde, E., Suarez-Gauthier, A., García-García, E., Lopez-Rios, F., Lopez-Encuentra, A., García-Lujan, R., Morente, M., Sanchez-Verde, L., and Sanchez-Cespedes, M. (2007). Specific pattern of LKB1 and phospho-acetyl-CoA carboxylase protein immunostaining in human normal tissues and lung carcinomas. *Hum. Pathol.* 38, 1351–1360.

Contreras, C.M., Gurumurthy, S., Haynie, J.M., Shirley, L.J., Akbay, E.A., Wingo, S.N., Schorge, J.O., Broaddus, R.R., Wong, K.-K., Bardeesy, N., et al. (2008). Loss of Lkb1 provokes highly invasive endometrial adenocarcinomas. *Cancer Res.* 68, 759–766.

Contreras, C.M., Akbay, E.A., Gallardo, T.D., Haynie, J.M., Sharma, S., Tagao, O., Bardeesy, N., Takahashi, M., Settleman, J., Wong, K.-K., et al. (2010). Lkb1

## Bibliografía

inactivation is sufficient to drive endometrial cancers that are aggressive yet highly responsive to mTOR inhibitor monotherapy. *Dis. Model. Mech.* 3, 181–193.

Craig, J., Woulfe, J., Sinclair, J., and Malone, S. (2015). Isolated brain metastases as first site of recurrence in prostate cancer: case report and review of the literature. *Curr. Oncol.* 22, e493–e497.

Cunningham, D., and You, Z. (2015). In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J. Biol. Methods* 2.

Dahia, P.L. (2000). PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr. Relat. Cancer* 7, 115–129.

DeBerardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., and Thompson, C.B. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 54–61.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7, 11–20.

Denison, F.C., Hiscock, N.J., Carling, D., and Woods, A. (2009). Characterization of an alternative splice variant of LKB1. *J. Biol. Chem.* 284, 67–76.

Dibble, C.C., and Manning, B.D. (2013). Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat. Cell Biol.* 15, 555–564.

Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.* 19, 348–355.

Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2001). Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat. Genet.* 27, 222–224.

Di Mitri, D., Toso, A., Chen, J.J., Sarti, M., Pinton, S., Jost, T.R., D'Antuono, R., Montani, E., Garcia-Escudero, R., Guccini, I., et al. (2014). Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature* 515, 134–137.

Ding, Z., Wu, C.-J., Chu, G.C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S.R., Labrot, E.S., Wu, X., Lis, R., et al. (2011). SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 470, 269–273.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–221.

Dorfman, J., and Macara, I.G. (2008). STRADalpha regulates LKB1 localization by blocking access to importin-alpha, and by association with Crm1 and exportin-7. *Mol. Biol. Cell* 19, 1614–1626.

Drebin, J.A., Link, V.C., Stern, D.F., Weinberg, R.A., and Greene, M.I. (1985). Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* 41, 697–706.

- Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297–308.
- Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1659.
- Dykens, J.A., Jamieson, J., Marroquin, L., Nadanaciva, S., Billis, P.A., and Will, Y. (2008). Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 203–210.
- Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 30, 207–210.
- Elgavish, A., Wood, P.A., Pinkert, C.A., Eltoum, I.-E., Cartee, T., Wilbanks, J., Mentor-Marcel, R., Tian, L., and Scroggins, S.E. (2004). Transgenic mouse with human mutant p53 expression in the prostate epithelium. *The Prostate* 61, 26–34.
- Ellwood-Yen, K., Graeber, T.G., Wongvipat, J., Iruela-Arispe, M.L., Zhang, J., Matusik, R., Thomas, G.V., and Sawyers, C.L. (2003). Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell* 4, 223–238.
- Entius, M.M., Keller, J.J., Westerman, A.M., van Rees, B.P., van Velthuysen, M.L., de Goeij, A.F., Wilson, J.H., Giardiello, F.M., and Offerhaus, G.J. (2001). Molecular genetic alterations in hamartomatous polyps and carcinomas of patients with Peutz-Jeghers syndrome. *J. Clin. Pathol.* 54, 126–131.
- Esteve-Puig, R., Gil, R., González-Sánchez, E., Bech-Serra, J.J., Grueso, J., Hernández-Losa, J., Moliné, T., Canals, F., Ferrer, B., Cortés, J., et al. (2014). A Mouse Model Uncovers LKB1 as an UVB-Induced DNA Damage Sensor Mediating CDKN1A (p21WAF1/CIP1) Degradation. *PLoS Genet* 10, e1004721.
- Fan, D., Ma, C., and Zhang, H. (2009). The molecular mechanisms that underlie the tumor suppressor function of LKB1. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 41, 97–107.
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., et al. (2013). AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab.* 17, 113–124.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 49, 1374–1403.
- Filippi, B.M., de los Heros, P., Mehellou, Y., Navratilova, I., Gourlay, R., Deak, M., Plater, L., Toth, R., Zeqiraj, E., and Alessi, D.R. (2011). MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases. *EMBO J.* 30, 1730–1741.
- Finn, R.D., McLaren, A.W., Carrie, D., Henderson, C.J., and Wolf, C.R. (2007). Conditional deletion of cytochrome P450 oxidoreductase in the liver and

## Bibliografía

gastrointestinal tract: a new model for studying the functions of the P450 system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 40–47.

Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., and Licona-Limón, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 554–567.

Floc'h, N., Kinkade, C.W., Kobayashi, T., Aytes, A., Lefebvre, C., Mitrofanova, A., Cardiff, R.D., Califano, A., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2012). Dual targeting of the Akt/mTOR signaling pathway inhibits castration-resistant prostate cancer in a genetically engineered mouse model. *Cancer Res.* 72, 4483–4493.

Fornaro, M., Manes, T., and Languino, L.R. (2001). Integrins and Prostate Cancer Metastases. *Cancer Metastasis Rev.* 20, 321–331.

Foulds, L. (1958). The natural history of cancer. *J. Chronic Dis.* 8, 2–37.

Freeman, D., Lesche, R., Kertesz, N., Wang, S., Li, G., Gao, J., Groszer, M., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Thomas, G., et al. (2006). Genetic Background Controls Tumor Development in Pten-Deficient Mice. *Cancer Res.* 66, 6492–6496.

Freudlsperger, C., Bian, Y., Contag Wise, S., Burnett, J., Coupar, J., Yang, X., Chen, Z., and Van Waes, C. (2013). TGF-β and NF-κB signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* 32, 1549–1559.

Fuchs, U., Damm-Welk, C., and Borkhardt, A. (2004). Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs. *Curr. Mol. Med.* 4, 507–517.

Gao, M.-Q., Choi, Y.-P., Kang, S., Youn, J.H., and Cho, N.-H. (2010). CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene* 29, 2672–2680.

Garnett, M.J., Edelman, E.J., Heidorn, S.J., Greenman, C.D., Dastur, A., Lau, K.W., Greninger, P., Thompson, I.R., Luo, X., Soares, J., et al. (2012). Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* 483, 570–575.

Georgescu, E.F., Stănescu, L., Simionescu, C., Georgescu, I., Ionescu, R., and Florescu, G. (2008). Peutz-Jeghers syndrome: case report and literature review. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* 49, 241–245.

Giardiello, F.M., Welsh, S.B., Hamilton, S.R., Offerhaus, G.J., Gittelsohn, A.M., Booker, S.V., Krush, A.J., Yardley, J.H., and Luk, G.D. (1987). Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N. Engl. J. Med.* 316, 1511–1514.

Gingrich, J.R., and Greenberg, N.M. (1996). A Transgenic Mouse Prostate Cancer Model. *Toxicol. Pathol.* 24, 502–504.

Gingrich, J.R., Barrios, R.J., Kattan, M.W., Nahm, H.S., Finegold, M.J., and Greenberg, N.M. (1997). Androgen-independent prostate cancer progression in the TRAMP model. *Cancer Res.* 57, 4687–4691.

- Giusiano, S., Garcia, S., Andrieu, C., Dusetti, N.J., Bastide, C., Gleave, M., Taranger-Charpin, C., Iovanna, J.L., and Rocchi, P. (2012). TP53INP1 overexpression in prostate cancer correlates with poor prognostic factors and is predictive of biological cancer relapse. *The Prostate* 72, 117–128.
- Gleason, D.F., and Mellinger, G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.* 111, 58–64.
- Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., et al. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531–537.
- González-Sánchez, E., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Hernández-Losa, J., Ma Ángeles Montero, Cortés, J., Mares, R., Barbacid, M., and Recio, J.A. (2013). Lkb1 loss promotes tumor progression of BRAF(V600E)-induced lung adenomas. *PloS One* 8, e66933.
- Grasso, C.S., Wu, Y.-M., Robinson, D.R., Cao, X., Dhanasekaran, S.M., Khan, A.P., Quist, M.J., Jing, X., Lonigro, R.J., Brenner, J.C., et al. (2012). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487, 239–243.
- Gray, I.C., Stewart, L.M., Phillips, S.M., Hamilton, J.A., Gray, N.E., Watson, G.J., Spurr, N.K., and Snary, D. (1998). Mutation and expression analysis of the putative prostate tumour-suppressor gene PTEN. *Br. J. Cancer* 78, 1296–1300.
- Greenberg, N.M., DeMayo, F., Finegold, M.J., Medina, D., Tilley, W.D., Aspinall, J.O., Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Matusik, R.J., and Rosen, J.M. (1995). Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 3439–3443.
- Grossmann, M.E., Huang, H., and Tindall, D.J. (2001). Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1687–1697.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossman, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103–106.
- Gurumurthy, S., Hezel, A.F., Sahin, E., Berger, J.H., Bosenberg, M.W., and Bardeesy, N. (2008). LKB1 deficiency sensitizes mice to carcinogen-induced tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 55–63.
- El-Hage, N., Bruce-Keller, A.J., Yakovleva, T., Bazov, I., Bakalkin, G., Knapp, P.E., and Hauser, K.F. (2008). Morphine Exacerbates HIV-1 Tat-Induced Cytokine Production in Astrocytes through Convergent Effects on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, NF-κB Trafficking and Transcription. *PLoS ONE* 3, e4093.
- Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2002). Rules for Making Human Tumor Cells. *N. Engl. J. Med.* 347, 1593–1603.

## Bibliografía

- Han, J., Fujisawa, T., Husain, S.R., and Puri, R.K. (2014). Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* *14*, 173.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hansen, K.A., and Eyster, K.M. (2010). Genetics and genomics of endometriosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* *53*, 403–412.
- Hardie, D.G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* *117*, 5479–5487.
- Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* *25*, 1895–1908.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 251–262.
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* *2*, 28.
- Hawley, S.A., Ross, F.A., Chevtzoff, C., Green, K.A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M.C., Brown, L.J., Ogunbayo, O.A., Evans, A.M., et al. (2010). Use of Cells Expressing  $\gamma$  Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation. *Cell Metab.* *11*, 554–565.
- He, W.W., Sciavolino, P.J., Wing, J., Augustus, M., Hudson, P., Meissner, P.S., Curtis, R.T., Shell, B.K., Bostwick, D.G., Tindall, D.J., et al. (1997). A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics* *43*, 69–77.
- Hearle, N., Schumacher, V., Menko, F.H., Olschwang, S., Boardman, L.A., Gille, J.J.P., Keller, J.J., Westerman, A.M., Scott, R.J., Lim, W., et al. (2006). Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 3209–3215.
- Hemminki, A., Tomlinson, I., Markie, D., Järvinen, H., Sistonen, P., Björkqvist, A.M., Knuutila, S., Salovaara, R., Bodmer, W., Shibata, D., et al. (1997). Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nat. Genet.* *15*, 87–90.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., et al. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz–Jeghers syndrome. *Nature* *391*, 184–187.
- Hernández-Campo, P.M., Almeida, J., Matarraz, S., de Santiago, M., Sánchez, M.L., and Orfao, A. (2007). Quantitative analysis of the expression of

glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins during the maturation of different hematopoietic cell compartments of normal bone marrow. *Cytometry B Clin. Cytom.* 72, 34–42.

Herrmann, J.L., Byekova, Y., Elmets, C.A., and Athar, M. (2011). Liver kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of epithelial cancers. *Cancer Lett.* 306, 1–9.

Hezel, A.F., Gurumurthy, S., Granot, Z., Swisa, A., Chu, G.C., Bailey, G., Dor, Y., Bardeesy, N., and Depinho, R.A. (2008). Pancreatic LKB1 deletion leads to acinar polarity defects and cystic neoplasms. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2414–2425.

Hill, R., Song, Y., Cardiff, R.D., and Dyke, T.V. (2005). Heterogeneous Tumor Evolution Initiated by Loss of pRb Function in a Preclinical Prostate Cancer Model. *Cancer Res.* 65, 10243–10254.

Hollander, M.C., Blumenthal, G.M., and Dennis, P.A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat. Rev. Cancer* 11, 289–301.

Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123, 569–580.

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335.

Huang, X., Wullschleger, S., Shpiro, N., McGuire, V.A., Sakamoto, K., Woods, Y.L., McBurnie, W., Fleming, S., and Alessi, D.R. (2008). Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochem. J.* 412, 211–221.

Humphrey, P.A. (2012). Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology* 60, 59–74.

Huss, W.J., Maddison, L.A., and Greenberg, N.M. (2001). Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Semin. Cancer Biol.* 11, 245–260.

Hwang, Y.-J., Lee, E.-W., Song, J., Kim, H.-R., Jun, Y.-C., and Hwang, K.-A. (2013). MafK positively regulates NF- $\kappa$ B activity by enhancing CBP-mediated p65 acetylation. *Sci. Rep.* 3, 3242.

Ikediyi, O.N., Davies, H., Bignell, G., Edkins, S., Stevens, C., O’Meara, S., Santarius, T., Avis, T., Barthorpe, S., Brackenbury, L., et al. (2006). Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2606–2612.

Iriondo, O., Rábano, M., Domenici, G., Carlevaris, O., López-Ruiz, J.A., Zabalza, I., Berra, E., and Vivanco, M. dM (2015). Distinct breast cancer stem/progenitor cell populations require either HIF1 $\alpha$  or loss of PHD3 to expand under hypoxic conditions. *Oncotarget*.

## Bibliografía

Isaacs, W., De Marzo, A., and Nelson, W.G. (2002). Focus on prostate cancer. *Cancer Cell* 2, 113–116.

Ittmann, M., Huang, J., Radaelli, E., Martin, P., Signoretti, S., Sullivan, R., Simons, B.W., Ward, J.M., Robinson, B.D., Chu, G.C., et al. (2013). Animal models of human prostate cancer: The Consensus Report of the New York Meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.* 73, 2718–2736.

Jaleel, M., McBride, A., Lizcano, J.M., Deak, M., Toth, R., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (2005). Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS Lett.* 579, 1417–1423.

Jansen, M., Ten Klooster, J.P., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. (2009). LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiol. Rev.* 89, 777–798.

Jelsig, A.M., Qvist, N., Brusgaard, K., Nielsen, C.B., Hansen, T.P., and Ousager, L.B. (2014). Hamartomatous polyposis syndromes: a review. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 101.

Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., and Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat. Genet.* 18, 38–43.

Jeon, S.-M., Chandel, N.S., and Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 485, 661–665.

Jhavar, S., Reid, A., Clark, J., Kote-Jarai, Z., Christmas, T., Thompson, A., Woodhouse, C., Ogden, C., Fisher, C., Corbishley, C., et al. (2008). Detection of TMPRSS2-ERG Translocations in Human Prostate Cancer by Expression Profiling Using GeneChip Human Exon 1.0 ST Arrays. *J. Mol. Diagn. JMD* 10, 50–57.

Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., et al. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 448, 807–810.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 18, 283–293.

Ju, J., Jang, K., Lee, K.-M., Kim, M., Kim, J., Yi, J.Y., Noh, D.-Y., and Shin, I. (2011). CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF- $\kappa$ B signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis* 32, 1474–1483.

Karuman, P., Gozani, O., Odze, R.D., Zhou, X.C., Zhu, H., Shaw, R., Brien, T.P., Bozzuto, C.D., Ooi, D., Cantley, L.C., et al. (2001). The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. *Mol. Cell* 7, 1307–1319.

Kasper, S., Sheppard, P.C., Yan, Y., Pettigrew, N., Borowsky, A.D., Prins, G.S., Dodd, J.G., Duckworth, M.L., and Matusik, R.J. (1998). Development, progression, and androgen-dependence of prostate tumors in probasin-large T antigen transgenic mice: a model for prostate cancer. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 78, i – xv.



Katajisto, P., Vaahtomeri, K., Ekman, N., Ventelä, E., Ristimäki, A., Bardeesy, N., Feil, R., DePinho, R.A., and Mäkelä, T.P. (2008). LKB1 signaling in mesenchymal cells required for suppression of gastrointestinal polyposis. *Nat. Genet.* *40*, 455–459.

Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R.K., Audeh, M.W., Friedlander, M., Balmaña, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S.M., Hubert, A., et al. (2015). Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation. *J. Clin. Oncol.* *33*, 244–250.

Kim, M.J., Bhatia-Gaur, R., Banach-Petrosky, W.A., Desai, N., Wang, Y., Hayward, S.W., Cunha, G.R., Cardiff, R.D., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2002). Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* *62*, 2999–3004.

Kim, M.J., Cardiff, R.D., Desai, N., Banach-Petrosky, W.A., Parsons, R., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2002). Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 2884–2889.

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* *121*, 1–14.

Kishi, M., Pan, Y.A., Crump, J.G., and Sanes, J.R. (2005). Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science* *307*, 929–932.

Klezovitch, O., Risk, M., Coleman, I., Lucas, J.M., Null, M., True, L.D., Nelson, P.S., and Vasioukhin, V. (2008). A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 2105–2110.

Knoblauch, S., and True, L. (2012). 18 - Male Reproductive System. In *Comparative Anatomy and Histology*, P.M.T.M. Dintzis, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 285–308.

Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 820–823.

Koh, C.M., Bieberich, C.J., Dang, C.V., Nelson, W.G., Yegnasubramanian, S., and De Marzo, A.M. (2010). MYC and Prostate Cancer. *Genes Cancer* *1*, 617–628.

Kristiansen, G., Sammar, M., and Altevogt, P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J. Mol. Histol.* *35*, 255–262.

Kristiansen, G., Pilarsky, C., Wissmann, C., Kaiser, S., Bruemmendorf, T., Roepcke, S., Dahl, E., Hinzmann, B., Specht, T., Pervan, J., et al. (2005). Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J. Pathol.* *205*, 359–376.

Langdon, S.P. (2012). Animal modeling of cancer pathology and studying tumor response to therapy. *Curr. Drug Targets* *13*, 1535–1547.

Laplane, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* *149*, 274–293.

## Bibliografía

Le, Q.-T., Denko, N.C., and Giaccia, A.J. (2004). Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 293–310.

Li, L., Chen, Y., and Gibson, S.B. (2013). Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell. Signal.* 25, 50–65.

Liaw, D., Marsh, D.J., Li, J., Dahia, P.L., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M., et al. (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.* 16, 64–67.

van Lier, M.G.F., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E.M.H., Kuipers, E.J., Steyerberg, E.W., and van Leerdam, M.E. (2010). High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1258–1264; author reply 1265.

Lim, J., Lee, K., Shim, J., and Shin, I. (2014). CD24 regulates stemness and the epithelial to mesenchymal transition through modulation of Notch1 mRNA stability by p38MAPK. *Arch. Biochem. Biophys.* 558, 120–126.

Liu, D., Wu, A., 'dong, Cui, L., Hao, R., Wang, Y., He, J., and Guo, D. (2014). Hepatitis B virus polymerase suppresses NF- $\kappa$ B signaling by inhibiting the activity of IKKs via interaction with Hsp90 $\beta$ . *PLoS One* 9, e91658.

Liu, L., Siu, F.-M., Che, C.-M., Xu, A., and Wang, Y. (2012). Akt blocks the tumor suppressor activity of LKB1 by promoting phosphorylation-dependent nuclear retention through 14-3-3 proteins. *Am. J. Transl. Res.* 4, 175–186.

Liu, W., Monahan, K.B., Pfefferle, A.D., Shimamura, T., Sorrentino, J., Chan, K.T., Roadcap, D.W., Ollila, D.W., Thomas, N.E., Castrillon, D.H., et al. (2012). LKB1/STK11 inactivation leads to expansion of a prometastatic tumor subpopulation in melanoma. *Cancer Cell* 21, 751–764.

Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., et al. (2004a). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833–843.

Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., et al. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833–843.

Logothetis, C.J., and Lin, S.-H. (2005). Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat. Rev. Cancer* 5, 21–28.

Londesborough, A., Vaahtomeri, K., Tiainen, M., Katajisto, P., Ekman, N., Vallenius, T., and Mäkelä, T.P. (2008). LKB1 in endothelial cells is required for angiogenesis and TGF $\beta$ -mediated vascular smooth muscle cell recruitment. *Dev. Camb. Engl.* 135, 2331–2338.

- Lucchesi, J.C. (1968). Synthetic Lethality and Semi-Lethality among Functionally Related Mutants of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 59, 37–44.
- Lunt, S.Y., and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464.
- Luo, Z., Zang, M., and Guo, W. (2010). AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol. Lond. Engl.* 6, 457–470.
- Maguire, O., Collins, C., O’Loughlin, K., Miecznikowski, J., and Minderman, H. (2011). Quantifying nuclear p65 as a parameter for NF- $\kappa$ B activation: Correlation between ImageStream cytometry, microscopy, and Western blot. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 79, 461–469.
- Malik, R.D., Dakwar, G., Hardee, M.E., Sanfilippo, N.J., Rosenkrantz, A.B., and Taneja, S.S. (2011). Squamous Cell Carcinoma of the Prostate. *Rev. Urol.* 13, 56–60.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003). United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 573–578.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Marandola, P., Bonghi, A., Jallous, H., Bombardelli, E., Morazzoni, P., Gerardini, M., Tiscione, D., and Albergati, F. (2004). Molecular biology and the staging of prostate cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1028, 294–312.
- Marignani, P.A., Kanai, F., and Carpenter, C.L. (2001). LKB1 associates with Brg1 and is necessary for Brg1-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.* 276, 32415–32418.
- Martin, P., Liu, Y.-N., Pierce, R., Abou-Kheir, W., Casey, O., Seng, V., Camacho, D., Simpson, R.M., and Kelly, K. (2011). Prostate epithelial Pten/TP53 loss leads to transformation of multipotential progenitors and epithelial to mesenchymal transition. *Am. J. Pathol.* 179, 422–435.
- Masumori, N., Thomas, T.Z., Chaurand, P., Case, T., Paul, M., Kasper, S., Caprioli, R.M., Tsukamoto, T., Shappell, S.B., and Matusik, R.J. (2001). A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential. *Cancer Res.* 61, 2239–2249.
- McCarthy, A., Lord, C.J., Savage, K., Grigoriadis, A., Smith, D.P., Weigelt, B., Reis-Filho, J.S., and Ashworth, A. (2009). Conditional deletion of the Lkb1 gene in the mouse mammary gland induces tumour formation. *J. Pathol.* 219, 306–316.
- McLornan, D.P., List, A., and Mufti, G.J. (2014). Applying Synthetic Lethality for the Selective Targeting of Cancer. *N. Engl. J. Med.* 371, 1725–1735.
- Mehenni, H., Gehrig, C., Nezu, J., Oku, A., Shimane, M., Rossier, C., Guex, N., Blouin, J.-L., Scott, H.S., and Antonarakis, S.E. (1998). Loss of LKB1 Kinase Activity in Peutz-Jeghers Syndrome, and Evidence for Allelic and Locus Heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1641–1650.

## Bibliografía

Mihaylova, M.M., and Shaw, R.J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1016–1023.

Miyoshi, H., Nakau, M., Ishikawa, T., Seldin, M.F., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2002). Gastrointestinal hamartomatous polyposis in *Lkb1* heterozygous knockout mice. *Cancer Res.* *62*, 2261–2266.

Miyoshi, H., Deguchi, A., Nakau, M., Kojima, Y., Mori, A., Oshima, M., Aoki, M., and Taketo, M.M. (2009). Hepatocellular carcinoma development induced by conditional  $\beta$ -catenin activation in *Lkb1*<sup>+/-</sup> mice. *Cancer Sci.* *100*, 2046–2053.

Morton, J.P., Jamieson, N.B., Karim, S.A., Athineos, D., Ridgway, R.A., Nixon, C., McKay, C.J., Carter, R., Brunton, V.G., Frame, M.C., et al. (2010). *LKB1* haploinsufficiency cooperates with *Kras* to promote pancreatic cancer through suppression of p21-dependent growth arrest. *Gastroenterology* *139*, 586–597, 597.e1–e6.

Mott, L.J. (1979). Squamous cell carcinoma of the prostate: report of 2 cases and review of the literature. *J. Urol.* *121*, 833–835.

Mühlenberg, T., Grunewald, S., Treckmann, J., Podleska, L., Schuler, M., Fletcher, J.A., and Bauer, S. (2015). Inhibition of KIT-Glycosylation by 2-Deoxyglucose Abrogates KIT-Signaling and Combination with ABT-263 Synergistically Induces Apoptosis in Gastrointestinal Stromal Tumor. *PLoS ONE* *10*, e0120531.

Nagy, A. (2000). Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* *26*, 99–109.

Nagy, B., Szendroi, A., and Romics, I. (2009). Overexpression of CD24, c-myc and phospholipase 2A in prostate cancer tissue samples obtained by needle biopsy. *Pathol. Oncol. Res. POR* *15*, 279–283.

Nakau, M., Miyoshi, H., Seldin, M.F., Imamura, M., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2002). Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in *Lkb1* gene knockout mice. *Cancer Res.* *62*, 4549–4553.

Nardella, C., Carracedo, A., Salmena, L., and Pandolfi, P.P. (2010). Faithful modeling of PTEN loss driven diseases in the mouse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *347*, 135–168.

Nawijn, M.C., Bergman, A.M., and van der Poel, H.G. (2008). Genetically Engineered Mouse Models of Prostate Cancer. *Eur. Urol. Suppl.* *7*, 566–575.

Neville, P.J., Conti, D.V., Krumroy, L.M., Catalona, W.J., Suarez, B.K., Witte, J.S., and Casey, G. (2003). Prostate cancer aggressiveness locus on chromosome segment 19q12-q13.1 identified by linkage and allelic imbalance studies. *Genes. Chromosomes Cancer* *36*, 332–339.

Nezu, J., Oku, A., and Shimane, M. (1999). Loss of cytoplasmic retention ability of mutant *LKB1* found in Peutz-Jeghers syndrome patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *261*, 750–755.

- Nicholls, D.G., Darley-Usmar, V.M., Wu, M., Jensen, P.B., Rogers, G.W., and Ferrick, D.A. (2010). Bioenergetic Profile Experiment using C2C12 Myoblast Cells. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Ortega-Molina, A., and Serrano, M. (2013). PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 24, 184–189.
- Owen, M.R., Doran, E., and Halestrap, A.P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 348 Pt 3, 607–614.
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.-H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093–1102.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853–6866.
- Paoli, P., Giannoni, E., and Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3481–3498.
- Parisotto, M., and Metzger, D. (2013). Genetically engineered mouse models of prostate cancer. *Mol. Oncol.* 7, 190–205.
- Park, H.U., Suy, S., Danner, M., Dailey, V., Zhang, Y., Li, H., Hyduke, D.R., Collins, B.T., Gagnon, G., Kallakury, B., et al. (2009). AMP-Activated Protein Kinase Promotes Human Prostate Cancer Cell Growth and Survival. *Mol. Cancer Ther.* 8, 733–741.
- Pearson, H.B., McCarthy, A., Collins, C.M.P., Ashworth, A., and Clarke, A.R. (2008). Lkb1 deficiency causes prostate neoplasia in the mouse. *Cancer Res.* 68, 2223–2232.
- Peña, C.G., Nakada, Y., Saatcioglu, H.D., Aloisio, G.M., Cuevas, I., Zhang, S., Miller, D.S., Lea, J.S., Wong, K.-K., DeBerardinis, R.J., et al. (2015). LKB1 loss promotes endometrial cancer progression via CCL2-dependent macrophage recruitment. *J. Clin. Invest.*
- Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014a). Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 143–156.
- Petkova, N., Hennenlotter, J., Sobiesiak, M., Todenhöfer, T., Scharpf, M., Stenzl, A., Bühring, H.-J., and Schwentner, C. (2013). Surface CD24 distinguishes between low differentiated and transit-amplifying cells in the basal layer of human prostate. *The Prostate* 73, 1576–1590.
- Powell, W.C., Cardiff, R.D., Cohen, M.B., Miller, G.J., and Roy-Burman, P. (2003). Mouse strains for prostate tumorigenesis based on genes altered in human prostate cancer. *Curr. Drug Targets* 4, 263–279.
- Rajakulendran, T., and Sicheri, F. (2010). Allosteric Protein Kinase Regulation by Pseudokinases: Insights from STRAD. *Sci Signal* 3, pe8–pe8.

## Bibliografía

Ramírez-Peinado, S., Alcázar-Limones, F., Lagares-Tena, L., El Mjiyad, N., Caro-Maldonado, A., Tirado, O.M., and Muñoz-Pinedo, C. (2011). 2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* *71*, 6796–6806.

Rhee, Y.-H., Chung, P.-S., Kim, S.-H., and Ahn, J.C. (2014). CXCR4 and PTEN are involved in the anti-metastatic regulation of anethole in DU145 prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *447*, 557–562.

Richter, K., and Buchner, J. (2001). Hsp90: Chaperoning signal transduction. *J. Cell. Physiol.* *188*, 281–290.

Riegert-Johnson, D.L., Westra, W., and Roberts, M. (2012). High cancer risk and increased mortality in patients with Peutz–Jeghers syndrome. *Gut* *61*, 322–322.

Robinson, J., Nye, E., Stamp, G., and Silver, A. (2008). Osteogenic tumours in Lkb1-deficient mice. *Exp. Mol. Pathol.* *85*, 223–226.

Romano, M.F., Avellino, R., Petrella, A., Bisogni, R., Romano, S., and Venuta, S. (2004). Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *40*, 2829–2836.

Rossi, D.J., Ylikorkala, A., Korsisaari, N., Salovaara, R., Luukko, K., Launonen, V., Henkemeyer, M., Ristimäki, A., Aaltonen, L.A., and Mäkelä, T.P. (2002). Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz–Jeghers polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 12327–12332.

Ruiz-Perez, M.V., Sanchez-Jimenez, F., Alonso, F.J., Segura, J.A., Marquez, J., and Medina, M.A. (2014). Glutamine, glucose and other fuels for cancer. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 2557–2579.

Rybak, A.P., He, L., Kapoor, A., Cutz, J.-C., and Tang, D. (2011). Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1813*, 683–694.

Sakamoto, K., Göransson, O., Hardie, D.G., and Alessi, D.R. (2004). Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *287*, E310–E317.

Sakamoto, K., Gurusurthy, C.B., and Wagner, K.-U. (2014). Generation of conditional knockout mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1194*, 21–35.

Sanchez-Céspedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J.M., Westra, W.H., Herman, J.G., and Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 Is a Common Event in Adenocarcinomas of the Lung. *Cancer Res.* *62*, 3659–3662.

Sano, A., Kato, H., Sakurai, S., Sakai, M., Tanaka, N., Inose, T., Saito, K., Sohda, M., Nakajima, M., Nakajima, T., et al. (2009). CD24 expression is a novel prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* *16*, 506–514.

Santarosa, M., and Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim. Biophys. Acta* *1654*, 105–122.

Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M., and Alessi, D.R. (2001). Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 19469–19482.

Sato, N., Rosty, C., Jansen, M., Fukushima, N., Ueki, T., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Iacobuzio-Donahue, C.A., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2001). STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene inactivation in intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Am. J. Pathol.* 159, 2017–2022.

Schönenberger, M.J., and Kovacs, W.J. (2015). Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 42.

Schostak, M., Krause, H., Miller, K., Schrader, M., Weikert, S., Christoph, F., Kempkensteffen, C., and Kollermann, J. (2006). Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. *BMC Urol.* 6, 7.

Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., and Hardie, D.G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.* 113, 274–284.

Sedelaar, J.P.M., and Schalken, J.A. (2015). The need for a personalized approach for prostate cancer management. *BMC Med.* 13, 109.

Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y., and Hammond, D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med.* 313, 1111–1116.

Segal, E.D., Yasmeeen, A., Beauchamp, M.-C., Rosenblatt, J., Pollak, M., and Gotlieb, W.H. (2011). Relevance of the OCT1 transporter to the antineoplastic effect of biguanides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 694–699.

Shackelford, D.B. (2013). Unravelling the connection between metabolism and tumorigenesis through studies of the liver kinase B1 tumour suppressor. *J. Carcinog.* 12, 16.

Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 9, 563–575.

Shackelford, D.B., Abt, E., Gerken, L., Vasquez, D.S., Seki, A., Leblanc, M., Wei, L., Fishbein, M.C., Czernin, J., Mischel, P.S., et al. (2013). LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell* 23, 143–158.

Shappell, S.B., Thomas, G.V., Roberts, R.L., Herbert, R., Ittmann, M.M., Rubin, M.A., Humphrey, P.A., Sundberg, J.P., Rozengurt, N., Barrios, R., et al. (2004). Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.* 64, 2270–2305.

## Bibliografía

Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3329–3335.

Shaw, R.J., Bardeesy, N., Manning, B.D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* *6*, 91–99.

Shi, Y., Gong, H.-L., Zhou, L., Tian, J., and Wang, Y. (2012). CD24: a novel cancer biomarker in laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J. Oto-Rhino-Laryngol. Its Relat. Spec.* *74*, 78–85.

Shorning, B.Y., and Clarke, A.R. (2011). LKB1 loss of function studied in vivo. *FEBS Lett.* *585*, 958–966.

Sidera, K., and Patsavoudi, E. (2014). HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* *9*, 1–20.

Simons, K., and Gerl, M.J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 688–699.

Singh, A.S., and Figg, W.D. (2005). In vivo models of prostate cancer metastasis to bone. *J. Urol.* *174*, 820–826.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* *235*, 177–182.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* *244*, 707–712.

Sogame, Y., Kitamura, A., Yabuki, M., and Komuro, S. (2009). A comparison of uptake of metformin and phenformin mediated by hOCT1 in human hepatocytes. *Biopharm. Drug Dispos.* *30*, 476–484.

Song, M.S., Carracedo, A., Salmena, L., Song, S.J., Egia, A., Malumbres, M., and Pandolfi, P.P. (2011). Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* *144*, 187–199.

Song, M.S., Salmena, L., and Pandolfi, P.P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 283–296.

Sovak, M.A., Arsur, M., Zanieski, G., Kavanagh, K.T., and Sonenshein, G.E. (1999). The inhibitory effects of transforming growth factor beta1 on breast cancer cell proliferation are mediated through regulation of aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 537–544.

Sreedhar, A.S., Soti, C., and Csermely, P. (2004). Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* *1697*, 233–242.



- Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* *150*, 467–486.
- Stojcev, Z., Borun, P., Hermann, J., Krokowicz, P., Cichy, W., Kubaszewski, L., Banasiewicz, T., and Plawski, A. (2013). Hamartomatous polyposis syndromes. *Hered. Cancer Clin. Pract.* *11*, 4.
- Stravopodis, D.J., Margaritis, L.H., and Voutsinas, G.E. (2007). Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex. *Curr. Med. Chem.* *14*, 3122–3138.
- Su, J.Y., Erikson, E., and Maller, J.L. (1996). Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein kinase expressed in early *Xenopus* embryos. *J. Biol. Chem.* *271*, 14430–14437.
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., and Neumann, D. (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *281*, 32207–32216.
- Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., del Barco Barrantes, I., Ho, A., Wakeham, A., Itie, A., Khoo, W., et al. (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol. CB* *8*, 1169–1178.
- Suzuki, A., Kusakai, G.-I., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T., and Esumi, H. (2003). ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene* *22*, 6177–6182.
- Suzuki, H., Freije, D., Nusskern, D.R., Okami, K., Cairns, P., Sidransky, D., Isaacs, W.B., and Bova, G.S. (1998). Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Res.* *58*, 204–209.
- Takeda, H., Miyoshi, H., Kojima, Y., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2006). Accelerated onsets of gastric hamartomas and hepatic adenomas/carcinomas in *Lkb1*<sup>+/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup> compound mutant mice. *Oncogene* *25*, 1816–1820.
- Tatokoro, M., Koga, F., Yoshida, S., Kawakami, S., Fujii, Y., Neckers, L., and Kihara, K. (2012). Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells. *Int. J. Cancer* *131*, 987–996.
- Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., et al. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* *18*, 11–22.
- Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 988–993.
- Thomsen, M.K., Ambroisine, L., Wynn, S., Cheah, K.S.E., Foster, C.S., Fisher, G., Berney, D.M., Møller, H., Reuter, V.E., Scardino, P., et al. (2010). SOX9 elevation in the prostate promotes proliferation and cooperates with PTEN loss to drive tumor formation. *Cancer Res.* *70*, 979–987.

## Bibliografía

Tiainen, M., Ylikorkala, A., and Mäkelä, T.P. (1999). Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9248–9251.

Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A., and Mäkelä, T.P. (2002). Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum. Mol. Genet.* 11, 1497–1504.

Timmons, M.J., Tallitsch, R.B., and Martini, F. (2012). *Human anatomy* (Boston: Pearson Benjamin Cummings).

Todoroki, K., Ogasawara, S., Akiba, J., Nakayama, M., Naito, Y., Seki, N., Kusukawa, J., and Yano, H. (2016). CD44v3+/CD24- cells possess cancer stem cell-like properties in human oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 48, 99–109.

Tomlins, S.A., Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B.E., Cao, Q., Prensner, J.R., Rubin, M.A., Shah, R.B., et al. (2008). Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer. *Neoplasia* 10, 177–188.

Trotman, L.C., Niki, M., Dotan, Z.A., Koutcher, J.A., Di Cristofano, A., Xiao, A., Khoo, A.S., Roy-Burman, P., Greenberg, N.M., Dyke, T.V., et al. (2003). Pten Dose Dictates Cancer Progression in the Prostate. *PLoS Biol* 1, e59.

Uchida, C. (2012). The retinoblastoma protein: functions beyond the G1-S regulator. *Curr. Drug Targets* 13, 1622–1632.

Valkenburg, K.C., Williams, B.O., Valkenburg, K.C., and Williams, B.O. (2011). Mouse Models of Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostate Cancer* 2011, 2011, e895238.

Vallenius, T., Vaahtomeri, K., Kovac, B., Osiceanu, A.-M., Viljanen, M., and Mäkelä, T.P. (2011). An association between NUA2 and MRIP reveals a novel mechanism for regulation of actin stress fibers. *J. Cell Sci.* 124, 384–393.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

Varambally, S., Yu, J., Laxman, B., Rhodes, D.R., Mehra, R., Tomlins, S.A., Shah, R.B., Chandran, U., Monzon, F.A., Becich, M.J., et al. (2005). Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cancer Cell* 8, 393–406.

Varma, R., and Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394, 798–801.

Vaupel, P., and Harrison, L. (2004). Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The Oncologist* 9 Suppl 5, 4–9.

Velden, Y.U. van der, Wang, L., Zevenhoven, J., Rooijen, E. van, Lohuizen, M. van, Giles, R.H., Clevers, H., and Haramis, A.-P.G. (2011). The serine-threonine kinase LKB1 is essential for survival under energetic stress in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4358–4363.

- Vesuna, F., Lisok, A., Kimble, B., and Raman, V. (2009). Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia* N. Y. N 11, 1318–1328.
- Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., et al. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 719–726.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9, 138–141.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10, 789–799.
- Walsby, E.J., Pratt, G., Hewamana, S., Crooks, P.A., Burnett, A.K., Fegan, C., and Pepper, C. (2010). The NF-kappaB inhibitor LC-1 has single agent activity in multiple myeloma cells and synergizes with bortezomib. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1574–1582.
- Wang, G., Lunardi, A., Zhang, J., Chen, Z., Ala, U., Webster, K.A., Tay, Y., Gonzalez-Billalabeitia, E., Egia, A., Shaffer, D.R., et al. (2013). Lrf suppresses prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion. *Nat. Genet.* 45, 739–746.
- Wang, J., Kobayashi, T., Floc'h, N., Kinkade, C.W., Aytes, A., Dankort, D., Lefebvre, C., Mitrofanova, A., Cardiff, R.D., McMahon, M., et al. (2012). B-Raf Activation Cooperates with PTEN Loss to Drive c-Myc Expression in Advanced Prostate Cancer. *Cancer Res.* 72, 4765–4776.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., et al. (2003). Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4, 209–221.
- Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K.D., Walker, D., Yu, H., Halili, M.V., Hu, Y.-P., Price, S.M., Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 461, 495–500.
- Wang, Z.A., Mitrofanova, A., Bergren, S.K., Abate-Shen, C., Cardiff, R.D., Califano, A., and Shen, M.M. (2013). Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. *Nat. Cell Biol.* 15, 274–283.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530.
- Webber, M.M., Bello, D., and Quader, S. (1997). Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *The Prostate* 30, 58–64.

## Bibliografía

Wei, C., Amos, C.I., Stephens, L.C., Campos, I., Deng, J.M., Behringer, R.R., Rashid, A., and Frazier, M.L. (2005). Mutation of *Lkb1* and *p53* genes exert a cooperative effect on tumorigenesis. *Cancer Res.* 65, 11297–11303.

Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* CB 13, 2004–2008.

Worby, C.A., and Dixon, J.E. (2014). PTEN. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 641–669.

Wu, J., Vallenius, T., Ovaska, K., Westermarck, J., Mäkelä, T.P., and Hautaniemi, S. (2009). Integrated network analysis platform for protein-protein interactions. *Nat. Methods* 6, 75–77.

Wu, X., Wu, J., Huang, J., Powell, W.C., Zhang, J., Matusik, R.J., Sangiorgi, F.O., Maxson, R.E., Sucov, H.M., and Roy-Burman, P. (2001). Generation of a prostate epithelial cell-specific Cre transgenic mouse model for tissue-specific gene ablation. *Mech. Dev.* 101, 61–69.

Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 124, 471–484.

Xi, H., Barredo, J.C., Merchan, J.R., and Lampidis, T.J. (2013). Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKK $\beta$  leading to autophagy. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1463–1477.

Xiao, Z., Jiang, Q., Willette-Brown, J., Xi, S., Zhu, F., Burkett, S., Back, T., Song, N.-Y., Datla, M., Sun, Z., et al. (2013). The pivotal role of IKK $\alpha$  in the development of spontaneous lung squamous cell carcinomas. *Cancer Cell* 23, 527–540.

Xie, L.-Q., Nie, A.-Y., Yang, S.-J., Zhao, C., Zhang, L., Yang, P.-Y., and Lu, H.-J. (2014). Global in vivo terminal amino acid labeling for exploring differential expressed proteins induced by dialyzed serum cultivation. *The Analyst* 139, 4497–4504.

Xu, C., Fillmore, C.M., Koyama, S., Wu, H., Zhao, Y., Chen, Z., Herter-Sprie, G.S., Akbay, E.A., Tchaicha, J.H., Altabef, A., et al. (2014). Loss of *Lkb1* and *Pten* leads to lung squamous cell carcinoma with elevated PD-L1 expression. *Cancer Cell* 25, 590–604.

Yang, C.H., Murti, A., and Pfeffer, L.M. (2005). Interferon Induces NF- $\kappa$ B-inducing Kinase/Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor-dependent NF- $\kappa$ B Activation to Promote Cell Survival. *J. Biol. Chem.* 280, 31530–31536.

Ylikorkala, A., Rossi, D.J., Korsisaari, N., Luukko, K., Alitalo, K., Henkemeyer, M., and Mäkelä, T.P. (2001). Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in *Lkb1*-deficient mice. *Science* 293, 1323–1326.

Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497–503.

Yoo, L.I., Chung, D.C., and Yuan, J. (2002). LKB1 — A master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 2, 529–535.

- Young, J.C., Moarefi, I., and Hartl, F.U. (2001). Hsp90 a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* *154*, 267–274.
- Yu, J., Yu, J., Mani, R.-S., Cao, Q., Brenner, C.J., Cao, X., Wang, G.X., Wu, L., Li, J., Hu, M., et al. (2010). An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. *Cancer Cell* *17*, 443–454.
- Yun, H., Lee, M., Kim, S.-S., and Ha, J. (2005). Glucose Deprivation Increases mRNA Stability of Vascular Endothelial Growth Factor through Activation of AMP-activated Protein Kinase in DU145 Prostate Carcinoma. *J. Biol. Chem.* *280*, 9963–9972.
- Zadra, G., Photopoulos, C., Tyekuceva, S., Heidari, P., Weng, Q.P., Fedele, G., Liu, H., Scaglia, N., Priolo, C., Sicinska, E., et al. (2014). A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO Mol. Med.* *6*, 519–538.
- Zagórska, A., Deak, M., Campbell, D.G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2010). New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Sci. Signal.* *3*, ra25.
- Zarn, J.A., Zimmermann, S.M., Pass, M.K., Waibel, R., and Stahel, R.A. (1996). Association of CD24 with the kinase c-fgr in a small cell lung cancer cell line and with the kinase lyn in an erythroleukemia cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *225*, 384–391.
- Zeqiraj, E., Filippi, B.M., Deak, M., Alessi, D.R., and van Aalten, D.M.F. (2009). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* *326*, 1707–1711.
- Zhan, Y., Chen, Y., Zhang, Q., Zhuang, J., Tian, M., Chen, H., Zhang, L., Zhang, H., He, J., Wang, W., et al. (2012). The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 897–904.
- Zhang, J., Thomas, T.Z., Kasper, S., and Matusik, R.J. (2000). A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo. *Endocrinology* *141*, 4698–4710.
- Zhang, J., Wang, L.-S., Ye, S.-L., Luo, P., and Wang, B.-L. (2015). Blockage of tropomyosin receptor kinase a (TrkA) enhances chemo-sensitivity in breast cancer cells and inhibits metastasis in vivo. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *8*, 634–641.
- Zhang, P., Liu, W., Zhang, J., Guan, H., Chen, W., Cui, X., Liu, Q., and Jiang, A. (2010). Gene expression profiles in the PC-3 human prostate cancer cells induced by NKX3.1. *Mol. Biol. Rep.* *37*, 1505–1512.
- Zhou, X.-P., Kuismanen, S., Nystrom-Lahti, M., Peltomaki, P., and Eng, C. (2002). Distinct PTEN mutational spectra in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome-related endometrial carcinomas compared to sporadic microsatellite unstable tumors. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 445–450.



## ***Bibliografía***

Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Corney, D.C., Wang, W., Goodrich, D.W., Roy-Burman, P., and Nikitin, A.Y. (2006). Synergy of p53 and Rb Deficiency in a Conditional Mouse Model for Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* 66, 7889–7898.

# Anexos







En el presente apartado se detallan los siguientes anexos:

**ANEXO I:** Tablas indicativas de los valores correspondientes a los genes diferencialmente expresados entre los grupos:

- Tabla A1: pBABE-LKB1 vs pBABE
- Tabla A2: pBABE-LKB1 KD vs pBABE

**ANEXO II:** Artículos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- **Methodological aspects of the molecular and histological study of prostate cancer: Focus on PTEN**
- A Ugalde-Olano\*, A Egia\*, S Fernández-Ruiz\*, A Loizaga-Iriarte\*, P Zúñiga-García\*, S Garcia, F Royo, I Lacasa-Viscasillas, E Castro, AR Cortazar, A Zabala-Letona, N Martín-Martín, A Arruabarrena-Aristorena, V Torrano-Moya, L Valcárcel-Jiménez, P Sánchez-Mosquera, A Caro-Maldonado, J González-Tampan, G Cachi-Fuentes, E Bilbao, R Montero, S Fernández, E Arrieta, K Zorroza, M Castillo-Martín, V Serra, E Salazar, N Macías-Cámara, J Tabernero, J Baselga, C Cordón-Cardo, AM Aransay, A Del Villar A, JL Iovanna, JM Falcón-Pérez, M Unda, R Bilbao and A Carracedo.  
*Methods. 2015 March; 77-78:25-30*
- **Transcriptomic profiling of urine extracellular vesicles reveals alterations of CDH3 in prostate cancer**  
F Royo\*, P Zúñiga-García\*, A Loizaga\*, V Torrano-Moya, P Sanchez-Mosquera, A Ugalde-Olano, E González, L Palomo, S Fernández-Ruiz, I Lacasa-Viscasillas, M Berdasco, M Esteller, A Zabala-Letona, N Martín-Martín, A Arruabarrena-Aristorena, L Valcarcel-Jimenez, A Caro-Maldonado, J Gonzalez-Tampan, G Cachi-Fuentes, AM Aransay, M Unda, JM Falcón-Pérez, A Carracedo  
*Oncotarget. 2016 Jan 12. doi: 10.18632/oncotarget.6899*
- **Different EV enrichment methods adapted for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles in human samples**
- F Royo, P Zúñiga-García, P Sanchez-Mosquera, A Egia, A Perez, A Loizaga, R Arceo, I Lacasa, A Rabade, E Arrieta, R Bilbao, M Unda, A Carracedo, JM Falcón.  
*Journal Extracellular Vesicles 2016; Accepted*
- **Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation**
- M Salazar, M Lorente, E García-Taboada, E Pérez Gómez, D Dávila, P Zúñiga-García, JM Flores, A Rodríguez, Z Hegedus, D Mosén-Ansorena, A M Aransay, S Hernández-Tiedra, I López-Valero, M Quintanilla, C Sánchez, J L Iovanna, N Dusetti, M Guzmán, S E Francis, A Carracedo, E Kiss-Toth and G Velasco.  
*Cell Death and Differentiation. 2015 Jan; 22(1):131-44*
- **TRIB3 suppresses tumorigenesis by controlling mTORC2/AKT/FOXO signaling**  
M Salazar, M Lorente, E García-Taboada, E Pérez Gómez, D Dávila, P Zúñiga-García, JM Flores, A Rodríguez, Z Hegedus, D Mosén-Ansorena, A M Aransay, S Hernández-Tiedra, I López-Valero, M Quintanilla, C Sánchez, J L Iovanna, N Dusetti, M Guzmán, S E Francis, A Carracedo, E Kiss-Toth and G Velasco.  
*Molecular and Cellular Oncology. 2015 Sept; 2:3*



**Tabla A1.** Tabla en la que se indican los valores correspondientes a los genes diferencialmente expresados en el grupo pBABE-LKB1 con respecto al grupo pBABE

ProbeID	SYMBOL	Acc_No	FoldChange	PValue	AdjPValue	Gene_descr
ILMN_1891067		AK127526	-2,0089	6,31E-07	0,00194965	Homo sapiens cDNA FLJ45619 fis, clone BRTHA3027318
ILMN_1837428		AF131784	-1,6615	3,35E-05	0,0176894	Homo sapiens clone 25194 mRNA sequence
ILMN_1672148	AKR1B10	NM_020299.3	-1,9209	0,000161461	0,0409829	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10), mRNA.
ILMN_2412336	AKR1C2	NM_001354.4	-5,2947	6,85E-07	0,00194965	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member C2 (AKR1C2), transcript variant 1, mRNA
ILMN_1687757	AKR1C4	NM_001818.2	-1,8957	2,21E-05	0,0140223	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member C4 (AKR1C4), mRNA.
ILMN_2387995	ANTXR1	NM_053034.1	-1,6562	1,80E-05	0,0125469	Homo sapiens anthrax toxin receptor 1 (ANTXR1), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1811877	ANTXR1	NM_018153.2	-1,8323	3,06E-05	0,0173311	Homo sapiens anthrax toxin receptor 1 (ANTXR1), transcript variant 3, mRNA.
ILMN_1694548	ANXA3	NM_005139.2	1,5837	0,000110838	0,0346311	Homo sapiens annexin A3 (ANXA3), mRNA.
ILMN_1671731	AVP11	NM_021732.1	-2,2697	0,000250784	0,0489732	Homo sapiens arginine vasopressin-induced 1 (AVP11), mRNA.
ILMN_1725427	B2M	NM_004048.2	1,775	1,47E-05	0,0117504	Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA.
ILMN_2148459	B2M	NM_004048.2	1,8188	6,02E-05	0,0252783	Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA.
ILMN_2182704	BIRC2	NM_001166.3	1,5628	5,45E-05	0,0240898	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 2 (BIRC2), mRNA.
ILMN_1681644	BIRC3	NM_001165.3	1,734	1,71E-05	0,0123612	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1740900	BMP4	NM_130851.1	-1,8914	9,13E-05	0,0312847	Homo sapiens bone morphogenetic protein 4 (BMP4), transcript variant 3, mRNA.
ILMN_1662640	C20orf127	NM_080757.1	1,5002	0,000276619	0,0497864	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 127 (C20orf127), mRNA.
ILMN_1714278	C9orf30	NM_080655.1	1,6902	2,11E-05	0,0137594	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 30 (C9orf30), mRNA.
ILMN_1653001	CABLES1	NM_138375.1	-1,6827	0,000151097	0,0401786	Homo sapiens Cdk5 and Abl enzyme substrate 1 (CABLES1), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1680132	CADM1	NM_014333.3	-1,9121	0,000269255	0,0496991	Homo sapiens cell adhesion molecule 1 (CADM1), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1748840	CALB2	NM_007088.2	-1,5615	0,000119108	0,0357836	Homo sapiens calbindin 2 (CALB2), transcript variant CALB2c, mRNA.
ILMN_1678454	CASP4	NM_001225.3	1,5178	0,000192412	0,0436834	Homo sapiens caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP4), transcript variant alpha, mRNA.
ILMN_1717234	CAST	NM_001042445.1	1,5188	0,000146696	0,0401786	Homo sapiens calpastatin (CAST), transcript variant 11, mRNA.
ILMN_1657234	CCL20	NM_004591.1	2,1573	3,12E-05	0,0173894	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20), mRNA.
ILMN_1805519	CD24	NM_013230.2	-2,8266	2,81E-08	0,00027432	Homo sapiens CD24 molecule (CD24), mRNA.
ILMN_2060413	CD24	NM_013230.2	-3,0449	1,91E-07	0,000931269	Homo sapiens CD24 molecule (CD24), mRNA.
ILMN_2388142	CD99L2	NM_134445.2	-1,6247	7,23E-05	0,0288051	Homo sapiens CD99 molecule-like 2 (CD99L2), transcript variant 3, mRNA.
ILMN_1673788	CDV3	NM_017548.3	1,8995	1,31E-05	0,0112496	Homo sapiens CDV3 homolog (mouse) (CDV3), mRNA. XM_945284 XM_945286 XM_945287
ILMN_1810977	CDV3	NM_017548.3	1,7366	0,000107003	0,0337026	Homo sapiens CDV3 homolog (mouse) (CDV3), mRNA. XM_945284 XM_945286 XM_945287
ILMN_1774287	CFB	NM_001710.4	2,5653	1,50E-06	0,0027869	Homo sapiens complement factor B (CFB), mRNA.
ILMN_1754103	CLDN11	NM_005602.4	1,9495	7,68E-06	0,00833363	Homo sapiens claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein) (CLDN11), mRNA.
ILMN_1784294	CPA4	NM_016352.2	-2,0248	3,80E-05	0,0185947	Homo sapiens carboxypeptidase A4 (CPA4), mRNA.
ILMN_1796925	CXADR	NM_001338.3	-1,811	3,41E-05	0,0177343	Homo sapiens coxsackie virus and adenovirus receptor (CXADR), mRNA.
ILMN_1787897	CXCL1	NM_001511.1	4,1871	1,19E-05	0,0109322	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), mRNA.
ILMN_1779234	CXCL6	NM_002993.2	1,7926	1,18E-05	0,0109322	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (CXCL6), mRNA.
ILMN_3243441	EEF1A7	NR_003586.1	1,6143	0,000173002	0,0422297	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7 (EEF1A7), non-coding RNA.
ILMN_2350634	EFEMP1	NM_001039348.1	-2,1778	1,87E-05	0,0126006	Homo sapiens EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1673880	EFEMP1	NM_004105.3	-1,829	0,000169426	0,0419744	Homo sapiens EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1704753	EPAS1	NM_001430.3	-2,8438	4,20E-06	0,00536237	Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), mRNA.
ILMN_1672022	EPHA4	NM_004438.3	-1,5934	7,62E-05	0,0294583	Homo sapiens EPH receptor A4 (EPHA4), mRNA.
ILMN_2122103	ETS1	NM_005238.2	1,5946	0,000214835	0,0463569	Homo sapiens v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian) (ETS1), mRNA.

ProbeID	SYMBOL	Acc_No	FoldChange	PValue	AdjPValue	Gene_descr
ILMN_1673113	F2RL1	NM_005242.3	-1,558	1,40E-05	0,0116728	Homo sapiens coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1 (F2RL1), mRNA.
ILMN_3271098	FAM176A	NM_001135032.1	1,78	0,000170348	0,0419744	Homo sapiens family with sequence similarity 176, member A (FAM176A), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1713266	FAM46C	NM_017709.3	-1,7695	3,54E-06	0,00500611	Homo sapiens family with sequence similarity 46, member C (FAM46C), mRNA.
ILMN_2367428	FAM96A	NM_001014812.1	1,5077	0,000230196	0,0473187	Homo sapiens family with sequence similarity 96, member A (FAM96A), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1682599	GPRC5A	NM_003979.3	-1,5891	9,34E-05	0,0314342	Homo sapiens G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A (GPRC5A), mRNA.
ILMN_3237376	GRAMD1B	NM_020716.1	-1,779	0,000149699	0,0401786	Homo sapiens GRAM domain containing 1B (GRAMD1B), mRNA.
ILMN_1778401	HLA-B	NM_005514.5	1,9728	6,57E-05	0,0270259	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), mRNA.
ILMN_2186806	HLA-F	NM_018950.1	1,6084	9,88E-05	0,0319577	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, F (HLA-F), mRNA.
ILMN_2130441	HLA-H	NR_001434.1	1,8143	0,000239534	0,0482229	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, H (pseudogene) (HLA-H), non-coding RNA.
ILMN_1792497	HRB	NM_004504.3	-1,6885	7,26E-06	0,00809905	Homo sapiens HIV-1 Rev binding protein (HRB), mRNA.
ILMN_1745374	IFI35	NM_005533.2	1,651	0,000201609	0,0447388	Homo sapiens interferon-induced protein 35 (IFI35), mRNA.
ILMN_2347798	IFI6	NM_022872.2	1,9222	1,54E-05	0,0117504	Homo sapiens interferon, alpha-inducible protein 6 (IFI6), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1687384	IFI6	NM_022873.2	1,8958	2,24E-05	0,0140223	Homo sapiens interferon, alpha-inducible protein 6 (IFI6), transcript variant 3, mRNA.
ILMN_1781373	IFIH1	NM_022168.2	1,7451	6,36E-06	0,00730809	Homo sapiens interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1), mRNA.
ILMN_1746085	IGFBP3	NM_000598.4	-2,4439	0,000155841	0,0404599	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1665865	IGFBP4	NM_001552.2	-2,0626	4,05E-05	0,0192958	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4), mRNA.
ILMN_2368530	IL32	NM_001012633.1	2,502	1,06E-06	0,00210137	Homo sapiens interleukin 32 (IL32), transcript variant 4, mRNA.
ILMN_1778010	IL32	NM_001012636.1	2,2654	2,43E-06	0,00395041	Homo sapiens interleukin 32 (IL32), transcript variant 7, mRNA.
ILMN_1745964	IRAK2	NM_001570.3	1,9115	4,00E-05	0,0192958	Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2), mRNA.
ILMN_1708375	IRF1	NM_002198.1	1,6677	1,16E-05	0,0109322	Homo sapiens interferon regulatory factor 1 (IRF1), mRNA.
ILMN_1745471	IRF9	NM_006084.4	1,8365	0,000180051	0,0428957	Homo sapiens interferon regulatory factor 9 (IRF9), mRNA.
ILMN_1728885	KIAA1644	XM_936510.2	-2,1476	4,26E-07	0,00151107	PREDICTED: Homo sapiens KIAA1644 protein (KIAA1644), mRNA.
ILMN_1801442	KRT81	NM_002281.2	-2,7368	6,99E-07	0,00194965	Homo sapiens keratin 81 (KRT81), mRNA.
ILMN_1696434	LAMA1	NM_005559.2	-1,5807	0,000242721	0,0483658	Homo sapiens laminin, alpha 1 (LAMA1), mRNA.
ILMN_1692223	LCN2	NM_005564.3	4,7851	4,81E-08	0,000312986	Homo sapiens lipocalin 2 (LCN2), mRNA.
ILMN_2139761	LIMCH1	NM_014988.1	-1,943	3,39E-06	0,00500611	Homo sapiens LIM and calponin homology domains 1 (LIMCH1), mRNA.
ILMN_3275447	LOC391126	XR_017684.2	1,6666	8,99E-05	0,0310781	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC391126), miscRNA.
ILMN_3244176	LOC399959	NR_024430.1	1,8162	5,34E-05	0,0240346	Homo sapiens hypothetical LOC399959 (LOC399959), non-coding RNA.
ILMN_1767665	LOC493869	NM_001008397.1	1,5077	0,000120941	0,036057	Homo sapiens similar to RIKEN cDNA 2310016C16 (LOC493869), mRNA.
ILMN_3213573	LOC645715	XR_017484.1	1,5761	8,08E-05	0,0302563	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC645715), miscRNA.
ILMN_3205162	LOC646688	XR_037673.1	1,6811	0,000179718	0,0428957	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC646688), miscRNA.
ILMN_2053546	LOC653314	NM_001080544.1	1,638	0,00012934	0,0374184	Homo sapiens similar to ribosomal protein L19 (LOC653314), mRNA.
ILMN_1707434	LOC653778	XM_929667.1	1,7156	5,94E-05	0,0252067	PREDICTED: Homo sapiens similar to solute carrier family 25, member 37 (LOC653778), mRNA.
ILMN_3224907	LOC728672	XR_015580.2	1,5669	1,76E-05	0,0125298	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (LOC728672), miscRNA.
ILMN_1751016	LONRF2	NM_198461.3	-1,9047	6,87E-05	0,0276752	Homo sapiens LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2 (LONRF2), mRNA.
ILMN_2376205	LTB	NM_002341.1	8,2388	2,02E-09	7,32E-05	Homo sapiens lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) (LTB), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_2376204	LTB	NM_002341.1	4,231	2,25E-07	0,000970916	Homo sapiens lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) (LTB), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1759030	MAP4K5	NM_198794.1	1,5971	0,000170881	0,0419744	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5 (MAP4K5), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1673409	MGC16121	XM_001128419.1	-1,5821	0,000178428	0,0428957	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein MGC16121 (MGC16121), mRNA.
ILMN_1795342	MLPH	NM_001042467.1	-2,5801	1,02E-06	0,00210137	Homo sapiens melanophilin (MLPH), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1778333	MMP24	NM_006690.3	-1,6233	8,37E-05	0,0305421	Homo sapiens matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted) (MMP24), mRNA.
ILMN_2136089	MTE	NM_175621.2	1,8494	0,000127902	0,0374184	Homo sapiens metallothionein E (MTE), mRNA.
ILMN_1662358	MX1	NM_002462.2	2,2403	8,89E-05	0,0310781	Homo sapiens myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) (MX1), mRNA.
ILMN_2049766	NFE2L3	NM_004289.5	2,0333	1,04E-05	0,0104647	Homo sapiens nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 (NFE2L3), mRNA.
ILMN_1773154	NFKBIA	NM_020529.1	1,5418	0,000249306	0,0489291	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (NFKBIA), mRNA.
ILMN_1719695	NFKBIZ	NM_001005474.1	3,5327	3,98E-08	0,000310608	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta (NFKBIZ), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1745397	OAS3	NM_006187.2	1,8349	4,85E-06	0,00592136	Homo sapiens 2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa (OAS3), mRNA.

ProbeID	SYMBOL	Acc_No	FoldChange	PValue	AdjPValue	Gene_descr
ILMN_2381899	OPTN	NM_001008213.1	1,5775	0,000151961	0,0401786	Homo sapiens optineurin (OPTN), transcript variant 4, mRNA.
ILMN_1795778	P4HA2	NM_001017973.1	1,6745	0,000161598	0,0409829	Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II (P4HA2), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1710571	PAPD5	NM_001040285.1	-1,5029	3,23E-05	0,0176508	Homo sapiens PAP associated domain containing 5 (PAPD5), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_2262044	PARP10	NM_032789.1	1,5128	8,21E-05	0,0302563	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10 (PARP10), mRNA.
ILMN_2058795	PGCP	NM_016134.2	1,5282	0,000187746	0,04329	Homo sapiens plasma glutamate carboxypeptidase (PGCP), mRNA.
ILMN_2413158	PODXL	NM_001018111.1	-1,5092	0,000244335	0,0484404	Homo sapiens podocalyxin-like (PODXL), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_2408683	PPAP2B	NM_177414.1	-1,8372	2,11E-05	0,0137594	Homo sapiens phosphatidic acid phosphatase type 2B (PPAP2B), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1747195	PSMB8	NM_148919.3	1,7513	2,42E-05	0,0147536	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7) (PSMB8), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1767006	PSMB8	NM_148919.3	1,6148	5,49E-05	0,0240898	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7) (PSMB8), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_2390299	PSMB8	NM_004159.4	1,5381	0,000180123	0,0428957	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7) (PSMB8), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_2376108	PSMB9	NM_002800.4	1,9503	0,000125766	0,0372116	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2) (PSMB9), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1780189	PSMC5	NM_002805.4	1,5083	0,000224854	0,0473187	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5 (PSMC5), mRNA.
ILMN_1740426	RASD1	NM_016084.3	-2,6793	4,63E-05	0,0215209	Homo sapiens RAS, dexamethasone-induced 1 (RASD1), mRNA.
ILMN_1747673	RASL10A	NM_001007279.1	1,611	0,000249147	0,0489291	Homo sapiens RAS-like, family 10, member A (RASL10A), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_3242405	RMRP	NR_003051.2	-2,0844	2,98E-05	0,0172267	Homo sapiens RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP), RNase MRP RNA.
ILMN_3234762	RN5S9	NR_023371.1	-2,8385	0,000114023	0,0350653	Homo sapiens RNA, 5S ribosomal 9 (RN5S9), ribosomal RNA.
ILMN_1755115	RPL23	NM_000978.3	1,6794	0,000217759	0,0466389	Homo sapiens ribosomal protein L23 (RPL23), mRNA.
ILMN_1689725	RPLP1	NM_001003.2	1,5558	8,47E-05	0,030543	Homo sapiens ribosomal protein, large, P1 (RPLP1), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1681983	RSPO3	NM_032784.3	-2,6432	8,09E-08	0,000451163	Homo sapiens R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis) (RSPO3), mRNA.
ILMN_1712545	S100A3	NM_002960.1	2,8909	2,49E-07	0,000970916	Homo sapiens S100 calcium binding protein A3 (S100A3), mRNA.
ILMN_1753342	SAT1	NM_002970.1	-1,9364	5,67E-05	0,024615	Homo sapiens spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1), mRNA.
ILMN_2149164	SFRP1	NM_003012.3	-1,9748	3,81E-05	0,0185947	Homo sapiens secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), mRNA.
ILMN_3310065	SFTA1P	NR_027082.1	2,0076	5,35E-05	0,0240346	Homo sapiens surfactant associated 1 (pseudogene) (SFTA1P), non-coding RNA.
ILMN_3235647	SIK1	NM_173354.3	-2,4801	1,32E-05	0,0112496	Homo sapiens salt-inducible kinase 1 (SIK1), mRNA.
ILMN_1717639	SIK1	NM_173354.3	-2,1202	3,79E-05	0,0185947	Homo sapiens salt-inducible kinase 1 (SIK1), mRNA.
ILMN_1734897	SLC4A4	NM_003759.2	-2,0175	3,35E-06	0,00500611	Homo sapiens solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4 (SLC4A4), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_3235096	SNORA28	NR_002964.1	-1,9316	3,27E-05	0,0176508	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 28 (SNORA28), small nucleolar RNA.
ILMN_3235270	SNORA38B	NR_003706.2	-1,9669	0,000130698	0,0375298	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 38B (retrotransposed) (SNORA38B), small nucleolar RNA.
ILMN_3248575	SNORA42	NR_002974.1	-2,0152	7,46E-05	0,0294135	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 42 (SNORA42), small nucleolar RNA.
ILMN_3249167	SNORA63	NR_002586.1	-2,2062	1,61E-06	0,00285605	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 63 (SNORA63), small nucleolar RNA.
ILMN_3247018	SNORA67	NR_002912.1	-2,0502	3,73E-06	0,00502755	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 67 (SNORA67), small nucleolar RNA.
ILMN_1660900	SNORA7B	NR_002992.2	-2,2817	3,30E-05	0,0176508	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 7B (SNORA7B), small nucleolar RNA.
ILMN_3238554	SNORA80	NR_002996.2	-1,656	0,000148073	0,0401786	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 80 (SNORA80), small nucleolar RNA.
ILMN_3235969	SNORA9	NR_002952.1	-1,949	2,93E-05	0,0172267	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 9 (SNORA9), small nucleolar RNA.
ILMN_2336781	SOD2	NM_001024465.1	1,7902	4,26E-06	0,00536237	Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mRNA.
ILMN_2406501	SOD2	NM_001024466.1	1,6755	3,52E-05	0,0178455	Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 3, mRNA.
ILMN_1753547	STAT5A	NM_003152.2	1,6402	0,000204917	0,0449946	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A), mRNA.
ILMN_1766657	STOM	NM_004099.4	1,6328	2,78E-05	0,0167044	Homo sapiens stomatin (STOM), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1693270	SUSD2	NM_019601.3	-2,6458	0,000134753	0,0381369	Homo sapiens sushi domain containing 2 (SUSD2), mRNA.
ILMN_1686116	THBS1	NM_003246.2	-1,7125	8,97E-05	0,0310781	Homo sapiens thrombospondin 1 (THBS1), mRNA.
ILMN_1674009	TKTL1	NM_012253.2	2,0549	1,03E-06	0,00210137	Homo sapiens transketolase-like 1 (TKTL1), mRNA.
ILMN_2120695	TSPAN7	NM_004615.2	-2,0326	8,55E-07	0,00208604	Homo sapiens tetraspanin 7 (TSPAN7), mRNA.
ILMN_1809291	TSPAN7	NM_004615.2	-1,9986	1,08E-06	0,00210137	Homo sapiens tetraspanin 7 (TSPAN7), mRNA.
ILMN_1772824	WNT5B	NM_032642.2	2,3861	0,000129114	0,0374184	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 5B (WNT5B), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1672295	ZC3H12A	NM_025079.1	3,5805	3,75E-09	7,32E-05	Homo sapiens zinc finger CCCH-type containing 12A (ZC3H12A), mRNA.
ILMN_3237956	ZC3H12C	NM_033390.1	1,5115	0,000118443	0,0357836	Homo sapiens zinc finger CCCH-type containing 12C (ZC3H12C), mRNA.



**Tabla A2.** Tabla en la que se indican los valores correspondientes a los genes diferencialmente expresados en el grupo pBABE-LKB1 KD con respecto al grupo pBABE

ProbeID	SYMBOL	Acc_No	FoldChange	PValue	AdjPValue	Gene_descr
ILMN_2294762	AMY1A	NM_004038.3	2,1055	1,48E-05	0,0117504	Homo sapiens amylase, alpha 1A (salivary) (AMY1A), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_2041101	ANXA2P1	NR_001562.1	1,5477	0,000236351	0,0480778	Homo sapiens annexin A2 pseudogene 1 (ANXA2P1) on chromosome 4.
ILMN_1694548	ANXA3	NM_005139.2	1,5134	9,90E-05	0,0319577	Homo sapiens annexin A3 (ANXA3), mRNA.
ILMN_2148459	B2M	NM_004048.2	1,6304	2,26E-05	0,0140223	Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA.
ILMN_1805519	CD24	NM_013230.2	-2,0953	7,62E-07	0,00198343	Homo sapiens CD24 molecule (CD24), mRNA.
ILMN_2060413	CD24	NM_013230.2	-2,0725	9,50E-06	0,00976423	Homo sapiens CD24 molecule (CD24), mRNA.
ILMN_1673788	CDV3	NM_017548.3	1,6313	5,81E-05	0,0249384	Homo sapiens CDV3 homolog (mouse) (CDV3), mRNA. XM_945284 XM_945286 XM_945287
ILMN_2350634	EFEMP1	NM_001039348.1	-1,7335	3,52E-05	0,0178455	Homo sapiens EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1673880	EFEMP1	NM_004105.3	-1,5825	9,82E-05	0,0319577	Homo sapiens EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1704753	EPAS1	NM_001430.3	-1,9856	0,000227258	0,0473187	Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), mRNA.
ILMN_1713266	FAM46C	NM_017709.3	-1,5857	7,58E-05	0,0294583	Homo sapiens family with sequence similarity 46, member C (FAM46C), mRNA.
ILMN_1696911	FTHL8	NR_002203.1	1,7121	1,20E-05	0,0109322	Homo sapiens ferritin, heavy polypeptide-like 8 (FTHL8) on chromosome X.
ILMN_2395043	HSPA4	NM_198431.1	1,5676	0,000229754	0,0473187	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 4 (HSPA4), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_3267017	LOC100129028	XM_001722134.1	1,9854	3,59E-06	0,00500611	PREDICTED: Homo sapiens similar to 60S acidic ribosomal protein P1 (LOC100129028), mRNA.
ILMN_3294222	LOC100132673	XR_039018.1	1,5763	0,000182556	0,0429562	PREDICTED: Homo sapiens misc RNA (LOC100132673), miscRNA.
ILMN_3245517	LOC100134273	XM_001724343.1	1,7715	1,30E-05	0,0112496	PREDICTED: Homo sapiens similar to mCG7602 (LOC100134273), mRNA.
ILMN_3241834	LOC100134504	XM_001725687.1	1,6692	0,000140396	0,0394482	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100134504 (LOC100134504), mRNA.
ILMN_3206132	LOC388076	XM_001722259.1	1,5441	8,52E-05	0,030543	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC388076 (LOC388076), mRNA.
ILMN_3279414	LOC440595	XR_038356.1	1,8012	5,95E-06	0,00704389	PREDICTED: Homo sapiens misc RNA (LOC440595), miscRNA.
ILMN_3275771	LOC642567	XR_038054.1	1,6335	1,59E-05	0,0117504	PREDICTED: Homo sapiens misc RNA (LOC642567), miscRNA.
ILMN_3289352	LOC642828	XR_016385.2	1,5515	0,000199639	0,0445548	PREDICTED: Homo sapiens misc RNA (LOC642828), miscRNA.
ILMN_1690295	LOC648343	XR_018327.1	1,7064	1,54E-05	0,0117504	PREDICTED: Homo sapiens similar to protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B (LOC648343), mRNA.
ILMN_2181241	LOC649946	NR_003040.1	1,7735	9,43E-06	0,00976423	Homo sapiens ribosomal protein L23a pseudogene (LOC649946), non-coding RNA.
ILMN_3224907	LOC728672	XR_015580.2	1,7587	1,58E-05	0,0117504	PREDICTED: Homo sapiens misc RNA (LOC728672), miscRNA.
ILMN_3227315	LOC729009	XR_042330.1	1,5516	0,000100486	0,0321687	PREDICTED: Homo sapiens misc RNA (LOC729009), miscRNA.
ILMN_2136133	PABPC1	NM_002568.3	1,6587	0,000168061	0,0419744	Homo sapiens poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 (PABPC1), mRNA.
ILMN_1759954	PTMA	NM_001099285.1	1,6734	4,39E-05	0,0206434	Homo sapiens prothymosin, alpha (PTMA), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1744937	PTPRM	NM_002845.2	-1,5103	0,000182577	0,0429562	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, M (PTPRM), mRNA.
ILMN_1689725	RPLP1	NM_001003.2	2,1834	1,73E-06	0,00294129	Homo sapiens ribosomal protein, large, P1 (RPLP1), transcript variant 1, mRNA.
ILMN_1651228	RPS28	NM_001031.4	1,6422	3,00E-05	0,0172267	Homo sapiens ribosomal protein S28 (RPS28), mRNA.
ILMN_1681983	RSP03	NM_032784.3	-3,124	1,77E-08	0,000230873	Homo sapiens R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis) (RSP03), mRNA.
ILMN_1734897	SLC4A4	NM_003759.2	-1,5667	0,000195739	0,0439355	Homo sapiens solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4 (SLC4A4), transcript variant 2, mRNA.
ILMN_1674009	TKTL1	NM_012253.2	1,5756	1,86E-05	0,0126006	Homo sapiens transketolase-like 1 (TKTL1), mRNA.







## Methodological aspects of the molecular and histological study of prostate cancer: Focus on PTEN



Aitziber Ugalde-Olano <sup>a,1</sup>, Ainara Egia <sup>b,1</sup>, Sonia Fernández-Ruiz <sup>c,1</sup>, Ana Loizaga-Iriarte <sup>d,1</sup>, Patricia Zuñiga-García <sup>c,1</sup>, Stephane Garcia <sup>e</sup>, Félix Royo <sup>c,f</sup>, Isabel Lacasa-Viscasillas <sup>d</sup>, Erika Castro <sup>b</sup>, Ana R. Cortazar <sup>c</sup>, Amaia Zabala-Letona <sup>c</sup>, Natalia Martín-Martín <sup>c</sup>, Amaia Arruabarrena-Aristorena <sup>c</sup>, Verónica Torrano-Moya <sup>c</sup>, Lorea Valcárcel-Jiménez <sup>c</sup>, Pilar Sánchez-Mosquera <sup>c</sup>, Alfredo Caro-Maldonado <sup>c</sup>, Jorge González-Tampan <sup>d</sup>, Guido Cachi-Fuentes <sup>d</sup>, Elena Bilbao <sup>d</sup>, Rocío Montero <sup>d</sup>, Sara Fernández <sup>a,b</sup>, Edurne Arrieta <sup>b</sup>, Kerman Zorroza <sup>b</sup>, Mireia Castillo-Martín <sup>g</sup>, Violeta Serra <sup>h,i</sup>, Eider Salazar <sup>b</sup>, Nuria Macías-Cámara <sup>c</sup>, Jose Tabernero <sup>h,i</sup>, Jose Baselga <sup>h,i,j</sup>, Carlos Cordón-Cardo <sup>g</sup>, Ana M. Aransay <sup>c,f</sup>, Amaia Del Villar <sup>b</sup>, Juan L. Iovanna <sup>e</sup>, Juan M. Falcón-Pérez <sup>c,f,k</sup>, Miguel Unda <sup>d,2</sup>, Roberto Bilbao <sup>b,2</sup>, Arkaitz Carracedo <sup>c,k,l,\*,2</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathology, Basurto University Hospital, 48013 Bilbao, Spain

<sup>b</sup> Basque Biobank, Basque Foundation for Health Innovation and Research-BIOEF, Barakaldo, Spain

<sup>c</sup> CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, 801 Building, 48160 Derio, Spain

<sup>d</sup> Department of Urology, Basurto University Hospital, 48013 Bilbao, Spain

<sup>e</sup> Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM UMR 1068, CNRS UMR 7258, Aix-Marseille University and Institut Paoli-Calmettes, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Marseille, France

<sup>f</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), Spain

<sup>g</sup> Department of Pathology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

<sup>h</sup> Molecular Therapeutics Research Unit, Medical Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

<sup>i</sup> Experimental Therapeutics Group, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

<sup>j</sup> Human Oncology & Pathogenesis Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

<sup>k</sup> Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

<sup>l</sup> Biochemistry and Molecular Biology Department, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bilbao, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 October 2014

Received in revised form 9 February 2015

Accepted 10 February 2015

Available online 16 February 2015

#### Keywords:

PTEN

Prostate cancer

Fresh tissue

Molecular biology

### ABSTRACT

Prostate cancer is among the most frequent cancers in men, and despite its high rate of cure, the high number of cases results in an elevated mortality worldwide. Importantly, prostate cancer incidence is dramatically increasing in western societies in the past decades, suggesting that this type of tumor is exquisitely sensitive to lifestyle changes. Prostate cancer frequently exhibits alterations in the *PTEN* gene (inactivating mutations or gene deletions) or at the protein level (reduced protein expression or altered sub-cellular compartmentalization). The relevance of *PTEN* in this type of cancer is further supported by the fact that the sole deletion of *PTEN* in the murine prostate epithelium recapitulates many of the features of the human disease. In order to study the molecular alterations in prostate cancer, we need to overcome the methodological challenges that this tissue imposes. In this review we present protocols and methods, using *PTEN* as proof of concept, to study different molecular characteristics of prostate cancer.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

### 1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is among the deadliest forms of cancer (WHO), and represents the third cause of death by cancer in men ([www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr)). The tumor suppressor *PTEN* is among the most mutated and lost tumor suppressors in PCa [1]. Up to 70% of PCa harbor loss of *PTEN* at presentation. This

\* Corresponding author. CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, 801 Building, 48160 Derio, Spain.

E-mail address: [acarracedo@cicbiogune.es](mailto:acarracedo@cicbiogune.es) (A. Carracedo).

<sup>1</sup> Equal contribution.

<sup>2</sup> Equal contribution.

tumor suppressor is located at the top of a highly oncogenic signaling pathway, the PI-3 Kinase (PI-3K) cascade, which contains many other oncogenes and tumor suppressors [2]. In addition, regulatory feedback loops stem from the PTEN/PI-3K pathway to ensure cell homeostasis, which decrease the efficacy of single agent therapies [2,3].

PTEN down-regulation is not restricted to genetic events, and regulation of its transcription, translation and stability can play an important role. PTEN is frequently lost in heterozygosity, whereas mostly advanced cancers exhibit complete loss of the tumor suppressor. Interestingly, the prostate epithelium is exquisitely sensitive to the reduction in PTEN levels. This concept has been formally proven in mice through the use of genetic interference, which allows a partial reduction of the expression of the interfered allele [4,5]. While PTEN heterozygous mice present PIN lesions in the prostate with long latency [6], PTEN hypomorphic mice show progression of the prostate lesions to invasive cancer at higher penetrance [5]. Importantly, while a gradual decrease of PTEN promotes prostate cancer progression, acute and complete PTEN-loss elicits the activation of a fail-safe senescence response, which is driven by the up-regulation of the tumor suppressor p53 [7]. This novel type of senescence is genuinely distinct from the classic oncogene-induced senescence [8]. Importantly, genetic or environmental events regulating this process may be key players in the progression of prostate cancer and therefore attractive targets for anti-cancer therapy [9,10].

All these evidence point to the need of studying PTEN-dependent pathways in prostate cancer. However, the technical challenges related to the study of this type of tumor require special attention, and hence, in this review we aim at describing a series of methodologies to study prostate cancer biology, with a reference to the pathway aforementioned.

## 2. Methods and results

### 2.1. Preparation of well-diagnosed prostate cancer specimens for molecular studies

Cancerous lesions in the prostate, unlike in other tissues, are difficult to identify macroscopically. This poses a challenge when the aim is to obtain well-diagnosed frozen tissue. To overcome this limitation, we have set up together with the Basque Biobank and Basurto University Hospital (OSI-Basurto, Bilbao, Spain), in

collaboration with the Dept. of Pathology at Mount Sinai, a procedure to obtain this type of specimen.

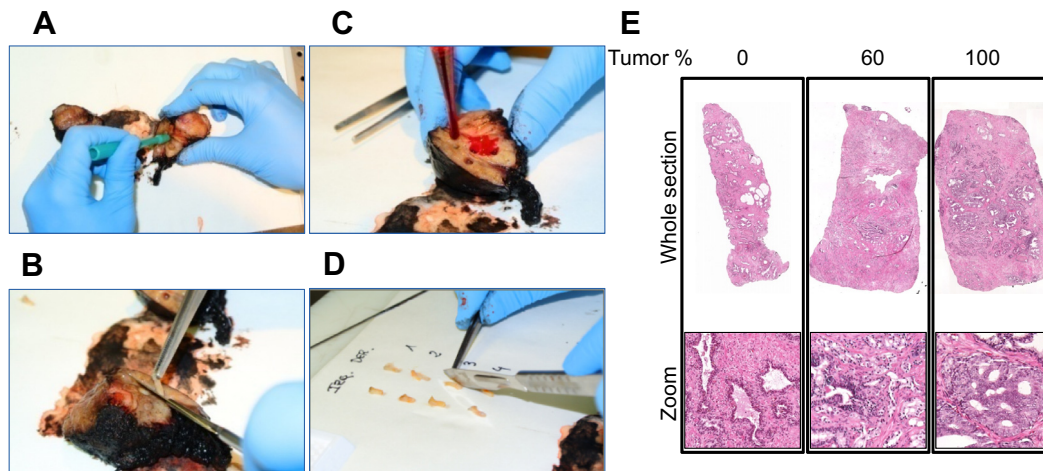
### 2.2. Key materials

- A biopsy punch (Miltex Ref. 33–34).

Due to the characteristics of prostate cancer, we established a procedure by which fresh tissue obtained from radical prostatectomy is sliced into left and right lobe (after delimiting the margins of the surgical piece with ink and fixing the ink with acetic acid). All prostate specimens were obtained upon informed consent and with evaluation and approval from the corresponding ethics committee (CEIC code OHEUN11–12 and OHEUN14–14). From each lobe, the dermatologic punch is employed to harvest 8 tissue cylinders of 4 mm diameter. The site of the punches is selected blindly due to the lack of macroscopic alterations associated to cancerous lesions. However, we did notice that the expertise of the pathologist does influence the rate of success in harvesting cylinders with cancer. Of note, this approach prevents from damaging the capsule and a drop of eosin on the site of tissue harvest can help monitoring the histological alterations surrounding the area for diagnostic purposes. Tissue cylinders are then divided longitudinally with a scalpel and dedicated to snap-freeze (in liquid nitrogen or isopentane at  $-80^{\circ}\text{C}$ ) and to paraffin embedding for diagnostic purposes (procedure in Fig. 1A–D). Due to the width of the cylinder (4 mm diameter), the diagnosed tissue fraction will closely represent the histological properties of the frozen adjacent tissue. In Fig. 1E, hematoxylin/eosin staining of whole tissue sections from cylinders with different tumor abundance are shown, together with a zoom that shows the correct preservation of the histological properties of the sections. Importantly, this protocol allows us to closely estimate the tumor abundance that we have in the frozen tissue piece, hence solving an otherwise challenge in the acquisition of frozen material. The material obtained from this approach is sufficient to carry out different molecular biology studies, including RNA preparation (described below), protein extraction and metabolite profiling (data not shown).

### 2.3. Molecular biology analysis from frozen tissue: tips for good quality RNA preparation

Preparation of RNA of high quality from prostate cancer specimens remains a challenge, primarily due to the abundance of RNAses and proteases in the prostate and prostatic fluid. A variety



**Fig. 1.** Preparation of well-diagnosed fresh frozen biopsies. (A–D) Preparation of the punch biopsy (A) and excision with scalpel (B), identification of the harvest point in surgical piece with eosin (C) and longitudinal separation of the punch with scalpel (D). (E) Histological features of punch biopsies with different abundance of tumoral tissue, whole section hematoxylin/eosin staining is shown together with a zoom to show the histological features of the piece.

of protocols have been proposed to maximize the quality and yield from biopsies of different origin [11–14] (see also protocols from Prostate Cancer Biorepository Network; SOP N:006 <http://www.prostatebiorepository.org>). While real time PCR is a low-demanding approach in terms of RNA integrity, the latest OMIC technologies, including RNA sequencing, require material in optimal conditions.

To define the technical needs of an appropriate RNA extraction strategy, we have tested one main technical implementation (the use of phenolic extraction agents) and one variable (the presence of ink and acetic acid in the preparation).

2.4. Key materials

- Trizol (Life Technologies/Invitrogen Ref. 15596-018).
- Total RNA extraction kit (NucleoSpin® miRNA Ref. 740971.10/50/250).

The protocol is the following, where the alternative procedure with and without Trizol is underlined (the Trizol-based implementation is described in the user manual of the NucleoSpin® miRNA kit):

1. RNase inhibition and tissue thawing (a minimal amount of tissue of 10 mg is sufficient for the procedure). RNA later ICE (Life Technologies Ref. AM7030) is used to ensure the maximal inhibition of RNAses and the optimization of tissue homogenization afterwards. The protocol is based on transferring frozen tissue (stored dry at –80 °C) to RNA later ICE (also at –80 °C) and thawing the tissue at –20 °C overnight.
2. Regular lysis buffer. Tissue is transferred to the recommended volume of NucleoSpin® miRNA lysis buffer.

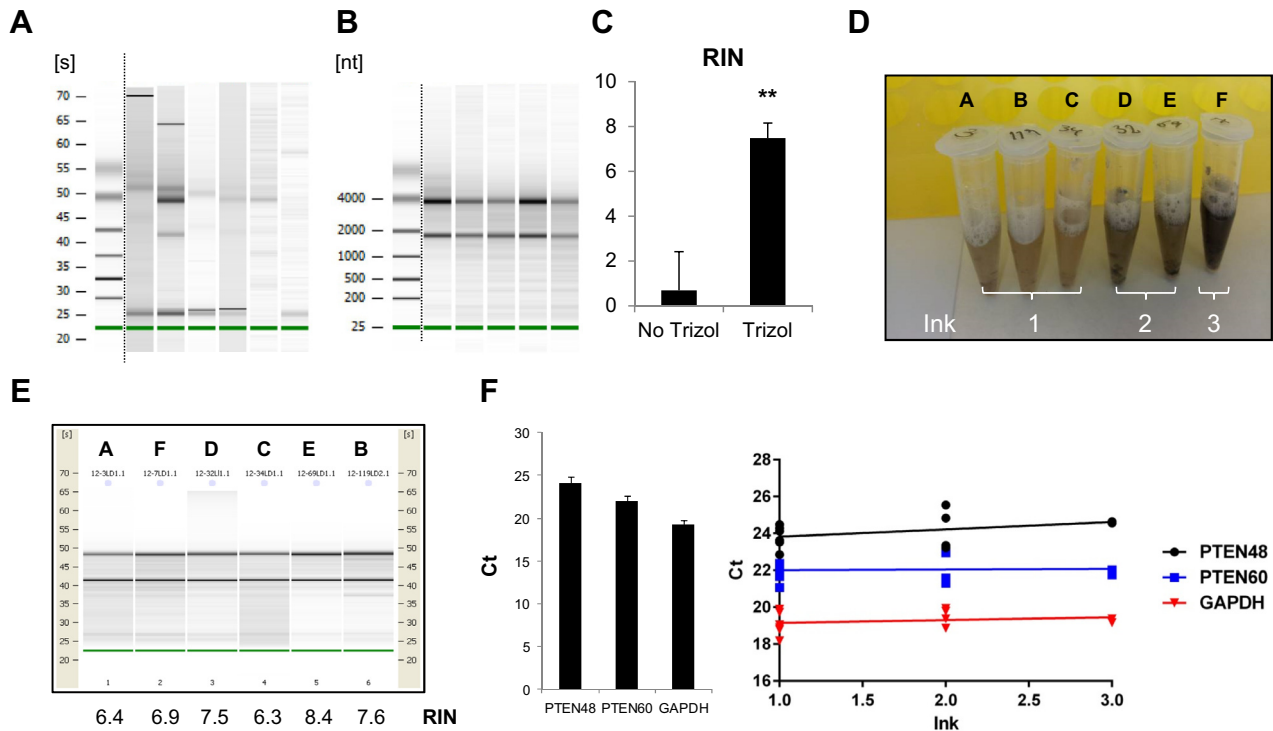
Trizol-based lysis. Tissue is transferred to 400 µL volume of Trizol. Additional 400 µL are added after homogenization.

3. Homogenization. 5–6 beads/tube (Ceramic Bead Tubes 2.8 mm, Cat.: 13114-50; MO BIO Laboratories). Homogenization is carried out in *Precellys* in two cycles of 6000 rpm and 30 s.
4. RNA extraction. Following the manufacturer’s instructions.

RNA extraction. Following homogenization, we add 160 µL of Chloroform, mix by vortex, incubate 3 min and centrifuge 15 min at 12,000g in tabletop centrifuge. The supernatant (350–400 µL) is transferred to a new tube and mixed with 1 mL of MX buffer. After vortex, the product is loaded in the column and the same process indicated in point 4 is followed.

The results obtained from frozen tissues with a stabilizing agent (RNA later ICE), a total RNA extraction kit, and with or without Trizol implementation are shown in Fig. 2. RNA stabilizing agents and the standard non-phenol based lysis buffer is not sufficient to prevent the RNA from degrading (Fig. 2A), while Trizol implementation results in total RNA of optimal quality for transcriptomic studies (Fig. 2B, RNA Integrity Number – RIN – values in Fig. 2C). Of note, although small RNAs have not been monitored in this procedure, the kit presented herein would allow for their isolation.

On the other hand, we have evaluated with an independent phenol-based RNA extraction kit (Absolutely RNA miRNA KIT. Cat. 400814, Agilent) whether the presence of ink and acetic acid from the margins of the non-tumoral prostate tissue could influence RNA quality. To this end, we selected biopsies containing increasing amounts of these contaminants (Fig. 2D). The presence of these agents did not impact the quality of RNA, as quantified by Agilent Bioanalyzer (Fig. 2E). We further studied if despite yielding good quality RNA, ink and acetic acid could interfere with



**Fig. 2.** Evaluation of the impact on phenol-based lysis and ink/acetic acid contaminants in RNA quality. (A–C) Bioanalyzer analysis of RNA preparations performed in the absence (A) or presence (B) of Trizol lysis (average RIN values for the samples analyzed are presented in C; \*\*, significance  $p < 0.01$ ). (D and E) Representative images of the lysis of samples with increasing amount of ink (the intensity of the dark color reflects the increasing concentration of ink in the sample of origin, which has been separated in three groups as indicated) (D), and RIN values obtained from the RNA preparation (E). (F) Real time quantitative PCR of PTEN (two Taqman probes) and GAPDH shows average Ct amplification values in all samples (left panel) and the lack of correlation between Ct values and the increase in ink (right panel).

the retrotranscription and real time quantitative PCR process. We predicted that if the ink/acetic acid interferes with the retrotranscription or real time PCR, we would observe an increase in the Ct values of the genes studied in the high ink conditions. However, evaluation of *PTEN* expression with two independent Taqman probes (*PTEN* 48: Universal Probe library [Roche] #48; primer F: ggggaagtaaggaccagagac Primer R: tccagatgattcttaacaggtagc; *PTEN* 60: Universal Probe library [Roche] #60; primer F: gcacaagaggccctagattc Primer R: cgcctctgactgggaatagt) and *GAPDH* (REF. Life Technologies Hs02758991\_g1) as housekeeping gene clearly showed a lack of correlation between the amount of ink and any alteration in gene expression (Fig. 2F). In summary, phenol-based RNA extraction coupled to column-based purification significantly improves RNA quality and the presence of ink/acetic acid in the tissue sample does not influence RNA preparation, retrotranscription, or real time PCR amplification.

### 2.5. Monitoring *PTEN* expression in prostate cancer: an immunohistochemical (IHC) procedure

Immunodetection of *PTEN* could become critical in the coming years to stratify patients and define the best therapeutic strategies [15,16]. Therefore, good standardized IHC procedures need to be established. Lotan et al. recently established an immunohistochemical protocol for *PTEN* [17]. We have employed a different clone from Cell Signaling Technology *PTEN* (138G6) and we have established a sensitive and specific IHC protocol for research purposes.

### 2.6. Key material

- Rabbit monoclonal *PTEN* antibody, clone 138G6 (Cell Signaling Technology, Ref. 9559).

Antigen retrieval was performed with Tris–EDTA (pH 9) in microwave (4 min).  $H_2O_2$  was used to block the endogenous peroxidase, followed by blocking with goat serum and primary antibody (1:100) incubation overnight at 4 °C. Goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000) was incubated at room temperature for 30 min. IHC detection was performed with the ABC Kit from Vector

Laboratories. This protocol with DAB-based development results in specific detection of *PTEN*, which was setup in DU145 (*PTEN* positive) and PC3 (*PTEN* negative) xenograft-derived formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) slides. Sections were counterstained with hematoxylin.

With this protocol, tumors with known *PTEN* status (described above) were correctly identified (Fig. 3A and B). We also stained human biopsies consisting of benign hyperplasias and prostate cancer. We could identify *PTEN* positive epithelia in the hyperplasia cases as well as prostate cancer biopsies with and without detectable *PTEN* immunoreactivity (Fig. 3C). Of note, we observed that often the stromal component exhibited greater *PTEN* expression than the adjacent epithelial tissue (see asterisks in Fig. 3). In summary, we present here a protocol that is valuable for the detection of *PTEN* in human specimens for research purposes.

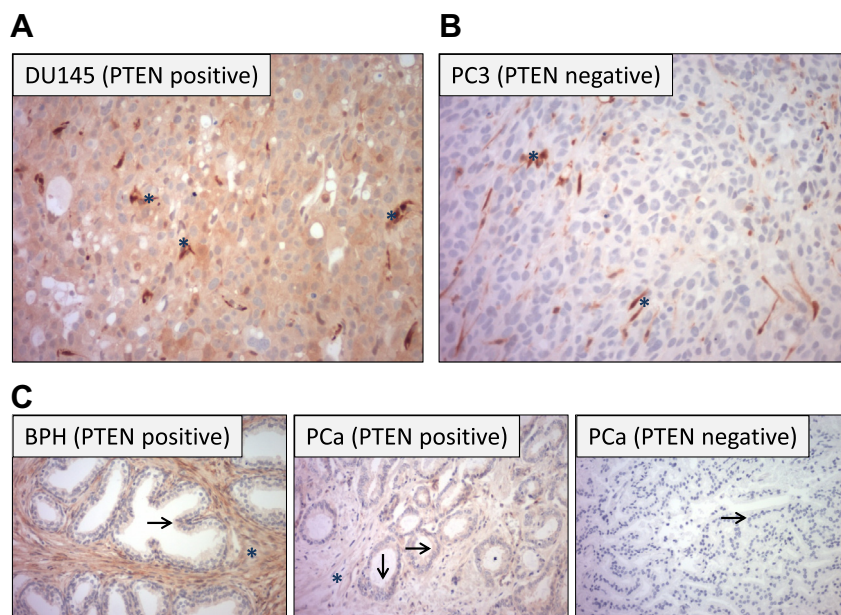
### 2.7. Extracellular vesicle isolation from urine samples of prostate cancer patients

Due to the close proximity of the prostate to the urinary track, urine-mediated diagnosis of prostate cancer has remained an attractive concept. Extracellular vesicles (EVs) have been described to contain mRNA, protein and metabolites that could be selectively loaded [18]. Importantly, EVs have been identified in urine and cancerous alterations in the bladder have been shown to impact on their composition, suggesting that they could serve as a source for non-invasive biomarker identification. Since current non-invasive prostate cancer biomarkers have been proven to have limitations [19–21], urine EVs might provide a future source of novel biomarkers. Here, we describe the current protocol for urine EV isolation we are employing (a setup carried out by the group of Dr. Falcón-Pérez).

### 2.8. Key material

- Ultracentrifuge.

Urine EVs can be isolated through this methodology starting from 50 mL of urine. Urine is centrifuged in a tabletop centrifuge



**Fig. 3.** An immunostaining protocol for *PTEN* in human prostate cancer specimens. (A and B) Representative immunohistochemical images (200×) of *PTEN* expressing (DU145) and *PTEN* deficient (PC3) human tumor xenografts. Asterisks indicate stromal cells. (C) Representative micrographs (200×) of *PTEN* staining in benign hyperplasia tissue (BPH) and prostate cancer (PCa) biopsies with *PTEN* high and low immunoreactivity, arrows indicate epithelial cells and asterisk depict stromal area.

at 3000 rpm for 5 min and the supernatant is filtered (0.22 micra) at the moment of collection, and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . At the time of processing, urine is subjected to a first centrifugation of 11,500g for 30 min, and the supernatant is subjected to a second centrifugation of 118,000g for 90 min. The pellet (containing EVs) is then collected, resuspended in 150  $\mu\text{L}$  of cold PBS and frozen for later processing. The EV pellet is subjected to RNA extraction, for which purpose we employ the miRCURY RNA isolation kit (EXIQON, following manufacturer's instructions, DNase I – Qiagen – digestion) and we carried out the retrotranscription with SuperScript III (Invitrogen). 35  $\mu\text{L}$  of total RNA is isolated, and despite the low yield of RNA in the preparation (in the range of nanograms), 60–80  $\mu\text{L}$  of cDNA can be prepared for qPCR analysis (Fig. 4A and B). As proof of concept of the validity of this method, we have carried out qPCR analysis in 10 benign hyperplasias and 13 prostate cancers (paired samples to the biopsies presented in the histochemical analysis). We have used as positive control a gene known to be present in EVs, *GAPDH* [22] (Fig. 4C).

PTEN has been recently reported to be secreted [23,24], and PTEN protein abundance in blood exosomes has been suggested to reflect status of the tumor suppressor in the prostate tumor [25]. Hence we sought to ascertain to which extent the transcript abundance of PTEN would be altered in urine EVs from prostate cancer patients. The results revealed that both *PTEN* and *GAPDH* were present in all EV preparations analyzed at a similar abundance regardless of the benign of the tumoral status. This result was in discordance with PTEN protein expression, since the urine samples analyzed include cases that we identified as negative for PTEN immunoreactivity (displayed in Fig. 3). This lack of differences could be due to two main factors: first, the content of EVs in urine might be strongly influenced by bladder cells, perhaps more than by prostate cells. Second, PTEN is down-regulated at multiple levels, through mutations, deletions, but also through post-transcriptional regulation, which would not necessarily impact on the transcript levels.

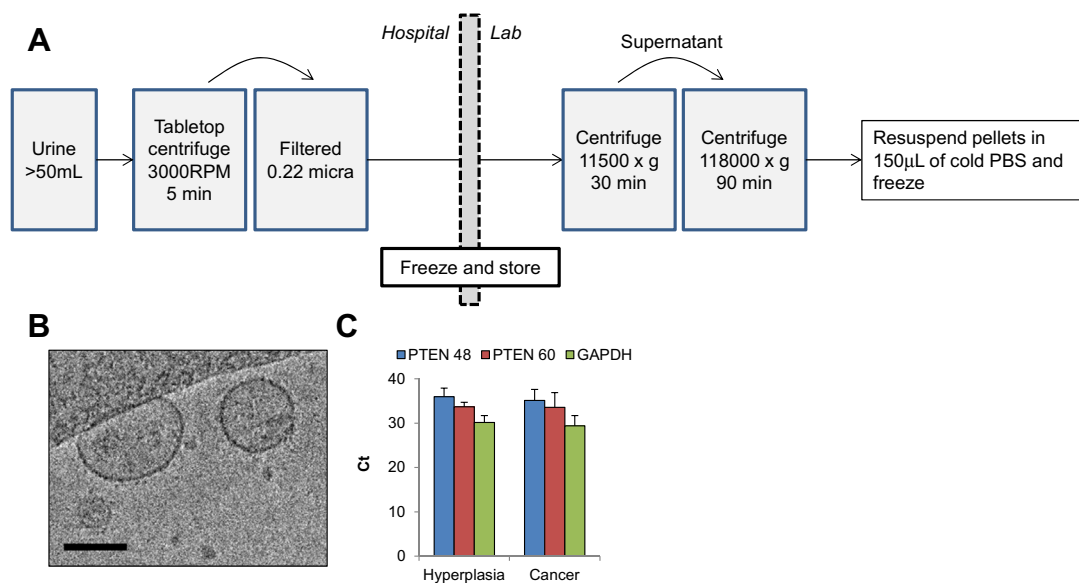
### 3. Discussion

In this methods manuscript, we present approaches that allow us to study the biology of prostate cancer. While much work

remains to be carried out in order to understand the molecular changes in this disease, we believe that the technological improvements that we present herein could serve as the basis to ensure the acquisition of (i) fresh and well diagnosed prostate cancer tissue, (ii) RNA of high quality for OMIC studies, (iii) immunostaining methodology to ascertain the expression of PTEN in human tissues and (iv) isolation of urine EVs for molecular studies.

The interaction between pathologists, uro-oncologists and basic scientists is fundamental in order to reach clinically relevant conclusions in prostate cancer research. The fresh tissue preparation procedure that we present has proven to be sustainable in a hospital with biobanking support and, importantly, to preserve the integrity of the surgical material for diagnostic purposes. Unpublished evidence also suggest that the area/volume ratio of the biopsy is directly proportional to the quality of the RNA obtained, and it is therefore plausible that the dimensions of these punch biopsies will allow molecular studies of the highest quality requirements. It is worth noting that the surgical material in our studies was obtained from robotic surgeries, where the warm ischemia period (the time the surgical piece stays excised and inside the patient) is of 60–80 min, while the cold ischemia (the time elapsed from the extraction of the piece to the snap-freeze of the punch biopsy) is at least of 30 min. These ischemic periods do not alter the RNA quality of the biopsy (which we consider a good readout of tissue integrity) and can be achieved in any urology and pathology service.

Importantly, the molecular studies described herein can greatly benefit from the analysis of public databases. In the recent years, bioinformatic platforms have been developed in order to aid in the analysis of publicly available genomic, epigenomic, transcriptomic and proteomic studies. These platforms now allow quickly browsing through tens of studies (which imply thousands of samples) looking at a gene or pathway of interest. Two outstanding examples of this effort are Oncomine ([www.oncomine.org](http://www.oncomine.org)) [26] and cbiportal ([www.cbiportal.org](http://www.cbiportal.org)) [27,28]. These sites allow the researcher to get information about the status of a gene or genes of interest in a given cancer, the mutational landscape throughout different cancers, the epigenetic modifications regulating its expression and the clinical variables associated with its expression. Therefore, these platforms can serve both as a



**Fig. 4.** A method to harvest RNA from urine EVs. (A) Experimental procedure of the EV isolation from urine samples. (B) Representative image by cryo-Transmission Electron Microscopy (TEM) of the isolated EVs with this approach (scale represents 100 nm). (C) Abundance of *PTEN* (with two probes) and *GAPDH* transcript in urine EVs by real time quantitative PCR.

discovery starting point or a clinical validation end point. In summary, a good balance between experimental approaches with human cancer specimens and data mining studies can maximize the relevance of the conclusions met by the researcher.

### Acknowledgments

Apologies to those whose related publications were not cited due to space limitations. We thank Paolo Nuciforo, Maurizio Scaltriti and Pau Castell for technical advice. David Gil and Sandra Delgado from electron microscopy CIC bioGUNE platform for their technical assistance in the cryo-TEM analysis of EVs. The work of AC is supported by the Ramón y Cajal award, the Basque Department of Industry, Tourism and Trade (Etortek), Health (2012111086) and Education (PI2012-03), Marie Curie (277043), Movember Foundation (GAP1), ISCIII (PI10/01484, PI13/00031) and ERC (336343). N.M.-M. is supported by the Spanish Association Against Cancer (AECC). A.A.-A and L.V.-J are supported by the Basque Government of education. RB is supported by ISCIII (PT13/0010/0052) and A.E. is supported by MICINN (PTA2011-5805-1).

### References

- [1] L. Salmena, A. Carracedo, P.P. Pandolfi, *Cell* 133 (2008) 403–414.
- [2] A. Carracedo, P.P. Pandolfi, *Oncogene* 27 (2008) 5527–5541.
- [3] A. Carracedo, L. Ma, J. Teruya-Feldstein, F. Rojo, L. Salmena, A. Alimonti, A. Egia, A.T. Sasaki, G. Thomas, S.C. Kozma, A. Papa, C. Nardella, L.C. Cantley, J. Baselga, P.P. Pandolfi, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 3065–3074.
- [4] A. Alimonti, A. Carracedo, J.G. Clohessy, L.C. Trotman, C. Nardella, A. Egia, L. Salmena, K. Sampieri, W.J. Haveman, E. Brogi, A.L. Richardson, J. Zhang, P.P. Pandolfi, *Nat. Genet.* 42 (2010) 454–458.
- [5] L.C. Trotman, M. Niki, Z.A. Dotan, J.A. Koutcher, A. Di Cristofano, A. Xiao, A.S. Khoo, P. Roy-Burman, N.M. Greenberg, T. Van Dyke, C. Cordon-Cardo, P.P. Pandolfi, *PLoS Biol.* 1 (2003) E59.
- [6] A. Di Cristofano, B. Pesce, C. Cordon-Cardo, P.P. Pandolfi, *Nat. Genet.* 19 (1998) 348–355.
- [7] Z. Chen, L.C. Trotman, D. Shaffer, H.K. Lin, Z.A. Dotan, M. Niki, J.A. Koutcher, H.I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo, P.P. Pandolfi, *Nature* 436 (2005) 725–730.
- [8] A. Alimonti, C. Nardella, Z. Chen, J.G. Clohessy, A. Carracedo, L.C. Trotman, K. Cheng, S. Varmeh, S.C. Kozma, G. Thomas, E. Rosivatz, R. Woscholski, F. Cognetti, H.I. Scher, P.P. Pandolfi, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 681–693.
- [9] D. DiMitri, A. Toso, J.J. Chen, M. Sarti, S. Pinton, T.R. Jost, R. D'Antuono, E. Montani, R. Garcia-Escudero, I. Guccini, S. Da Silva-Alvarez, M. Collado, M. Eisenberger, Z. Zheng, C. Catapano, F. Grassi, A. Alimonti, *Nature* (2014).
- [10] A. Toso, A. Revandkar, D. Di Mitri, I. Guccini, M. Proietti, M. Sarti, S. Pinton, J. Zhang, M. Kalathur, G. Civenni, D. Jarrossay, E. Montani, C. Marini, R. Garcia-Escudero, E. Scanziani, F. Grassi, P.P. Pandolfi, C.V. Catapano, A. Alimonti, *Cell Rep.* (2014).
- [11] H. Bertilsson, A. Angelsen, T. Viset, E. Anderssen, J. Halgunset, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 70 (2010) 45–53.
- [12] Y. Fukabori, K. Yoshida, K. Nakano, Y. Shibata, H. Yamanaka, T. Oyama, *J. Urol.* 176 (2006) 1204–1207.
- [13] S.H. Margan, D.J. Handelsman, S. Mann, P. Russell, J. Rogers, M.H. Khadra, Q. Dong, *J. Urol.* 163 (2000) 613–615.
- [14] K.M. Scott, P. Fanta, R. Calaluze, B. Dalkin, R.S. Weinstein, R.B. Nagle, *Prostate* 44 (2000) 296–302.
- [15] P.J. Eichhorn, M. Gili, M. Scaltriti, V. Serra, M. Guzman, W. Nijkamp, R.L. Beijersbergen, V. Valero, J. Seoane, R. Bernards, J. Baselga, *Cancer Res.* 68 (2008) 9221–9230.
- [16] E. Gonzalez-Billalabeitia, N. Seitzer, S.J. Song, M.S. Song, A. Patnaik, X.S. Liu, M.T. Epping, A. Papa, R.M. Hobbs, M. Chen, A. Lunardi, C. Ng, K.A. Webster, S. Signoretti, M. Loda, J.M. Asara, C. Nardella, J.G. Clohessy, L.C. Cantley, P.P. Pandolfi, *Cancer Discov.* 4 (2014) 896–904.
- [17] T.L. Lotan, B. Gurel, S. Sutcliffe, D. Esopi, W. Liu, J. Xu, J.L. Hicks, B.H. Park, E. Humphreys, A.W. Partin, M. Han, G.J. Netto, W.B. Isaacs, A.M. De Marzo, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 6563–6573.
- [18] S. Mathivanan, C.J. Fahner, G.E. Reid, R.J. Simpson, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) D1241–D1244.
- [19] F.H. Schroder, J. Hugosson, M.J. Roobol, T.L. Tammela, S. Ciatto, V. Nelen, M. Kwiatkowski, M. Lujan, H. Lilja, M. Zappa, L.J. Denis, F. Recker, A. Paez, L. Maattanen, C.H. Bangma, G. Aus, S. Carlsson, A. Villers, X. Rebillard, T. van der Kwast, P.M. Kujala, B.G. Blijenberg, U.H. Stenman, A. Huber, K. Taari, M. Hakama, S.M. Moss, H.J. de Koning, A. Auvinen, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 981–990.
- [20] H.C. Sox, *N. Engl. J. Med.* 367 (2012) 669–671.
- [21] E.M. Wever, J. Hugosson, E.A. Heijnsdijk, C.H. Bangma, G. Draisma, H.J. de Koning, *Br. J. Cancer* 107 (2012) 778–784.
- [22] E. Zeringer, M. Li, T. Barta, J. Schageman, K.W. Pedersen, A. Neurauter, S. Magdaleno, R. Setterquist, A.V. Vlassov, *World J. Methodol.* 3 (2013) 11–18.
- [23] B.D. Hopkins, B. Fine, N. Steinbach, M. Dendy, Z. Rapp, J. Shaw, K. Pappas, J.S. Yu, C. Hodakoski, S. Mense, J. Klein, S. Pegno, M.L. Sulis, H. Goldstein, B. Amendolara, L. Lei, M. Maurer, J. Bruce, P. Canoll, H. Hibshoosh, R. Parsons, *Science* 341 (2013) 399–402.
- [24] U. Putz, J. Howitt, A. Doan, C.P. Goh, L.H. Low, J. Silke, S.S. Tan, *Sci Signal* 5 (2012) ra70.
- [25] K. Gabriel, A. Ingram, R. Austin, A. Kapoor, D. Tang, F. Majeed, T. Qureshi, K. Al-Nedawi, *PLoS ONE* 8 (2013) e70047.
- [26] D.R. Rhodes, J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey, A.M. Chinnaiyan, *Neoplasia* 6 (2004) 1–6.
- [27] E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B.E. Gross, S.O. Sumer, B.A. Aksoy, A. Jacobsen, C.J. Byrne, M.L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A.P. Goldberg, C. Sander, N. Schultz, *Cancer Discov.* 2 (2012) 401–404.
- [28] J. Gao, B.A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S.O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander, N. Schultz, *Sci. Signal.* 6 (2013) pl1.

## Transcriptomic profiling of urine extracellular vesicles reveals alterations of CDH3 in prostate cancer

Felix Royo<sup>1,2,\*</sup>, Patricia Zuñiga-Garcia<sup>1,\*</sup>, Verónica Torrano<sup>1,\*</sup>, Ana Loizaga<sup>3,\*</sup>, Pilar Sanchez-Mosquera<sup>1</sup>, Aitziber Ugalde-Olano<sup>4</sup>, Esperanza González<sup>1</sup>, Ana R. Cortazar<sup>1</sup>, Laura Palomo<sup>1</sup>, Sonia Fernández-Ruiz<sup>1</sup>, Isabel Lacasa-Viscasillas<sup>3</sup>, Maria Berdasco<sup>5</sup>, James D. Sutherland<sup>1</sup>, Rosa Barrio<sup>1</sup>, Amaia Zabala-Letona<sup>1</sup>, Natalia Martín-Martín<sup>1</sup>, Amaia Arruabarrena-Aristorena<sup>1</sup>, Lorea Valcarcel-Jimenez<sup>1</sup>, Alfredo Caro-Maldonado<sup>1</sup>, Jorge Gonzalez-Tampan<sup>3</sup>, Guido Cachi-Fuentes<sup>3</sup>, Manel Esteller<sup>5</sup>, Ana M. Aransay<sup>1,2</sup>, Miguel Unda<sup>3</sup>, Juan M. Falcón-Pérez<sup>1,2,6,Ω</sup>, Arkaitz Carracedo<sup>1,6,7,Ω</sup>

<sup>1</sup>CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, Biscay, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), Spain

<sup>3</sup>Department of Urology, Basurto University Hospital, Bilbao, Spain

<sup>4</sup>Department of Pathology, Basurto University Hospital, Bilbao, Spain

<sup>5</sup>Cancer Epigenetics and Biology Program, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bizkaia, Spain

<sup>7</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia, Spain

\*These authors contributed equally to this work

ΩThese authors contributed equally to this work

**Correspondence to:** Arkaitz Carracedo, **e-mail:** acarracedo@cicbiogune.es  
Juan M. Falcón-Pérez, **e-mail:** jfalcon@cicbiogune.es

**Keywords:** *extracellular vesicles, exosomes, prostate cancer, urine biomarkers*

**Received:** August 18, 2015      **Accepted:** November 26, 2015      **Published:** January 12, 2016

### ABSTRACT

**Extracellular vesicles (EV) are emerging structures with promising properties for intercellular communication. In addition, the characterization of EV in biofluids is an attractive source of non-invasive diagnostic, prognostic and predictive biomarkers. Here we show that urinary EV (uEV) from prostate cancer (PCa) patients exhibit genuine and differential physical and biological properties compared to benign prostate hyperplasia (BPH). Importantly, transcriptomics characterization of uEVs led us to define the decreased abundance of Cadherin 3, type 1 (CDH3) transcript in uEV from PCa patients. Tissue and cell line analysis strongly suggested that the status of CDH3 in uEVs is a distal reflection of changes in the expression of this cadherin in the prostate tumor. CDH3 was negatively regulated at the genomic, transcriptional, and epigenetic level in PCa. Our results reveal that uEVs could represent a non-invasive tool to inform about the molecular alterations in PCa.**

### INTRODUCTION

In the recent years, the search of biomarkers in urine has focused on the characterization of urinary extracellular vesicles (uEVs), trying to overcome the complexity and variation of this biofluid [1, 2]. Under the denomination of uEVs, there is a complex mixture of vesicles, including exosomes, microvesicles and apoptotic bodies [3, 4]. Although there are no clear markers to distinguish them, exosomes are defined as small membrane vesicles with a

diameter of 40–150 nm formed by inward budding of the membrane of late endosomes resulting in the formation of multivesicular bodies (MVB) fulfilled of intraluminal vesicles. Then, some of these (MVB) fuse to the plasma membrane releasing in this manner the exosomes to the extracellular milieu [5]. Microvesicles or ectosomes refer to plasma membrane shedding vesicles of 0.1–1 μm [6]. Apoptotic bodies are assumed to be of bigger size [7]. uEVs are released by several tissues along the urinary tract and their cargo varies depending on their origin [8].

Evidence of the presence of uEVs belonging to prostate has been already reported [9, 10] and the cargo includes proteins of prostate origin such as prostate-specific membrane antigen (PSMA) [11]. Proteomic analysis of uEVs in PCa patients has been recently carried out with promising results as a source of biomarkers [12] and the use of microRNAs as markers for this disease have been also extensively reported and reviewed [13]. Most of the studies to date focus on the comparative analysis of healthy and PCa patients. This raises the question of the existence of biomarkers that can discriminate PCa from BPH [14], a pathology that has been shown to interfere with well established biomarkers such as prostate-specific antigen (PSA) [15]. In the present work, we aimed at identifying PCa biomarkers within uEVs through the analysis of the uEV transcriptome. We selected transcripts with a presence-absence pattern in BPH and PCa, and we extensively validated the candidate transcript encoded by the *Cadherin 3, type 1* gene (CDH3). Importantly, we corroborated this observation in a miniaturized assay that could facilitate the translation of the results into the clinic. Finally, the analysis of mRNA in prostate tumor tissue from patients revealed alterations in this gene, coherent with genomic transcriptional and epigenetic changes, all pointing at the inhibition of CDH3 in PCa. Overall, our results support that analysis of uEVs could represent a non-invasive method to evaluate and monitor PCa alterations.

## RESULTS

### Characterization of uEVs from BPH and PCa patients

As a first approach, we analyzed the physical characteristics of uEVs from patients with BPH and PCa by comparing more than 23–30 independent preparations from each group (Supplementary Table S1). In order to validate the ultracentrifugation procedure [16] for isolation of uEVs, the presence of double membrane vesicles by cryo-electron microscopy (Figure 1A) and EV markers by western blot [28] was confirmed (Supplementary Figure S1). We next analyzed uEV size and number in urine of BPH and PCa patients. Nanoparticle-tracking analysis (NTA) was performed in samples before and after urine ultracentrifugation. NTA-estimated particle number was comparable before ( $8.9e^{10} \pm 1.47e^{10}$  particles/ml in BPH, and  $9.3e^{10} \pm 1.29e^{10}$  particles/ml in PCa; mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 5$ ;  $p > 0.05$ ) and was reduced in PCa after ultracentrifugation ( $2.49e^8 \pm 2.46e^7$  particles/ml in BPH, and  $1.56e^8 \pm 1.69e^7$  particles/ml in PCa; mean  $\pm$  s.e.m.;  $p = 0.04$ ) (Figure 1B). However, no significant changes were observed in particle size before ( $217 \pm 13.2$  nm in BPH, and  $215.8 \pm 6.9$  nm in PCa; mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 5$ ;  $p > 0.05$ ) or after ultracentrifugation ( $176.6 \pm 6.7$  nm in BPH, and  $182.4 \pm 6.9$  nm in PCa; mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 5$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 1C). It is worth noting that NTA analysis in

samples before ultracentrifugation could detect non-uEV particles and contaminants as positive events (and hence explain the larger number and average size) while after filtration and ultracentrifugation the values obtained are more representative of an uEV-enriched preparation. Although no statistically significant differences were found, NTA analysis revealed a trend to a different size distribution of the uEVs, with a lower abundance of small vesicles (0–100 nm) and a greater abundance of large (150–200 nm) and very large (250–350 nm) vesicles in PCa when compared with BPH (Figure 1D). Of note, we observed a size discrepancy between TEM and NTA analysis of uEVs. Although it warrants further investigation, this fact is probably due to two main factors: the technology employed by NTA to determine particle size and the potential effect of the TEM sample preparation protocol on this parameter.

Further to this characterization, we analyzed the changes in cargo in BPH and PCa. RNA concentration per vesicle was comparable in BPH and PCa uEVs ( $0.017 \pm 0.006$  ng RNA per million uEVs in BPH and  $0.0046 \pm 0.0005$  ng RNA per million uEVs in PCa; mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 9–10$ ; Mann Whitney U  $p = 0.13$ ). Similarly, we did not observe significant differences in protein concentration ( $0.041 \pm 0.01$   $\mu$ g protein per million uEVs in BPH and  $0.019 \pm 0.003$   $\mu$ g protein per million uEVs in PCa; mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 9–10$ ; Mann Whitney U  $p = 0.18$ ).

### Transcriptomic analysis of PCa and BPH uEVs

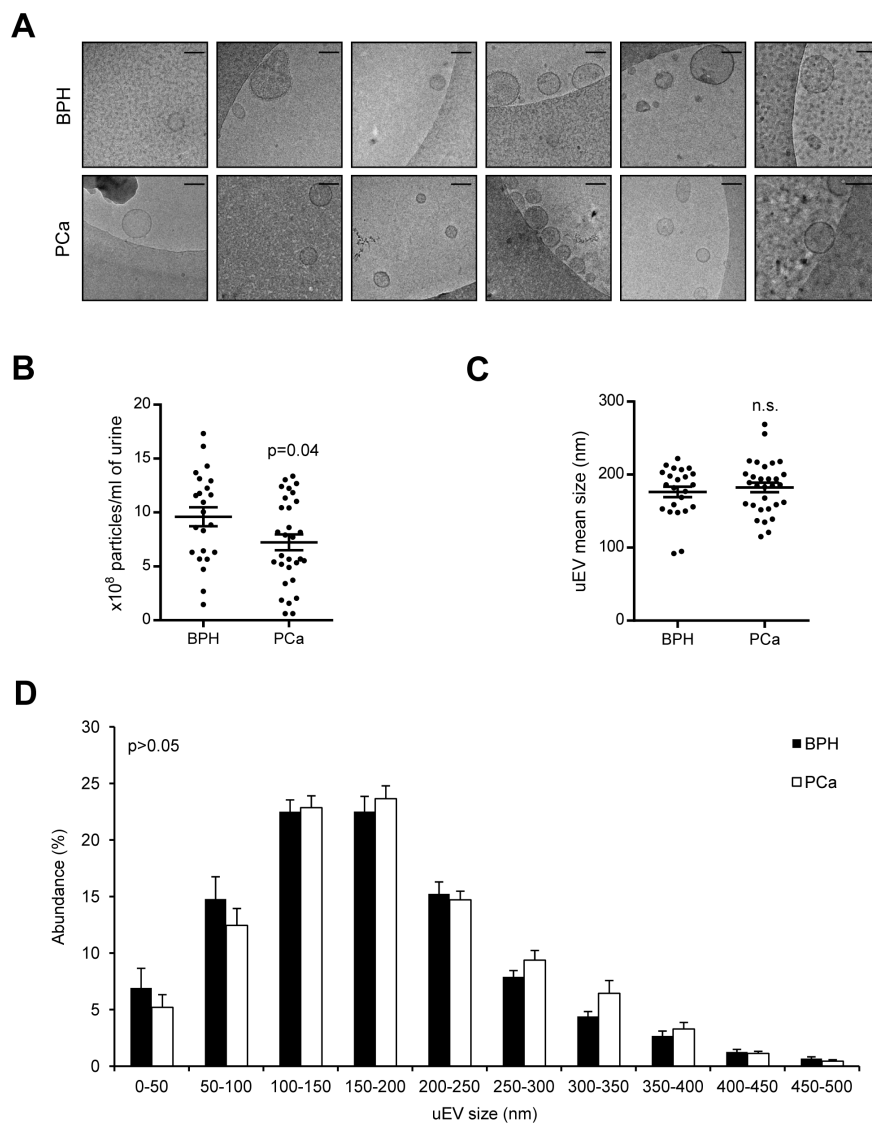
We next aimed at identifying molecular alterations in uEV cargo from PCa patients. It has been recently reported that these particles present a genuinely differential proteome in patients harboring PCa [12]. However, little is known about the transcript content of uEVs and the potential of these molecules to inform about the biological characteristics of PCa, especially when comparing to patients with BPH. To address this question, we extracted RNA of uEVs from BPH and PCa patient samples. First, we observed lack of overt changes in overall RNA size distribution (Figure 2A). Next, we labeled and hybridized BPH and PCa uEV-derived RNA into whole genome Illumina gene expression microarrays. The results showed the detection (detection  $p$ -value  $< 0.01$ ) of 1336 unique transcripts in the two groups analyzed (presence in 50% of the cases in either group was defined as positive, Supplementary Table S3), 1010 in BPH and 956 in PCa (Figure 2B). Venn analysis revealed an overlap of 47.1% from total unique transcripts in BPH and PCa (Figure 2B). We performed a further step in candidate transcript selection by identifying genes that were selectively detected in one of the two biological settings (BPH or PCa, in at least 75% of the cases). Illumina platform provides information about the probability of a probe to present a signal that is different to background noise, for which purpose we established a confidence interval of



99% ( $p < 0.01$ ). The list of differentially detected probes is shown in Figure 2C. In addition, we took advantage of the microarray analysis in order to define housekeeping genes that would have similar abundance in uEVs from BPH and PCa patients. To this end, starting from normalized signal values, we defined genes with no differential abundance ( $p$ -value  $> 0.95$  and fold change no greater than  $\pm 5\%$ ; Supplementary Table S4). From this analysis, we selected two transcripts, Eukaryotic Elongation Factor 1A1 (EEF1A1) and Ribosomal Protein L6 (RPL6), that we monitored in subsequent studies. In addition, we also included Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene supported by prior studies of our group [16].

## Validation of uEV biomarkers of PCa

To ascertain the potential of candidate uEV transcripts, we performed qRT-PCR from an independent set of ultracentrifuge-purified uEV retrotranscribed RNA (using an average of  $1.5 \times 10^7$  uEVs per reaction). Firstly, the abundance of housekeeping transcripts (RPL6, EEF1A1, GAPDH) was strongly correlated (Supplementary Figure S2A), reinforcing the notion of their value as housekeeping transcripts. The use of these controls allowed us to identify 4 cases with lack of amplification in all three transcripts, which was considered an exclusion criterion for the analysis. Secondly, the evaluation of 10 transcripts of interest (From Figure 2C) revealed that two candidates, Cadherin 3, type 1 (CDH3) and CKLF-Like MARVEL Transmembrane Domain



**Figure 1: Physical characterization of uEVs from PCa and BPH samples.** (A) Representatives cryo-TEM micrographs of uEVs isolated from BPH and PCa urine samples. Bar, 100 nm.  $n = 3$ . (B and C) Box-plots showing number (B) or size (C) of particles isolated from each group, indicating the mean and s.e.m. ( $n = 23$  fo BPH and 30 for PCa). (D) Size distribution of the particles isolated from each preparation (Mean  $\pm$  s.e.m. is depicted,  $n = 23$  fo BPH and 30 for PCa). Statistic test: Student  $t$  test.

Containing 3 (CMTM3), exhibited the predicted behavior in the validation dataset (Figure 2D). These two transcripts were predominantly detected in BPH uEVs, whereas the detection rate was below 30% in PCa uEVs. Of note, we confirmed that these transcripts were contained in uEVs, since they exhibited resistance to RNase treatment (Supplementary Figure S2B).

Our results demonstrate that we can identify transcripts with differential abundance in PCa uEVs, employing 50 mL of urine and using an ultracentrifugation-based method for uEV isolation [16]. However, biomarker identification requires miniaturization of the assay with the consequent scaling down of the starting material. To refine our detection method, we employed a commercial exosomal RNA purification procedure (Norgen Biotek) in an independent set of samples that allowed us to reduce urine volume to 10 mL. We then performed qRT-PCR from Norgen-purified retrotranscribed RNA. We evaluated the expression level of the two best candidates, CMTM3 and CDH3. As shown before, the two housekeeping transcripts employed (GAPDH and RPL6) exhibited a strong and significant correlation (Supplementary Figure S2C). Interestingly, this purification method precluded detection of CMTM3, while recapitulated the reduction in CDH3 with higher sensitivity using normalization against RPL6 ( $0.69 \pm 0.1$ ; mean  $\pm$  s.e.m.;  $p = 0.055$ ) and GAPDH ( $0.65 \pm 0.08$ ; mean  $\pm$  s.e.m.;  $p = 0.01$ ) (Figure 2E).

Taken together, our transcriptomic analysis reveals that CDH3 abundance is reduced in PCa uEVs and sets the basis for PCa biomarker search based on uEV transcript analysis.

### uEVs are indicators of PCa alterations

Our results convincingly show that CDH3 abundance is reduced in uEVs from PCa patients. On the basis of these results, we hypothesized that the alteration observed in uEVs might be a reflection of transcriptomic changes in the prostate tumor.

In order to confirm our hypothesis, we studied the expression of CDH3, in a set of BPH and PCa tissue specimens. The results of CDH3 expression analysis demonstrated that it was significantly decreased in tissue from patients with PCa compared to BPH ( $0.52 \pm 0.12$ ; mean  $\pm$  s.e.m.;  $p = 0.018$ ), in full coherence with our observation in uEVs (Figure 3A). Of note, these results could lead to the notion that the association between transcriptomic tumor cell landscape and exosome RNA cargo correlate at high frequency. However, prior studies from our lab showed that known cancer genes, such as PTEN, do not exhibit a direct correlation between uEVs mRNA abundance and PTEN tumor alterations [16], suggesting a selective process in cargo loading into uEVs.

Next, we ascertained the potential extrapolation of this observation to other biological contexts, such as a panel of benign prostate cells and metastatic

prostate cancer cell lines and large human PCa datasets. Interestingly, the expression of CDH3 in prostate cell lines revealed a down-regulation of the transcript in metastatic cancer cell lines (black), compared to benign-immortalized cells (grey) ( $0.17 \pm 0.07$ ; mean  $\pm$  s.e.m.) (Figure 3B). Importantly, this observation was confirmed in two datasets where the expression of PCa specimens was compared to biopsies from healthy patients [24, 25] (Figure 3C) and was in full agreement with a previous report [29].

We also monitored the expression levels of other transcripts identified in uEVs. On the one hand, CMTM3 expression, which was shown to be down-regulated in the ultracentrifugation uEVs (but not detected with Norgen extraction method), showed a significant reduction in PCa compared with BPH tissues, but this result was not reproduced in publicly available PCa datasets and exhibited only a modest trend in PCa cell lines (Supplementary Figure S3A–S3C). On the other hand, our housekeeping genes RPL6 and EEF1A1 showed no consistent alterations throughout the same analytical layout (Supplementary Figure S3A–S3C).

We next ask whether the reduction of CDH3 expression observed in PCa could be extrapolated to other urogenital cancers. Data mining analysis was performed in bladder and renal cancer datasets (www.oncomine.org, [30]). Although there was certain consistency in the alteration of CDH3 expression within the same tumor type, the directionality of the alterations was not preserved among the different tumor types (Supplementary Figure S3D).

In order to address whether gene expression alterations in CDH3 could be translated in a decrease in the protein expression, we took advantage on publicly available initiatives for immunoreactivity analysis. ProteinAtlas (www.proteinatlas.org, [31–35]) allows the visualization of immunohistochemistry (IHC) staining in a wide array of tissues. There was data available for CDH3 staining with high quality IHC-specific antibodies. Importantly, the staining in normal prostate epithelia corroborated the staining of basal prostate epithelial cells, in agreement with reports in this and other epithelial tissues [29, 36, 37] (Figure 3E, middle panel and Supplementary Figure S3F). As predicted, CDH3 expression was decreased in PCa specimens. This result was particularly evident in tumor samples with adjacent non-neoplastic tissue (Figure 3D). Interestingly, CDH3 sub-cellular distribution was altered in tumor cells, with a predominant loss of membrane immunoreactivity (Figure 3D).

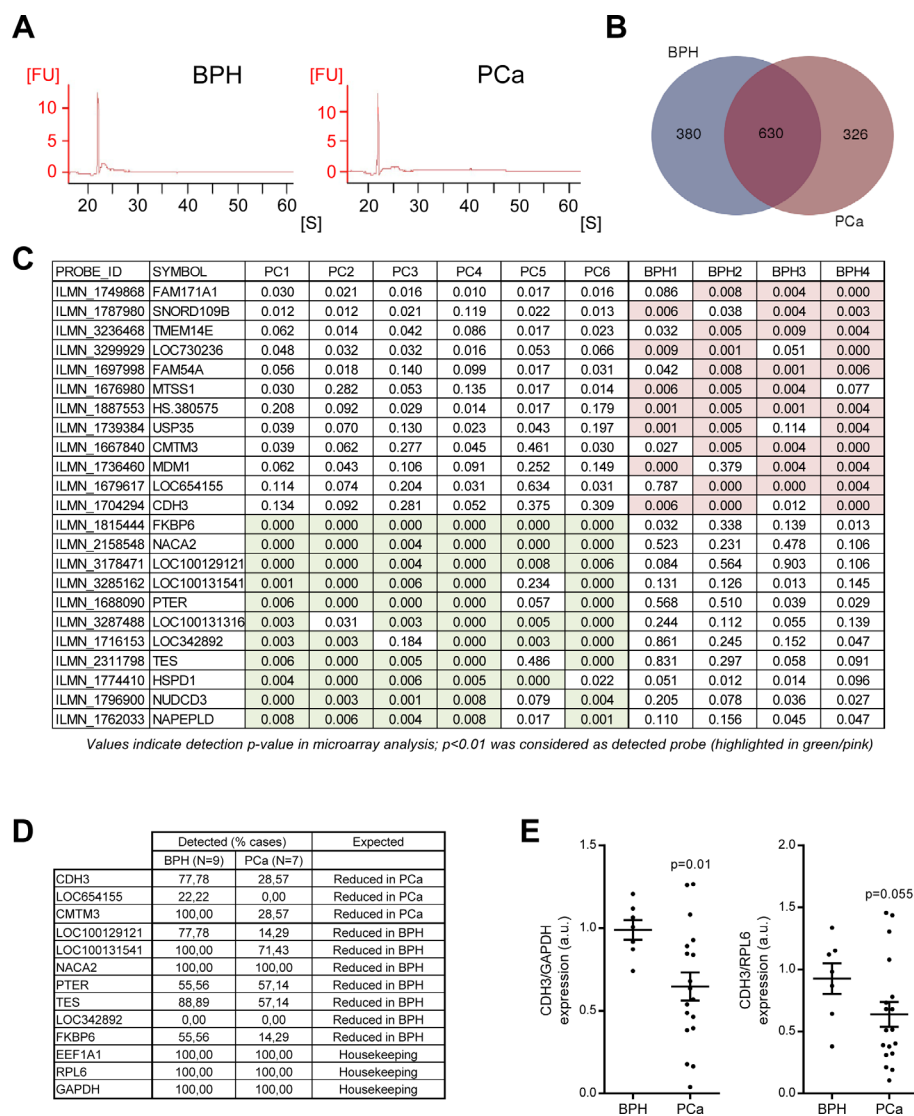
We next asked the molecular cues leading to the down-regulation of CDH3 in PCa. On the one hand, we studied the genomic and epigenetic changes occurring in *CDH3* locus. The genomic analysis showed frequent shallow deletions of *CDH3* in four independent PCa datasets (Figure 4A, [24, 25, 38, 39]). Moreover, epigenetic analysis of *CDH3* promoter indicated increased methylation in PCa and a correlation between the methylation status of the locus and the transcript abundance

(Figure 4B, 4C; [38, 39]), in line with a previous report [29]). On the other hand, we evaluated the association of CDH3 expression with well-known upstream regulators. Tp63 is a basal prostate epithelial marker which is down-regulated in PCa specimens [40–42], and that has been reported to regulate CDH3 expression [43]. We found a strong correlation between the mRNA expression of Tp63 and CDH3 in prostate specimens, which suggests that transcriptional regulation of this cadherin downstream p63 is at play in PCa (Figure 4D). Altogether, our results indicate that genomic loss,

transcriptional regulation and promoter methylation contribute to the down-regulation of CDH3 in PCa.

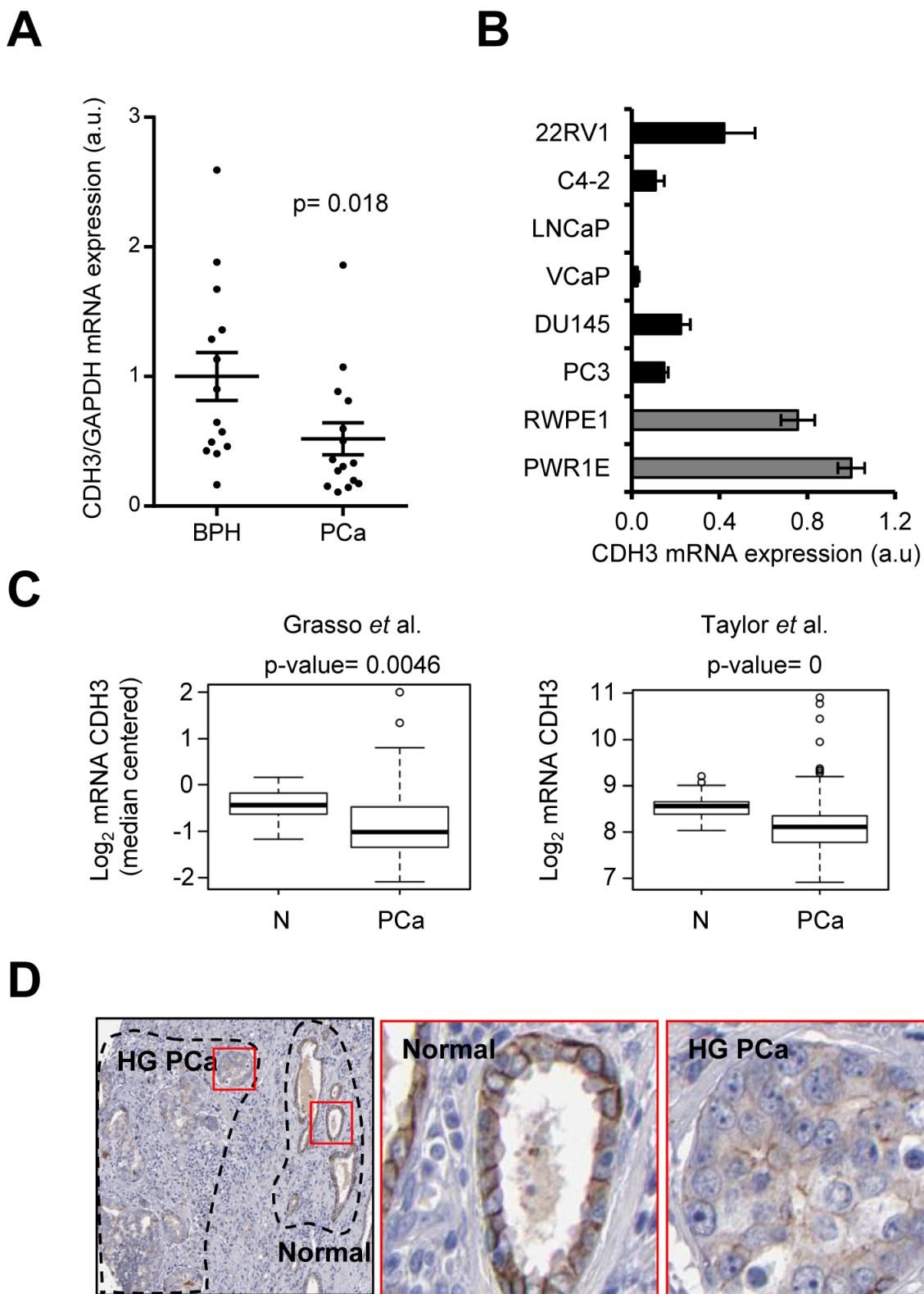
## DISCUSSION

Extracellular vesicles including exosomes have been detected and characterized in urine [2, 44, 45]. These vesicles vary in composition and are associated with different diseases [12, 46]. Importantly, recent evidence suggests that PCa might exhibit alterations in the composition of uEVs [12, 47, 48]. The majority of



**Figure 2: Transcriptomic analysis of uEVs reveals transcripts with differential abundance in BPH and PCa.**

(A) Representative analysis of RNA size distribution obtained from the Bioanalyzer analysis of uEV preparations.  $n = 4-6$ . (B) Venn diagram depicting the number of unique transcripts identified in each experimental condition ( $n = 4$  for BPH and  $n = 6$  for PCa). (C) Transcripts exhibiting a presence-absence pattern in BPH and PCa. The transcripts shown complied with the requirements of being absent in one condition and with a minimum presence of 75% of cases in the other. Detection  $p$ -value is presented, where a limit was established in  $p < 0.01$  in the microarray analysis (significant conditions are highlighted in pink or green in BPH and PCa, respectively). (D) Detection of ultracentrifugation-purified candidate uEV transcripts by qRT-PCR. Detection was established as consistent amplification in the technical settings employed in the assay.  $n = 7$  for BPH and  $n = 9$  for PCa. (E) Transcript abundance of CDH3 relative to GAPDH (*left*) and RPL6 (*right*) in Norgen-purified uEVs-associated RNA samples.  $n = 6-7$  for BPH and  $n = 18$  for PCa. FU: fluorescence units. S: seconds. Error bar represents s.e.m. a.u. = Arbitrary units. Statistic test: Mann Whitney  $U$  test (E).

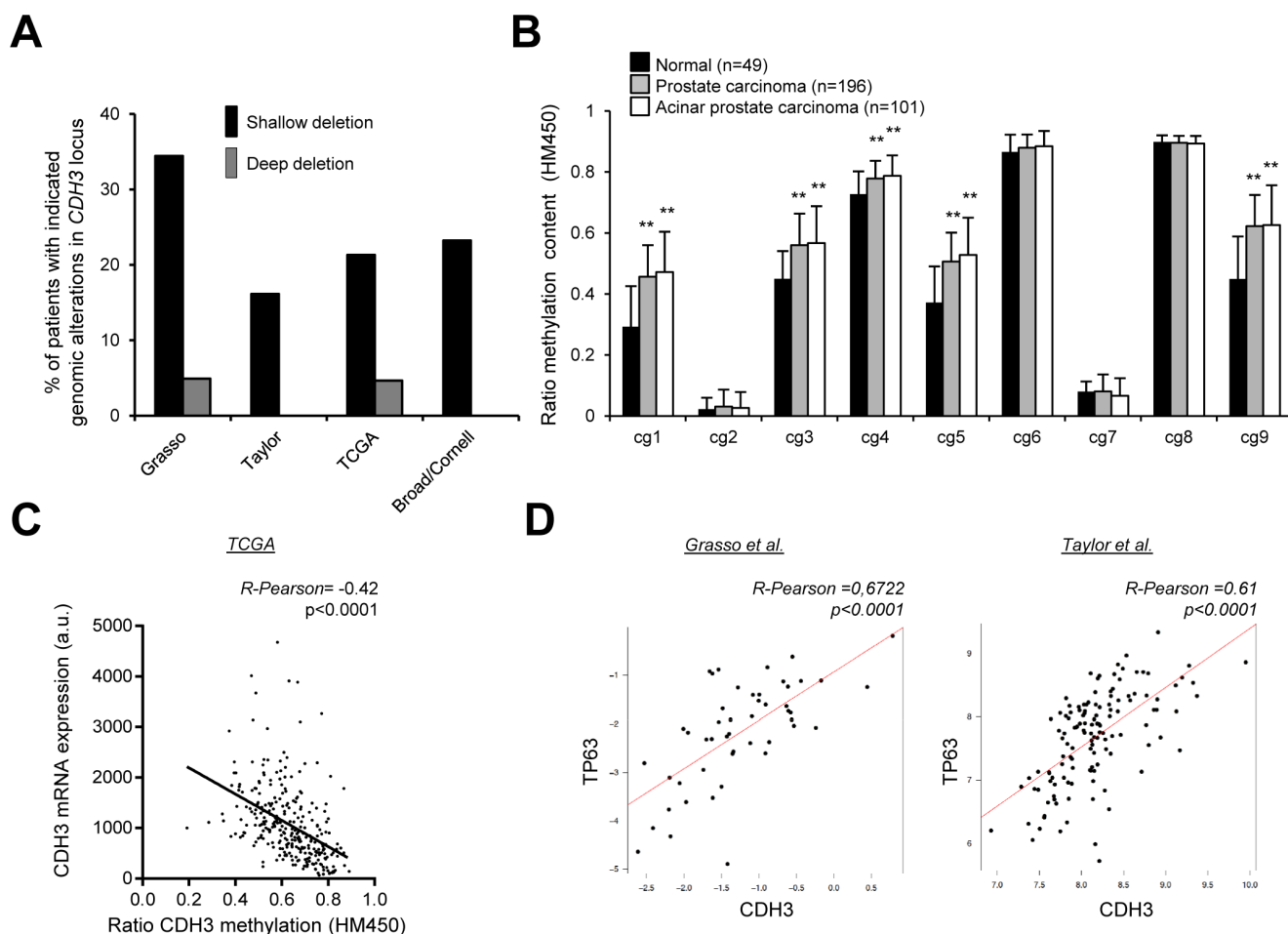


**Figure 3: CDH3 expression is reduced in PCa specimens.** (A) CDH3 expression in tissue biopsies from BPH and PCa. CDH3 expression relative to GAPDH is shown.  $n = 14$  for BPH and  $n = 15$  for PCa. (B) CDH3 expression in a panel of metastatic prostate cancer cell lines (black bars) and benign immortalized prostate cell lines (grey bars) relative to beta-Actin.  $n = 3$ . (C) CDH3 expression in two PCa datasets (Taylor PCa  $n = 150$ , normal  $n = 29$ ; Grasso PCa  $n = 76$ , normal  $n = 12$ ). (D) Representative images of immunohistochemical detection of CDH3 protein in PCa. Middle panel corresponds to a normal area and right panel to high grade PCa (HG PCa). Data source: Human Protein Atlas. Statistic test: Mann Whitney  $U$  test (A), Student  $t$  test (C).

the studies are carried out comparing healthy individuals with PCa patients. It is worth noting that there is an increasing incidence of BPH in association with age [14], and the interference that this might introduce to biomarker identification is poorly understood. To address this question, we have performed a transcriptomics analysis comparing the mRNA content of uEVs from patients with BPH or PCa. The results reveal that urine from these two groups have significant alterations in vesicle number. Little is known about alterations in EV production in different pathologies as compared to the nature of its cargo and this aspect warrants further investigation. Importantly, we found a markedly different transcriptomics profile in uEVs from BPH and PCa. We were able to reduce a whole genome analysis (which revealed 1336 transcripts detected in uEV preparations) to two candidate transcripts (CMTM3 and CDH3) with decreased abundance in PCa. Interestingly, the miniaturization of the assay employing

an alternative purification method revealed that CMTM3 detection is sensitive to the approach used. This suggests that the detection of uEV transcripts might be affected by the uEV purification protocol and calls for further refinement and characterization of the selectivity and specificity of the uEV isolation methods.

Placental cadherin (P-Cad or CDH3) has been widely studied in cancer [37, 49–59]. This protein regulates cell-cell adhesion processes and cellular differentiation. Interestingly, both oncogenic and tumor suppressive activities of this gene have been described in tissue-specific manner [37, 49–59]. We observe that CDH3 mRNA levels are down-regulated in PCa. This is coherent with preliminary observations at the protein level. It has been suggested that CDH3 is down-regulated and exerts tumor suppressive functions in hepatocellular carcinoma [50] and a prior study reported changes of CDH3 in PCa [29]. Our data suggest that CDH3 may be exerting tumor suppressive activities in PCa.



**Figure 4: Evaluation of the molecular events accounting for CDH3 down-regulation in PCa.** (A) Analysis of the genomic alterations in *CDH3* locus in four PCa databases (Taylor  $n = 93$ , Grasso  $n = 61$ , TCGA  $n = 258$ , Broad  $n = 56$ ). (B and C) Promoter methylation analysis from TCGA database evaluating methylation in *CDH3* locus (B)  $n = 49$  for normal tissue,  $n = 101$  acinar PCa and  $n = 196$  for PCa) and the correlation between methylation status and CDH3 mRNA expression (C)  $n = 294$ ). (D) Correlation analysis between CDH3 and TP63 expression in two independent datasets. (Grasso,  $n = 49$ ; Taylor,  $n = 131$ ; primary tumors). Statistic test: Student  $t$  Test (B); Pearson's coefficient ( $R$ ) (C, D).

We show that the regulation of CDH3 expression in PCa occurs at multiple levels. On the one hand, genomic and epigenetic analysis strongly suggests that deletion and methylation of the locus accounts for changes in expression. On the other hand, we find potential regulations at the level of upstream transcriptional regulators. Prior studies showed that CDH3 is a basal epithelial cell marker [29, 37]. Interestingly, Tp63, an upstream regulator of CDH3 [36], presents similar behavior to our gene of interest. Tp63 localizes to basal epithelial cells and is down-regulated in PCa [40–42, 60]. Our correlation analysis in public PCa supports the notion that p63 is a transcriptional upstream regulator of CDH3.

Of note, immunoreactivity analysis has provided preliminary evidence of mis-localization of CDH3 in PCa cells compared to non-tumoral counterparts, Interestingly, this alteration is also observed in other cancers and is associated to poor prognosis [59].

Altogether, our data show multiple means of regulation (genomic loss, DNA methylation, transcriptional regulation, and protein mis-localization) that could potentially lead to the alteration of CDH3 function in PCa.

The function of EVs in cell communication and cancer aggressiveness has emerged in the past years [61, 62]. While their use as source of biomarkers is under intense investigation, there is limited evidence about their potential role as readouts of the tumoral genetic alterations [9]. This study informs about the properties of uEVs to reflect genetic alterations in the tumor of origin. We find that the decrease in abundance of CDH3 in uEVs is coherent with mRNA changes in the prostate tumor cells. This data opens new avenues in the non-invasive characterization of genetic alterations in PCa using uEVs, with the consequent potential for patient stratification.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patient samples and cell lines analysis**

All urine samples were obtained from the Basque Biobank for research (BIOEF, <http://www.biobancovasco.org>, Basurto University Hospital) upon informed consent and with evaluation and approval from the corresponding ethics committee (CEIC code OHEUN11-12 and OHEUN14-14). Inclusion criteria: For BPH patients, samples were obtained from cases with normal PSA, with symptomatic alterations (polyuria, distress), and that were scheduled for surgery. For PCa cases, samples were obtained from patients with primary localized cancer diagnosed *de novo* and that were scheduled for radical prostatectomy. Urine (40–100 ml) was collected by spontaneous urination between 8–10 AM, in fasting conditions. Patient information, tumor characteristics and urine volume is described in Supplementary Table S1. For prostate tissue specimens, samples were prepared and

diagnosed as described in [16]. Cell lines were cultured as described in [17] and RNA was harvested in conditions of exponential growth.

### **Urine extracellular vesicle purification**

uEV isolation by ultracentrifugation was performed as described in [16]. Briefly, urine was centrifuged at  $2000 \times g$  for 5 min to remove cell debris and filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  pore-filter before frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . For uEV isolation sample was thawed and subjected to two sequential centrifugations of  $11500 \times g$  for 30 min and second  $118000 \times g$  for 90 minutes. The pellet containing uEVs was resuspended in 150  $\mu\text{l}$  of cold PBS and frozen for later processing. RNase treatment was not performed unless otherwise specified.

### **Western blot**

Western blot was performed as described [18], using CD26 (Abcam, Cambridge, UK), CD63 (clone H5C6; from Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, US), CD13 (clone 3D8; from Santa Cruz Biotechnology Inc.), FLT1 (clone 18; from BD Biosciences) and AQP2 (Sigma-Aldrich) antibodies.

### **Transmission electron microscopy (TEM) analysis**

For cryo-electron microscopy, uEV preparations were directly adsorbed onto glow-discharged holey carbon grids (100 Holey carbon film of Cu with mess 200; Quantifoil®, Germany). Grids were blotted at 95% humidity and rapidly plunged into liquid ethane with the aid of VITROBOT (Maastricht Instruments BV, The Netherlands). Vitrified samples were imaged at liquid nitrogen temperature using a JEM-2200FS/CR transmission cryo-electron microscope (JEOL, Japan) equipped with a field emission gun and operated at an acceleration voltage of 200 kV.

### **Size analysis and size distribution**

Size distribution within uEV preparations was analyzed by nanoparticle-tracking analysis (NTA) by measuring the rate of Brownian motion using a NanoSight LM10 system (Malvern, U.K.), which is equipped with a fast video capture and particle-tracking software. NTA post-acquisition settings were kept constant for all samples, and each video was analyzed to give the mean, mode, and median vesicle size, as well as an estimation of the concentration [19]. For each preparation, two videos of 30 seconds each were taken. For each video, at least 200 tracks were completed in post-capture tracking analysis.

## Transcriptomic analysis

Total RNA isolation from uEV was achieved by RNeasy columns (Qiagen, Inc). The integrity, size and quantification were evaluated in RNA Pico Chips (Bioanalyzer; Agilent Technologies). For transcriptomic analysis of mRNA-associated uEVs, Illumina whole genome (HumanHT-12\_V4.0; DirHyb, nt) method was used as reported [20]. cRNA synthesis was obtained out of 2–25 ng of Total RNA, with TargetAmp™ Nano-g™ Biotin-aRNA Labeling Kit for the Illumina® System (Epicentre, Cat# TAN07924) and subsequent amplification, labelling and hybridization were performed according to “Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization” Illumina Inc.’s protocol, except the hybridization cRNA concentration, which was 285 ng instead of the standard 750 ng. Raw expression data were background-corrected, log<sub>2</sub>-transformed and quantile-normalized using the lumi R package [21], available through the Bioconductor repository. Probes with a “detection *p*-value” lower than 0.01 in at least one sample were regarded as detected.

## Retrotranscription and quantitative real time PCR analysis

To extract RNA from uEVs isolated by ultracentrifugation, we employed miRCURY™ RNA Isolation Kit Cell & Plant (Exiqon). In average, 1.5e<sup>7</sup> vesicles were used per retrotranscription reaction. In addition, a set of samples was extracted by Norgen Biotek Exosomal RNA purification kit, following the manufacturers’ instructions. For cell lines, RNA was extracted using NucleoSpin® RNA isolation kit from Macherey-Nagel (ref: 740955.240C). cDNA was synthesized from 0.1–1 µg of RNA using Superscript III (Life Technologies) following the manufacturer’s recommendations. For prostate tissue samples, RNA was extracted as reported in [16]. Quantitative Real Time PCR (Taqman qRT-PCR) was performed as previously described [18]. Universal Probe Library (Roche) primers and probes employed are detailed in Supplementary Table S2. β-ACTIN (Hs99999903\_m1) and GAPDH (Hs02758991\_g1) housekeeping assays were from Applied Biosystems and showed similar results.

## DNA methylation

Raw intensity *CDH3* DNA methylation was extracted from The Cancer Genome Atlas dataset (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) based on Illumina’s 450K methylation array. Data analysis from normal tissues (*n* = 49), prostate carcinoma (*n* = 196) and acinar prostate carcinoma (*n* = 101) were included. A three step-based normalization procedure was performed using the lumi

[21] package available for Bioconductor [22], under the R statistical environment [23], consisting in color bias adjustment, background level adjustment and quantile normalization across arrays, as specified in [21]. Methylation level (β-value) for each of the 485, 577 CpG sites was calculated as the ratio of methylated signal divided by the sum of methylated and unmethylated signals plus 100. After normalization step, probes related to X and Y chromosomes were removed as well as those containing a SNPs with a frequency > 1% (1000 Genome project) in the probe sequence or interrogated CpG site.

## Bioinformatics analysis and statistics

The following statistical analysis were employed:

Database normalization: all the datasets used for the data mining analysis were downloaded from GEO and subjected to background correction, log<sub>2</sub> transformation and quartile normalization. In the case of using a pre-processed dataset, this normalization was reviewed and corrected if required.

For *CDH3* genomic analysis, data from PCa patients with copy number alteration information in Taylor [24], Grasso [25], Broad/Cornell [26] and Robinson [27] et al. datasets was extracted from *cbiportal.org*.

## Correlation analysis

Pearson correlation test was applied to analyze the relation between paired genes. From this analysis, Pearson’s coefficient (R) indicates the existing linear correlation (dependence) between two variables *X* and *Y*, giving a value between +1 and –1 (both included), where 1 is total positive correlation, 0 is no correlation, and –1 is total negative correlation. The *p*-value indicates the significance of this R coefficient.

## Statistical analysis

Data represent mean ± s.e.m. of pooled experiments unless otherwise stated. For data mining analysis, ANOVA test was used for multi-component comparisons. Student T test or Mann Whitney *U* test for two-group parametric or non-parametric comparisons, respectively. The confidence level used for all the statistical analyses was of 0.95 (alpha value = 0.05). Two-tail statistical analysis was applied for experimental design without predicted result and one-tail for validation experiments.

## ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

Apologies to those whose related publications were not cited due to space limitations. We thank David Gil and Sandra Delgado from electron microscopy CIC bioGUNE platform for their technical assistance in the cryo-TEM analysis of EVs. We are thankful to the Basque Biobank

for research (BIOEF), for the acquisition, maintenance and distribution of urine samples. The work of AC is supported by the Ramón y Cajal award, the Basque Department of Industry, Tourism and Trade (Etortek), Health (2012111086) and Education (PI2012–03), Marie Curie (277043), Movember Foundation (GAP1), ISCIII (PI10/01484, PI13/00031) and ERC (336343). The work of JF-P is supported by ISCIII (PI12/01604). RB is supported by MINECO (BFU2014-52282-P, BFU2011-25986) and Basque Government (PI2012/42). N.M-M. is supported by the Spanish Association Against Cancer (AECC). A.A-A and L.V-J are supported by the Basque Government of education.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5:1760–1771.
- Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:13368–13373.
- Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borrás FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012; 10:e1001450.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, friends. *J Cell Biol*. 2013; 200:373–383.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*. 2010; 73:1907–1920.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009; 19:43–51.
- Crescitelli R, Lasser C, Szabo TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, Buzas EI, Lotvall J. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles*. 2013; 2.
- Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Paunescu TG, Da Silva N, Brown D, Russo LM. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int*. 2010; 78:191–199.
- Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, Widmark A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*. 2009; 100:1603–1607.
- Duijvesz D, Luider T, Bangma CH, Jenster G. Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. *Eur Urol*. 2011; 59:823–831.
- Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J, Court J, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med*. 2009; 7:4.
- Overbye A, Skotland T, Koehler CJ, Thiede B, Seierstad T, Berge V, Sandvig K, Llorente A. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget*. 2015; 6:30357–76. doi: 10.18632/oncotarget.4851.
- Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Frontiers in genetics*. 2013; 4:36.
- Priest R, Garzotto M, Kaufman J. Benign prostatic hyperplasia: a brief overview of pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Techniques in vascular and interventional radiology*. 2012; 15:261–264.
- Pienta KJ. Critical appraisal of prostate-specific antigen in prostate cancer screening: 20 years later. *Urology*. 2009; 73:S11–20.
- Ugalde-Olano A, Egia A, Fernandez-Ruiz S, Loizaga-Iriarte A, Zuniga-Garcia P, Garcia S, Royo F, Lacasa-Viscasillas I, Castro E, Cortazar AR, Zabala-Letona A, Martin-Martin N, Arruabarrena-Aristorena A, et al. Methodological aspects of the molecular and histological study of prostate cancer: focus on PTEN. *Methods*. 2015; 77–78:25–30.
- Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, Go G, Nhung D, Hong K, Jang SC, Kim SH, Park KS, Kim OY, et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 2015; 31:933–939.
- Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 2010; 18:11–22.
- Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, Quist MJ, Jing X, Lonigro RJ, Brenner JC, Asangani IA, Ateeq B, Chun SY, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012; 487:239–243.
- Jarrard DF, Paul R, van Bokhoven A, Nguyen SH, Bova GS, Wheelock MJ, Johnson KR, Schalken J, Bussemakers M, Isaacs WB. P-Cadherin is a basal cell-specific epithelial marker that is not expressed in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 1997; 3:2121–2128.
- Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 2004; 6:1–6.
- Berglund L, Bjorling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Szigartyo CA, Persson A, Ottosson J, Wernerus H, Nilsson P, Lundberg E, Sivertsson A, Navani S, et al. A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7:2019–2027.
- Ponten F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas—a tool for pathology. *J Pathol*. 2008; 216:387–393.



24. Uhlen M, Bjorling E, Agaton C, Szigyarto CA, Amini B, Andersen E, Andersson AC, Angelidou P, Asplund A, Asplund C, Berglund L, Bergstrom K, Brumer H, et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005; 4:1920–1932.
25. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 347:1260419.
26. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Bjorling L, Ponten F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol*. 2010; 28:1248–1250.
27. Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, Oliveira P, Carvalho J, Ribeiro AS, Caldeira J, Costa AM, Simoes-Correia J, Oliveira MJ, Pinheiro H, Pinho SS, Mateus R, et al. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826:297–311.
28. Vieira AF, Ricardo S, Ablett MP, Dionisio MR, Mendes N, Albergaria A, Farnie G, Gerhard R, Cameselle-Teijeiro JF, Seruca R, Schmitt F, Clarke RB, Paredes J. P-cadherin is coexpressed with CD44 and CD49f and mediates stem cell properties in basal-like breast cancer. *Stem Cells*. 2012; 30:854–864.
29. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012; 2:401–404.
30. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013; 6:p11.
31. Grisanzio C, Signoretti S. p63 in prostate biology, pathology. *J Cell Biochem*. 2008; 103:1354–1368.
32. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol*. 2000; 157:1769–1775.
33. Weinstein MH, Signoretti S, Loda M. Diagnostic utility of immunohistochemical staining for p63, a sensitive marker of prostatic basal cells. *Mod Pathol*. 2002; 15:1302–1308.
34. Shimomura Y, Wajid M, Shapiro L, Christiano AM. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development*. 2008; 135:743–753.
35. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, Wang NS, Knepper MA. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:363–379.
36. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS, Gonzales PA, Star RA, Knepper MA. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology*. 2005; 10:283–290.
37. Perez A, Loizaga A, Arceo R, Lacasa I, Rabade A, Zorroza K, Mosen-Ansorena D, Gonzalez E, Aransay AM, Falcon-Perez JM, Unda-Urzaiz M, Royo F. A Pilot Study on the Potential of RNA-Associated to Urinary Vesicles as a Suitable Non-Invasive Source for Diagnostic Purposes in Bladder Cancer. *Cancers*. 2014; 6:179–192.
38. Duijvesz D, Burnum-Johnson KE, Gritsenko MA, Hoogland AM, Vredendregt-van den Berg MS, Willemsen R, Luider T, Pasatolic L, Jenster G. Proteomic profiling of exosomes leads to the identification of novel biomarkers for prostate cancer. *PLoS One*. 2013; 8:e82589.
39. Duijvesz D, Versluis CY, van der Fels CA, Vredendregt-van den Berg MS, Leivo J, Peltola MT, Bangma CH, Pettersson KS, Jenster G. Immuno-based detection of extracellular vesicles in urine as diagnostic marker for prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015.
40. Baek S, Lee YW, Yoon S, Baek SY, Kim BS, Oh SO. CDH3/P-Cadherin regulates migration of HuCCT1 cholangiocarcinoma cells. *Anat Cell Biol*. 2010; 43:110–117.
41. Bauer R, Valletta D, Bauer K, Thasler WE, Hartmann A, Muller M, Reichert TE, Hellerbrand C. Downregulation of P-cadherin expression in hepatocellular carcinoma induces tumorigenicity. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7:6125–6132.
42. Hibi K, Goto T, Mizukami H, Kitamura YH, Sakuraba K, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y. Demethylation of the CDH3 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2009; 29:2215–2217.
43. Hibi K, Kitamura YH, Mizukami H, Goto T, Sakuraba K, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y. Frequent CDH3 demethylation in advanced gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 2009; 29:3945–3947.
44. Lysne D, Johns J, Walker A, Ecker R, Fowler C, Lawson KR. P-cadherin potentiates ligand-dependent EGFR and IGF-1R signaling in dysplastic and malignant oral keratinocytes. *Oncol Rep*. 2014; 32:2541–2548.
45. Milicic A, Harrison LA, Goodlad RA, Hardy RG, Nicholson AM, Presz M, Sieber O, Santander S, Pringle JH, Mandir N, East P, Obszynska J, Sanders S, et al. Ectopic expression of P-cadherin correlates with promoter hypomethylation early in colorectal carcinogenesis and enhanced intestinal crypt fission *in vivo*. *Cancer Res*. 2008; 68:7760–7768.
46. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:5869–5877.
47. Sousa B, Ribeiro AS, Nobre AR, Lopes N, Martins D, Pinheiro C, Vieira AF, Albergaria A, Gerhard R, Schmitt F,

- Baltazar F, Paredes J. The basal epithelial marker P-cadherin associates with breast cancer cell populations harboring a glycolytic and acid-resistant phenotype. *BMC Cancer*. 2014; 14:734.
48. Taniuchi K, Nakagawa H, Hosokawa M, Nakamura T, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Katagiri T, Nakamura Y. Overexpressed P-cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating rho-family GTPases. *Cancer Res*. 2005; 65: 3092–3099.
  49. Yi S, Yang ZL, Miao X, Zou Q, Li J, Liang L, Zeng G, Chen S. N-cadherin and P-cadherin are biomarkers for invasion, metastasis, and poor prognosis of gallbladder carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2014; 210:363–368.
  50. Mandeville JA, Silva Neto B, Vanni AJ, Smith GL, Rieger-Christ KM, Zeheb R, Loda M, Libertino JA, Summerhayes IC. P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells. *BJU Int*. 2008; 102:1707–1714.
  51. Signoretti S, Pires MM, Lindauer M, Horner JW, Grisanzio C, Dhar S, Majumder P, McKeon F, Kantoff PW, Sellers WR, Loda M. p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:11355–11360.
  52. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, Becker A, Hoshino A, Mark MT, Molina H, Xiang J, Zhang T, Theilen TM, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*. 2015; 17:816–826.
  53. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012; 18:883–891.
  54. Nardella C, Chen Z, Salmena L, Carracedo A, Alimonti A, Egia A, Carver B, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Aberrant Rheb-mediated mTORC1 activation and Pten haploinsufficiency are cooperative oncogenic events. *Genes Dev*. 2008; 22:2172–2177.
  55. Carracedo A, Weiss D, Leliaert AK, Bhasin M, de Boer VC, Laurent G, Adams AC, Sundvall M, Song SJ, Ito K, Finley LS, Egia A, Libermann T, et al. A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2012; 122:3088–3100.
  56. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. 2011; 7:780–788.
  57. Ruiz de Eguino G, Infante A, Schlangen K, Aransay AM, Fullaondo A, Soriano M, Garcia-Verdugo JM, Martin AG, Rodriguez CI. Sp1 transcription factor interaction with accumulated prelamin a impairs adipose lineage differentiation in human mesenchymal stem cells: essential role of sp1 in the integrity of lipid vesicles. *Stem Cells Transl Med*. 2012; 1:309–321.
  58. Du P, Kibbe WA, Lin SM. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*. 2008; 24:1547–1548.
  59. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004; 5:R80.
  60. Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (Vienna, Austria Vienna, Austria). 2011.
  61. Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, Park K, Kitabayashi N, MacDonald TY, Ghandi M, Van Allen E, Kryukov GV, Sboner A, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell*. 2013; 153:666–677.
  62. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, Montgomery B, Taplin ME, Pritchard CC, Attard G, Beltran H, Abida W, Bradley RK, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*. 2015; 161:1215–1228.

Title:

Different EV enrichment methods adapted for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles in human samples.

Authors:

Felix Royo<sup>1,2</sup>, Patricia Zuñiga-Garcia<sup>1</sup>, Pilar Sanchez-Mosquera<sup>1</sup>, Ainara Egia<sup>3</sup>, Amparo Perez<sup>4</sup>, Ana Loizaga<sup>4</sup>, Raquel Arceo<sup>4</sup>, Isabel Lacasa<sup>4</sup>, Ainara Rabade<sup>4</sup>, Edurne Arrieta<sup>3</sup>, Roberto Bilbao<sup>3</sup>, Miguel Unda<sup>4</sup>, Arkaitz Carracedo<sup>1,5</sup> and Juan M. Falcon-Perez<sup>1,2,5</sup>

Affiliation:

<sup>1</sup>CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, 801 building, 48160, Derio, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), 28029, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Basque Biobank. Basque Foundation for Health Innovation and Research-BIOEF. 48902, Barakaldo. Spain

<sup>4</sup>Department of Urology, Basurto University Hospital, 48013, Bilbao, Spain

<sup>5</sup>Ikerbasque, Basque foundation for science, 48013, Bilbao, Spain

Correspondence:

Juan M Falcon-Perez, Exosomes Lab. CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia, Bldg. 801A. Derio 48160 Bizkaia (SPAIN). [jfalcon@cicbiogune.es](mailto:jfalcon@cicbiogune.es)

Abstract: Urine sample analysis has an irreplaceable value as a non-invasive method for the diagnosis and follow-up of diseases. However, only urinary extracellular vesicles (uEVs) seem to be able to preserve protein and RNA from the degradation inherent to urine preservation. In recent years, methods for uEVs enrichment that require low volumes of urine and no sophisticated equipment have been developing with different success. In parallel with the differential ultracentrifugation procedure, we have performed a comparative study of four of these methods including a lectin-based purification, Exoquick, Total Exosome Isolation from Invitrogen and an in-house modified procedure of the exosomal RNA kit from Norgen. The analysis of selected genes and proteins markers of extracellular vesicles revealed that each method display differences in specificity and robustness, and importantly each of them seem to isolate a different mixture of uEVs. One of the methods showing the highest performance in terms of gene and protein detections as well as reproducibility was able to detect alterations in uEV from urine samples of prostate cancer patients. This work showed that the analysis of uEV is feasible in a clinical set-up although some cautions in the selection of the enrichment method have to be undertaken for assuring the best performance in clinical samples.

Keywords: urine, isolation of vesicles, mRNA, protein markers, prostate cancer

## Introduction

Urine sample is an ideal source of biomarkers, particularly for diseases of the genitourinary system, because it can be conveniently collected without risk to the patient. Apart of soluble proteins and cell debris, urine samples contain extracellular vesicles (uEVs) (1, 2), whose cargo includes lipids, proteins, mRNA, and microRNA. Unlike tissue biopsy, an invasive and expensive procedure that provides only partial sampling from an organ, uEVs provide a full representation of the entire urinary system (3). Indeed, the analysis of uEVs has revealed markers from different tissues, from kidney to collecting ducts (4). For this reason, the study of uEVs is attractive in the field of biomarker discovery of diseases, and different markers have been proposed for numerous diseases, reviewed elsewhere (5, 6). However, both the variety of methods proposed, and the technical complexity of some of them, makes difficult the translation into clinical practice (7). Although it exists a growing number of commercial solutions, those methods add a new variable, since the results differ from traditional isolation techniques (7, 8).

Certainly, the denomination of uEVs comprehends vesicles released not only from different tissues but also from different cellular compartments. Mainly, exosomes, microvesicles and apoptotic bodies, that differ in their characteristics, although no consensus about markers to classify them have been establish so far (9, 10). Exosomes are 30–150 nm diameter vesicles whose origin is related to the endocytic pathway, accumulating in the cell, in the so-called large multivesicular bodies (11, 12). Microvesicles or ectosomes are, on average, bigger vesicles (100-1000 nm), and they originate by the direct budding from the plasma membrane (13). Moreover, the different subcellular origin of EVs accounts for their specific function and cargo (14), including variations in their proteins and nucleic acids (15). The origin of the vesicles could be overlooked in the initial steps of the biomarker discovery, being the main criterion the analysis of as much types of vesicles as possible, keeping in mind that clinical samples are difficult to obtain. Afterwards, the knowledge about the type of vesicles containing the candidate biomarker could provide clues to improve the diagnosis and develop possible therapeutic strategies.

In the present study, we compared five methods; three commercial kits, a simplified version of the traditional ultracentrifugation, and a lectin-based purification, a method with affinity for glycosylated proteins usually enriched in the surface of uEVs (16, 17). A comparison of their ability to recover protein markers associated to uEVs, and RNA previously associated to these vesicles was achieved in healthy controls. Furthermore, a performance of the most efficient and reproducible method was evaluated in a prostate cancer clinical set-up.

## **Material and Methods**

### *Human samples*

The study follows all the ethical regulations and was approved by the Basque Ethical Committee for Clinical Research (CEIC code 11-12 and 14-14). Samples from 10 healthy volunteers were obtained by collection of the first urine of the morning and an aliquot from each donor was used to determine 13 physicochemical parameters with reactive strips (Urispec plus, Henry-Schein Inc.) (Supplemental Figure 1). Moreover, samples from 28 patients cited for exploratory prostate biopsy were collected previously to initiate the procedure. In all cases, the samples were obtained by spontaneous micturition and previous to sample collection donors were informed about the study and requested to sign the informed consent. For each sample, all the urine was centrifuged at 2,000xg 10 min, filtered through a 0.22 µm-pore membrane, and immediately frozen at -80°C. A total of 19 samples were classified as prostate cancer adenoma (PCA) and 9 as benign prostate hyperplasia (BPH) according to the results of the histological examination, performed by the pathologist of the urology service of Basurto University Hospital (for details see Supplemental Table S1).

### *Urinary EVs enrichment methods*

To compare different uEVs enrichment methods, 100 ml of urine from each healthy donor was thaw and vortexed during the process. Afterwards, the samples were divided in 10 aliquots of 10 ml each of them, to perform the five protocols in duplicated. In Figure 1 are indicated main steps for each methodology. Ultracentrifugation was carried out in a single step, in a Beckman-Coulter 70Ti rotor. The extraction with Exoquick-TC Exosome Precipitation Solution (System Bioscience) was performed according to manufacturer's instructions, as well as the extraction with Total Exosome Isolation solution from urine (Invitrogen, Life technologies). In order to obtain a sample for Western blot analysis, certain modifications were performed in the protocol of Urine Exosome RNA Isolation kit (NORGEN, Biotek corp.). Once urine was mixed with the slurry component, we divided each 10 ml aliquot in three aliquots as detailed in Figure 1. For the extraction of RNA, we employed 7 ml of mix and the finally volume for elution was 35µl. The pellet obtained from 2 ml was mixed with 40 µl 2x NuPAGE LDS Sample Buffer (Life technologies). Finally, the extraction with biotinylated

*Solanum tuberosum* (potato) lectin (STL) (Vector laboratories) was performed as described previously (16). Briefly, the pH of each urine sample was adjusted at 7.5 with NaOH, and the sample was incubated overnight at 4°C with 0.1 mg of biotinylated STL lectin. The lectins were recovered by adding 0.5 mg of Streptavidin-coupled magnetic Dynabeads (Life technologies) and incubated for 1 h at RT. Magnetic beads were recovered with a magnet after washing them twice in PBS. The procedures that required 12-h incubation were started right after thaw the sample and completed at the same time than those that do not require incubations. For each method, we use the abbreviation CEN (ultracentrifugation), NOR (NORGEN), INV (Total Exosome Isolation Solution), EXQ (Exoquick-TC) and LEC (STL purification).

#### *RNA and Protein extraction*

In the case of NORGEN-based method we proceed as described in the previous section. In the remaining four methods, after last centrifugation or magnet beads recovery, each sample was suspended in 100 ul of Exosome Resuspension Buffer (ERB) contained in the Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Life technologies). From that, 70 ul were employed for organic RNA extraction according to manufacturer's protocol, with a final elution volume of 35 ul. After extractions, 1 ul of RNA was analyzed by RNA Pico Chips with a Bioanalyzer (Agilent Technologies). On the other side, 20 ul of ERB were mixed with 20 ul of 2x loading buffer, and incubated 10' at 37°C, 10' at 60°C and 5' at 95°C, and centrifuged at 10,000 xg to carry out the protein analysis. The remaining 10 ul of ERB-suspended material were preserved for electron microscopy analysis.

#### *Western Blot Analysis*

For each sample, 15 ul of the protein extracted in loading buffer were separated under non-reducing conditions on 4–12% pre-casted gels from Life technologies, Inc. After being transferred to nitrocellulose membranes and blocked for 1h (5% milk and 0.05% Tween-20 in PBS), primary antibody was added and incubated by 12-h, followed by PBS washing and the application of secondary HRP-conjugated antibody. The primary antibodies employed were Mo  $\alpha$ AIP1 (clone 49) and Mo  $\alpha$ FLT1 (clon 18) from BD Biosciences, Mo  $\alpha$ TSG101 (clone 4A10) and Rb  $\alpha$ CD26 from Abcam (Cambridge, UK), Mo  $\alpha$ CD63 (clon H5C6) from Developmental Studies Hybridoma Bank, Mo  $\alpha$ CD10 (clon F4) and Rb  $\alpha$ THP (H-135) from Santa Cruz Biotechnology Inc, Mo  $\alpha$ CD9 (clon 209306)



from R&D Systems, Rb  $\alpha$ AQP2 from Sigma-Aldrich. Anti mouse and rabbit antibodies HRP-conjugated were purchased from Jackson Immuno Research Inc. Chemiluminescence detection of bands was performed with Clarity™ western ECL (Biorad). To offer a relative quantification of proteins, scanned films were quantified by optical density using the Image J software 1.48v (NIH. USA).

#### *Reverse transcriptase and qPCR*

For each sample and extraction method, cDNA was synthesized from 10 ul of RNA using Superscript III (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations in a reaction volume of 20 ul. Primers for Taqman reactions were designed using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center (<https://lifescience.roche.com>). The list of primers and probes are given in Supplemental Table S2. To amplify targeted fragments and estimate relative quantification of genes, taqman PCR was performed in duplicates using TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Life Technologies). Each reaction contains 0.5 ul of cDNA in a total volume of 6 ul of reaction.

#### *Electron microscopy*

For cryo-electron microscopy, preparations were directly adsorbed onto glow-discharged holey carbon grids (QUANTIFOIL, Germany). Grids were blotted at 95% humidity and rapidly plunged into liquid ethane with the aid of VITROBOT (Maastricht Instruments BV, The Netherlands). Vitrified samples were imaged at liquid nitrogen temperature using a JEM-2200FS/CR transmission cryo-electron microscope (JEOL, Japan) equipped with a field emission gun and operated at an acceleration voltage of 200 kV.

#### *Statistics analysis*

Correlation matrixes and associated  $p$ -values were obtained using *cor* function, and plotted using *corrplot* package of R v3.1.0 (2014-04-10).

## Results

### *Initial characterization*

In this study, we obtained uEVs enriched preparations employing five different methods (Figure 1): ultracentrifugation (CEN), EXOQUICK (EXQ), Total Exosome Isolation (INV), Norgen-modified procedure (NOR), and potato lectin-based purification (LEC). We analyzed the preparations by cryo-electron microscopy and we could only observe vesicles in the CEN, INV and LEC methods (supplemental Figure 2A). Then, we analyzed the RNA isolated by each methodology and as can be observed in the Bioanalyzer analysis (supplemental Figure 2B) the profiles showed the presence of mostly small RNA in all cases. The highest amount of RNA was yielded by NOR methodology with an average of 550 ng, followed by CEN and INV method with average of 100 ng and LEC and EXQ that yield the lowest values with average of 40 ng.

### *Protein characterization*

Next, we analyzed the presence of some proteins previously described to be associated to extracellular vesicles that includes CD9, CD10, CD63, TSG101, CD10, AIP1/Alix, AQP2 and flotilin-1 (FLT1). In Figure 2 we showed the Western blot analysis of these proteins in two independent biological samples isolated using the five methods in duplicated. The first interesting observation is that different methods provided material containing different levels of the EVs protein markers. Also, it was notice that the electrophoretic mobility of proteins obtained using INV methodology was slightly different to the other methods (Figure 2). In agreement with the inter-individual variability showed in several studies on EVs in human biofluids, we could also observed clear differences between individuals in our sample group. For instance, sample M3 has weaker bands of AIP1 and CD9 than sample F3, but stronger for CD10, AQP2 and CD26. In order to have quantitative data, densitometry and background subtraction of the Western blot bands for the 10 samples was performed and absolute values transformed into relative values by referring to the highest value obtained for each protein, and for each sample (Figure 3A). For instance, NOR methodology gives a value of 100% for AIP1 in the samples showed in Figure 2. For CD63 the 100% value is given to the levels obtained using CEN methodology. Figure 3A showed the average of the quantitative results for all samples, and clearly shows that NOR isolated a mixture

enriched in AIP1 and CD26 and lower in AQP2 and CD63, while CEN sediment vesicles enriched in CD63, CD9, AQP2 with lower level of vesicles containing AIP1 (Figure 3A). Both methods (NOR and CEN) seem to isolate a mixture containing CD10 and FLT1 with similar efficiency. LEC-based method seems to be very specific for CD9-positive vesicles, having the lowest efficiency for the isolation of AIP1 and CD26 containing vesicles (Figure 3A). On the contrary, the highest efficiency of INV-based methodology was obtained for CD26 and CD63 proteins (Figure 3A). Remarkably, under assayed conditions, EXQ provided the lowest efficiency for most of the uEV protein markers, being CD63 the better detected among them (Figure 3A).

We attempted to determine which proteins were co-isolated, identifying subpopulation markers within each method. In order to establish associations between proteins, we performed correlations between the absolute intensity measured by densitometry of Western blot obtained images for each sample within the methods (Supplemental Figure 3). A positive correlation between EV markers CD9 and TSG101 was reached in NOR, INV and CEN methodologies. This may indicate that those methods isolate subpopulation of vesicles that harbor both markers. A significant association of CD9 and CD63 was observed in NOR and INV methodologies, however although CEN had the best efficiency for CD63 positive vesicles there was a low correlation with CD9 using this methodology. On the contrary, LEC methodology performs better in pulling down CD9 positive vesicles and not correlation with CD63 was observed (Supplemental Figure 3). These results suggest that among uEVs there are subpopulations containing CD9 and CD63 proteins and subpopulations containing only one of the markers. Interestingly, these different uEV sub-populations can be discriminated by using different enrichment procedures. Another interesting association was found for CD10 and FLT1 using NOR, CEN, LEC and EXQ methodologies indicating the presence of these two proteins in the same subpopulation of uEVs. Remarkably, EXQ-based methodology presents high correlation coefficients between most markers what could suggest this method retrieves a homogeneous population, in terms of protein markers, although with low efficiency. These results together clearly suggest that the different methodologies render a material enriched in distinct subpopulation of EVs.

Next we evaluated if any of directly measured physical parameters of the urine samples could predict the uEV isolation performance of the methods. By averaging the values obtained for all the proteins per each method and sample, we constructed Supplemental Table S3 that links the physicochemical characteristics of the urine samples with the performance of each method. Among the 13 properties directly measured by using specific sticks, pH, density and presence/absence of ascorbic acid were the only properties that vary among samples and were further considered for the correlation analysis. However, no significant correlation was observed between any of the physical parameter with the performance of uEV isolation. Only a trend could be observed for CEN isolation method, that shows a better performance for urine samples with higher density (Supplemental Table S3). The reduced number of samples does not allow us reaching any further conclusion on this aspect.

#### *Gene characterization*

We selected a panel of gene targets (Supplementary Table S2) among transcripts previously detected in uEVs (18) including *EEF1A1*, *RPL6*, *SOD1* and *ROCK2*. Furthermore, we included housekeeping genes, such as *GAPDH* and *ACTB1* also reported in EVs (9), and the gene coding for *GNB2L* enriched in EVs (19). We also included in the analysis the gene coding for *AQP2* that has been described in uEVs secreted by cells associated with urinary collecting ducts (4). The presence of these eight transcripts was evaluated in the uEV preparations enriched by using the five methodologies (Figure 1). Among all of them, only *EEF1A1* and *GAPDH* were detected in almost all samples with all methods, while *ROCK2* or *AQP2* were detected very seldom (Figure 3B). However, NOR methodology clearly performed better than the other methods, detecting six genes in at least eight of the ten samples tested (Figure 3B). This high performance of the NOR methodology allowed us performing a correlation analysis between the gene transcripts, to identify those that could co-precipitate. A significant association was observed between the transcripts *ACTB1*, *SOD1* and *GNB2L1* from one side, and *GAPDH*, *EEF1A1* and *RPL6* in another (Figure 4). According to these relationships, we might speculate that each set of transcript is associated to different subpopulation of uEVs in the analyzed urine samples, and NOR technique can precipitate both. The other methodologies may fail to precipitate

vesicles containing ACTB1, SOD1 and GNB2L1, given that none of these three transcripts were efficiently detected in the samples using those methods.

We further analyzed the influence of the analytical parameters of urine samples in the RNA isolation performance displayed by the five methods (Supplementary Table 4). We observed that the performance of NORGEN-based method to isolate vesicles containing RPL6/GAPDH/ EEF1A1 is inversely related to urine density, although it is important to have in mind that other factors, such as sex, may influence this correlation, since men seems to have denser urine in our set of samples.

#### *Analysis of samples obtained from prostate condition patients*

According to the results exposed, we decided to perform our NOR isolation approach in a clinical set of samples of patients suffering benign hyperplasia (BPH) or prostate cancer (PCA). We did the similar protein and gene analyses as performed in the previous section. A representative panel of the Western-blot analysis is showed in Figure 5. Densitometry analysis of the protein bands showed no significant differences between groups (Supplemental Figure 4), and again, it was remarkable the high heterogeneity among the individual samples. Interestingly, the correlation analysis of the proteins showed differences between uEV-enriched preparations from BPH and PCA samples (Figure 6). For example, while in BPH samples the correlation value between the proteins CD63 and TSG101 was 0.76 (Figure 6) similar to the correlation value obtained for healthy samples (Supplemental Figure 4), this correlation was not observed in PCA samples (Figure 6). This result suggests a change in the cargo of CD63-containing vesicles in PCA patients. Finally, we performed the analysis of the eight selected genes obtaining similar amplification profile than in healthy samples for both BPH and PCA samples (Supplemental Figure 5A). We could not observe a significant difference in this profile between BPH and PCa groups. The correlations between EEF1A1, GAPDH and RPL6, and between GNB2L1, ACTB1 and SOD1, that were described in the previous section by analyzing healthy samples, were observed here again (Supplemental Figure 5B) reinforcing the idea of these two set of transcripts loaded in different subpopulations of uEVs.

## Discussion

Urinary EVs provided a source of metabolites, lipids, nucleic acids and proteins that can be used as biomarkers for a range of genitourinary pathologies. Indeed, the number of methods developed to improve the isolation of uEVs (7, 20, 21) indicates the technical difficulties to translate this research to routine diagnostics. In the current study, our approach to isolation has taken a clinical point of view, where the availability of sophisticated equipment and the amount of urine sample that can be storage are limited. In this work we have performed a comparative analysis of different methodologies that could be applied in a clinical setting to evaluate uEVs. The differences observed between the methods were not just a matter of effectiveness, but also we observed qualitative changes in the type of vesicles that were pulled down by each of the methods. We have confirmed previous results showing the affinity of CEN for CD9/CD63 populations and the poor performance of EXQ (7) what could be due to the filtration step, or the requirement of slight modification of the protocol, as mentioned previously (8). We have observed that commercial methods like NOR and INV had a better efficiency capturing the ectopeptidases CD10 and CD26, and remarkably NOR specifically capturing the ESCRT component AIP1/Alix. The reason for this specificity remain unclear given that to our knowledge this is the first work reporting a protein analysis using NORGEN-based methodology. In addition, it was also interesting to observe that some of the uEV markers correlate each other for example CD9 and TSG101 or CD10 with FLT1 indicating that they are forming part of the same vesicle. These associations between different EV markers could be useful to identify uEV subpopulations in urine samples. Furthermore we also observed associations not only of proteins but also among gene transcripts such as ACTB1/GNB2L1/SOD1 or GAPDH/RPL6/EEF1A1 indicating their presence in different subpopulation of EVs. Remarkably, while GAPDH/ RPL6/ EEF1A1 were detected with all isolation methods ACTB1/GNB2L1/SOD1 was detected preferentially by using NORGEN-based methodology. We did not find any previous report that establishes such relationship between these transcripts. These findings clearly support the idea of existing different subpopulations loaded with different transcripts and could help to define subpopulations of EVs that is one of the major goals nowadays in the field.

Given the high heterogeneity existing in urine samples between individuals it is important to try to establish some criteria that would help to group samples that can be further compared in order to detect significant disease biomarkers in uEVs. We have performed a pilot analysis in this aspect by studying the influence of individual physicochemical characteristics of urine sample on the uEVs isolation. From the 13 parameters analyzed we observed that the density of urine samples could be an important parameter to consider for the isolation of uEV-containing *EEF1A1/GAPDH/RPL6* gene transcripts using NORGEN-based methodology. These results are in agreement with previous reports showing that viscosity has influence in the nature of isolated uEVs (22). Although still there is limited data on this aspect, it seems that by analyzing physicochemical properties of urine previous to the uEV enrichment procedure could certainly establish quality control and parameters to perform the comparison increasing in this manner the effectiveness of biomarker discovery studies based on uEVs.

Tamm-Horsfall protein (THP) is a typical contaminant of uEV preparations and although a number of methods have been implemented to remove it (8, 23, 24) previous to the vesicle isolation we decided the easiest, more conservative approach of working with THP. In our analysis, although a negative correlation between THP and the detection of uEV markers was observed for some samples (Figure 5) it was not a general observation (Figure 2). Importantly, the lowest amount of this contaminating-protein was obtained by using INV and EXQ methodologies, what could be considered of interest to analyze problematic samples containing elevated levels of THP protein.

Finally, we wanted to evaluate the performance of our NORGEN-based approach in a clinical set of samples in the context of prostate cancer comparing urine samples from 9 benign prostate hyperplasia and 19 prostate cancer patients. Although there is works showed difference in the urinary vesicles isolated from prostate cancer patients (25-28), we could not detect significant differences for the nine proteins and eight gene transcripts analyzed in our study. The low number of markers that we have analyzed as well as the fact that we have compared BPH with PCa samples, instead healthy and PCA samples done in most of the studies, could be some reasons for this discrepancy. However, our approach was able to detect significant change in the relationship

between protein markers CD63 and TSG101 that was altered in patients with prostate cancer. This result may indicate that CD63-positive uEV are differentially loaded in PCa compared to BPH patients and healthy individuals. These results support that the NORGEN-based approach could be useful to analyze protein markers of EVs in a clinical setting.

In conclusion, this pilot work showed the high complexity accompanying the analysis of uEVs with clinical perspectives. We have compared many of the clinically friendly available methods to enrich in uEV and showed that depending on the method we could enrich in different uEV subpopulations with different outcome in terms of proteins and RNA detection. In addition, this study highlights the benefits to establish quality control parameters in urine samples previous to uEV enrichment, and urges to standardize the methodologies for applying in clinical settings.

### **Acknowledgments**

We thank David Gil of the CIC bioGUNE electron microscopy platform for their technical assistance in the cryo-EM analysis. We are thankful to the Basque Biobank for research (BIOEF), for the acquisition, maintenance and distribution of urine samples, and to the patients enrolled in this study. The work is supported by ISCIII (PI12/01604) and the Movember Foundation (GAP1). Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) is funded by the Spanish ISCIII-MICINN



## References

1. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS, et al. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology*. 2005;10(3):283-90.
2. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(36):13368-73.
3. Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2006;5(10):1760-71.
4. Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Paunescu TG, Da Silva N, et al. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney international*. 2010;78(2):191-9.
5. Gamez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Frontiers in immunology*. 2015;6:6.
6. Gonzalez E, Falcon-Perez JM. Cell-derived extracellular vesicles as a platform to identify low-invasive disease biomarkers. *Expert review of molecular diagnostics*. 2015;15(7):907-23.
7. Saenz-Cuesta M, Arbelaiz A, Oregi A, Irizar H, Osorio-Querejeta I, Munoz-Culla M, et al. Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. *Frontiers in immunology*. 2015;6:50.
8. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney international*. 2012;82(9):1024-32.
9. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS biology*. 2012;10(12):e1001450.
10. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(16):2667-88.
11. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*. 2010;73(10):1907-20.
12. Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*. 2014;29:116-25.
13. Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(3):398-401.
14. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 2013;200(4):373-83.
15. Crescitelli R, Lasser C, Szabo TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani U, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles*. 2013;2.
16. Echevarria J, Royo F, Pazos R, Salazar L, Falcon-Perez JM, Reichardt NC. Microarray-based identification of lectins for the purification of human urinary extracellular vesicles directly from urine samples. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2014;15(11):1621-6.
17. Gerlach JQ, Kruger A, Gallogly S, Hanley SA, Hogan MC, Ward CJ, et al. Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS one*. 2013;8(9):e74801.
18. Perez A, Loizaga A, Arceo R, Lacasa I, Rabade A, Zorroza K, et al. A Pilot Study on the Potential of RNA-Associated to Urinary Vesicles as a Suitable Non-Invasive Source for Diagnostic Purposes in Bladder Cancer. *Cancers*. 2014;6(1):179-92.
19. Royo F, Falcon-Perez JM. Liver extracellular vesicles in health and disease. *Journal of extracellular vesicles*. 2012;1.

20. Musante L, Tataruch D, Gu D, Benito-Martin A, Calzaferri G, Aherne S, et al. A simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications, and sample banking. *Scientific reports*. 2014;4:7532.
21. Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *American journal of physiology Renal physiology*. 2007;292(5):F1657-61.
22. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Trachtenberg AJ, Hochberg FH, Skog J, et al. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Frontiers in physiology*. 2012;3:162.
23. Musante L, Saraswat M, Duriez E, Byrne B, Ravida A, Domon B, et al. Biochemical and physical characterisation of urinary nanovesicles following CHAPS treatment. *PloS one*. 2012;7(7):e37279.
24. Kosanovic M, Jankovic M. Isolation of urinary extracellular vesicles from Tamm-Horsfall protein-depleted urine and their application in the development of a lectin-exosome-binding assay. *BioTechniques*. 2014;57(3):143-9.
25. Overbye A, Skotland T, Koehler C, Thiede B, Seierstad T, Berge V, et al. - Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget*. 2015:13.
26. Duijvesz D, Versluis CY, van der Fels CA, Vredenburg-van den Berg MS, Leivo J, Peltola MT, et al. Immuno-based detection of extracellular vesicles in urine as diagnostic marker for prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015.
27. Isin M, Uysaler E, Ozgur E, Koseoglu H, Sanli O, Yucel O, et al. - Exosomal lncRNA-p21 levels may help to distinguish prostate cancer from benign disease. *Front Genet*. 2015;6(168).
28. Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *British journal of cancer*. 2009;100(10):1603-7.

## Figure Legends

**Figure 1.** Experimental design for comparing five uEVs enrichment methods. Two aliquots of 10 ml of urine samples from 10 independent healthy individuals were employed to perform each of the five methods. The final pellet obtained in each method was suspended in 100 ul of Exosome Resuspension Buffer (ERB, from Life Technologies) and then divided for RNA, protein and EM according to the proportion (70:20:10). The same proportion was maintained for NOR extraction, before proceed to the first centrifugation (see *Material and Methods* section for more details).

**Figure 2.** Western-blot analysis of two representative independent biological samples. uEVs were enriched by using indicated methodologies in duplicated. uEVs enriched preparations were analyzed by Western-blotting using antibodies against indicated proteins. Molecular weights are indicated.

**Figure 3.** Analysis of the uEV enrichment performance of methods. **(A)** Average of the relative quantification for each protein and method. Optical densitometry was determined by using Image-J analysis software, and relative quantification was calculated respect to the strongest band for each protein and sample. **(B)** Number of samples where the indicated gene transcript was detected for each of the methods.

**Figure 4.** Gene correlation analysis. A correlation matrix was obtained by using Ct values for each gene and sample. A value of 45 was assigned to non-detected genes in order to avoid the loss of data. The numbers correspond to r coefficients, and only significant values ( $p < 0.05$ ) are colored with a proportional r-scale color grade.

**Figure 5.** Western-blot analysis of NORGEN-enriched uEVs from BPH and PCA urine samples. NOR methodology was employed to enrich uEVs from urine samples of indicated BPH and PCA patients as described in *Materials and Method* section. Indicated proteins were analyzed by Western-blot analysis. Molecular weights are indicated.

**Figure 6.** Protein correlation analysis in uEVs from BPH and PCA patients. A correlation matrix was constructed with absolute densitometry values (background subtracted) for each protein. To avoid the loss of data, a value of 0 was given to non-detected proteins.

The numbers correspond to r coefficients, and only significant values ( $p < 0.05$ ) are colored with a proportional r-scale color grade.

**Supplemental Figure 1.** Physicochemical parameters of urine samples. Detail of the strips employed for the physicochemical analysis of urine samples. In the left image, a sample with pH 5, density of 1.020 and positive for ascorbic acid is shown, while a strip analysis from a sample with pH 7, density 1.005 and negative for ascorbic acid is placed at the right. The left panel shows the color code to interpret the strip.

**Supplemental Figure 2.** Initial characterization of uEV enriched preparations. **(A)** Cryo-EM micrographs (*Bar* represents 100 nm). **(B)** Bioanalyzer RNA profiles of representative samples from each of the methods.

**Supplemental Figure 3.** Different methods enrich different subpopulation of uEVs. In order to determine which protein markers behave in the same way for each method, a correlation matrix was constructed with the absolute values for each protein and sample, within each method. The numbers present  $r$  coefficients, and only significant values ( $p < 0.05$ ) are colored with a proportional  $r$ -scale tone.

**Supplemental Figure 4.** Protein analysis of uEVs NORGEN-enriched from BPH and PCA urine samples. Box-plots (median, 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> quartiles) are calculated with the absolute values (background subtracted) obtained by densitometry analysis after Western Blotting.

**Supplemental Figure 5.** Gene transcript analysis of uEVs NORGEN-enriched from BPH and PCA urine samples. **(A)** Number of samples where indicated gene transcripts were detected by qPCR. **(B)** Correlation analysis. A correlation matrix was constructed by using Ct values for each gene transcript and sample. To avoid the loss of data, a value of 45 was given to non-detected genes. The numbers correspond to  $r$  coefficients, and only significant values ( $p < 0.05$ ) are colored with a proportional  $r$ -scale color grade.

Figure 1

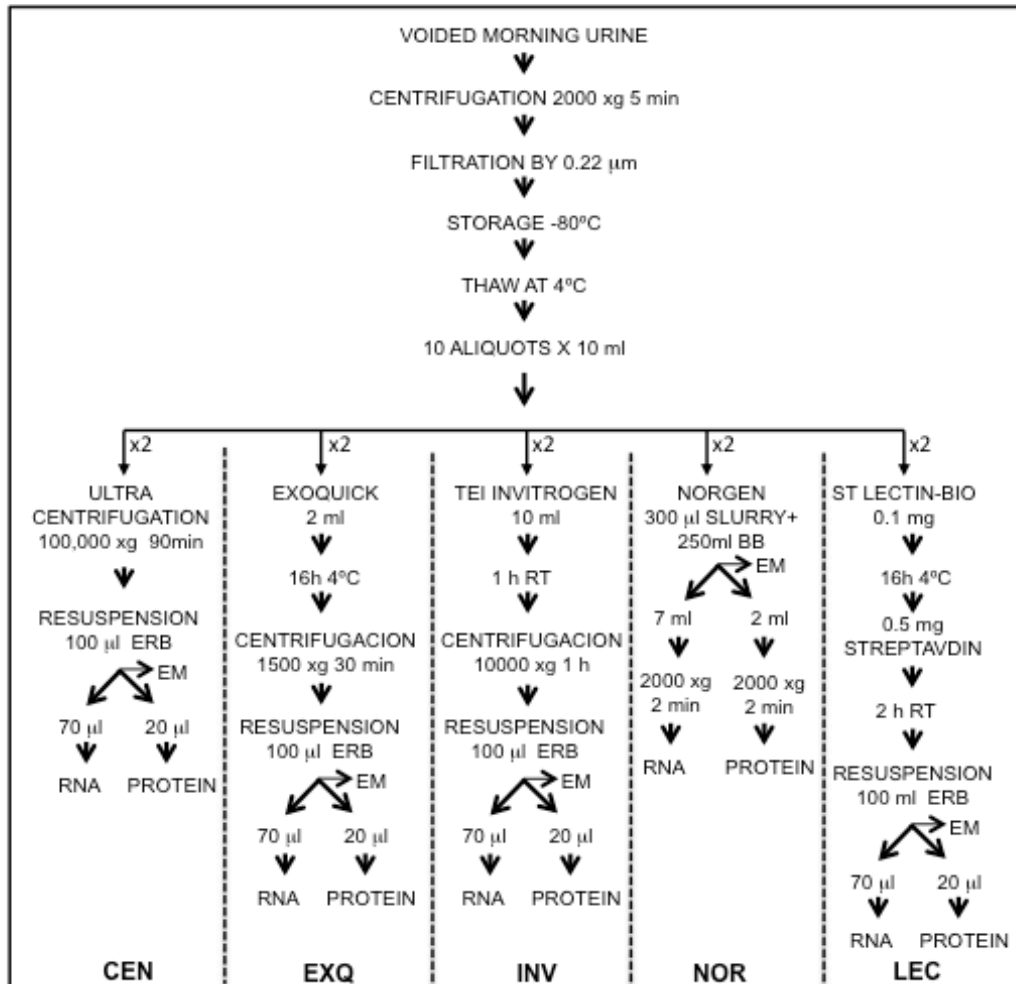


Figure 2

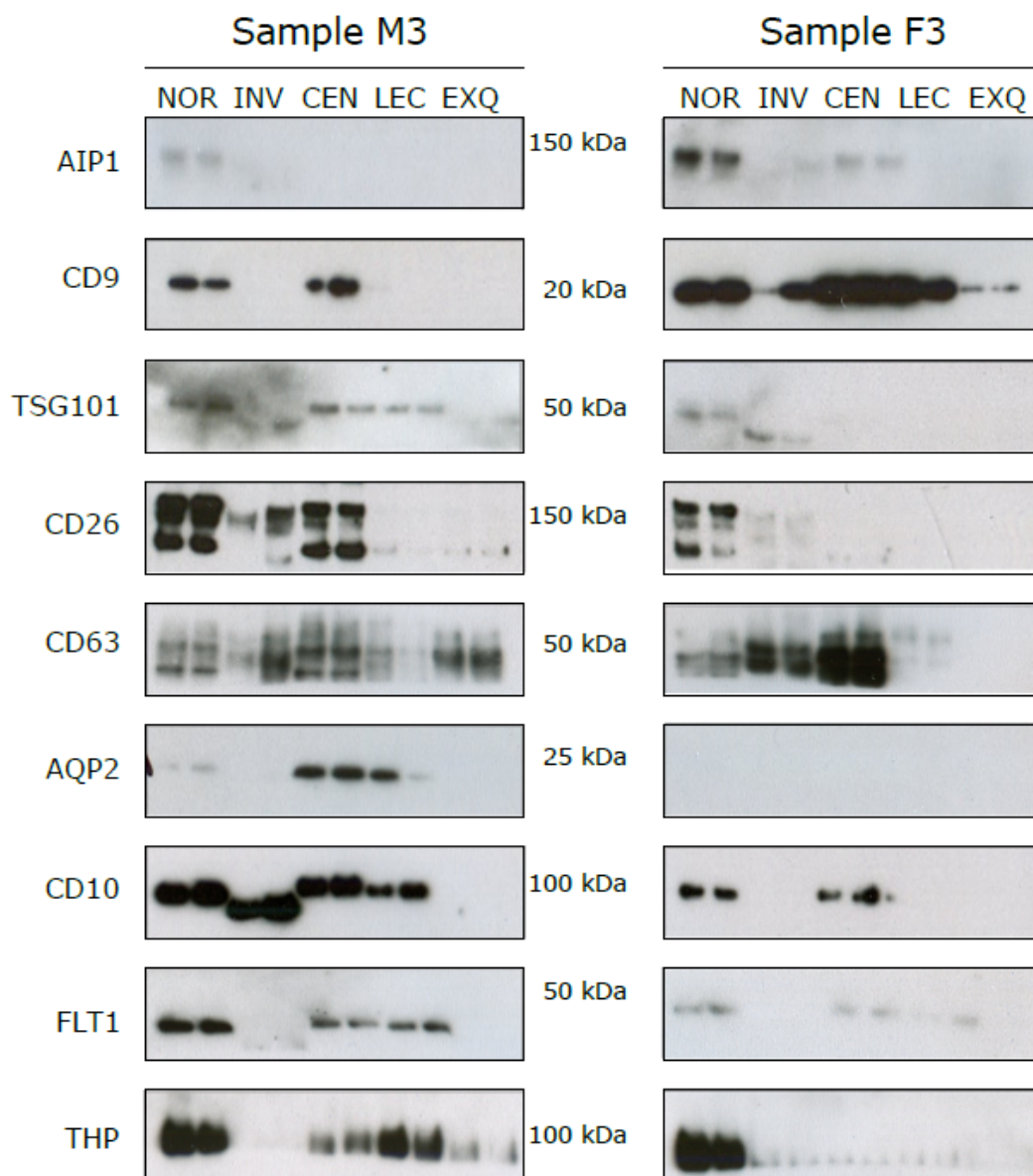


Figure 3A

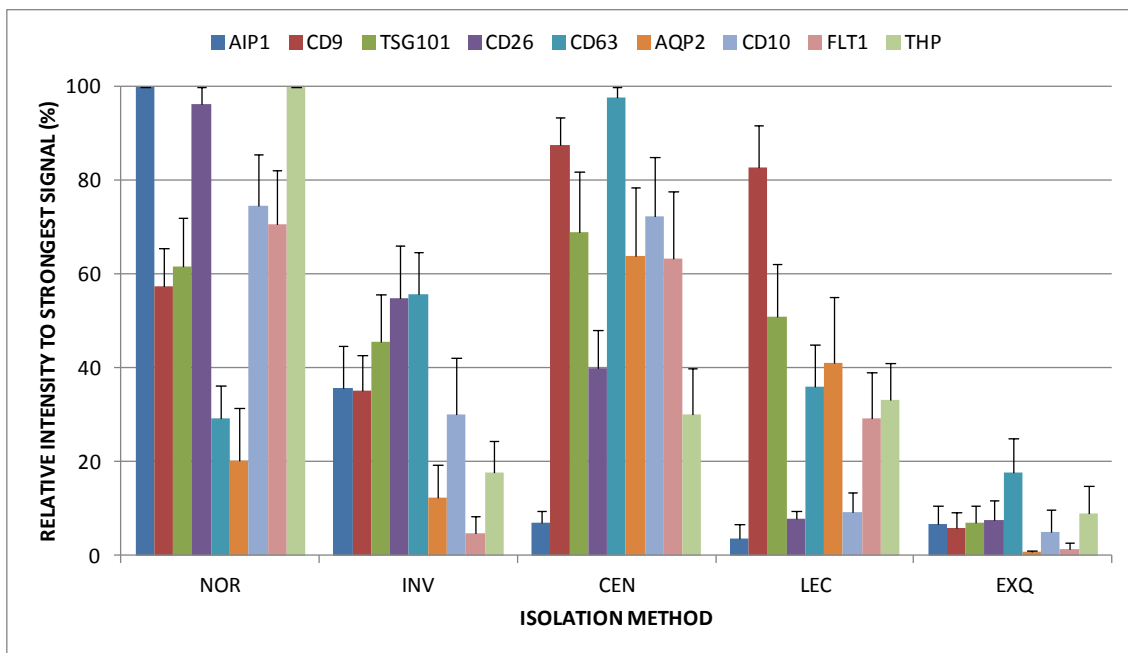


Figure 3B

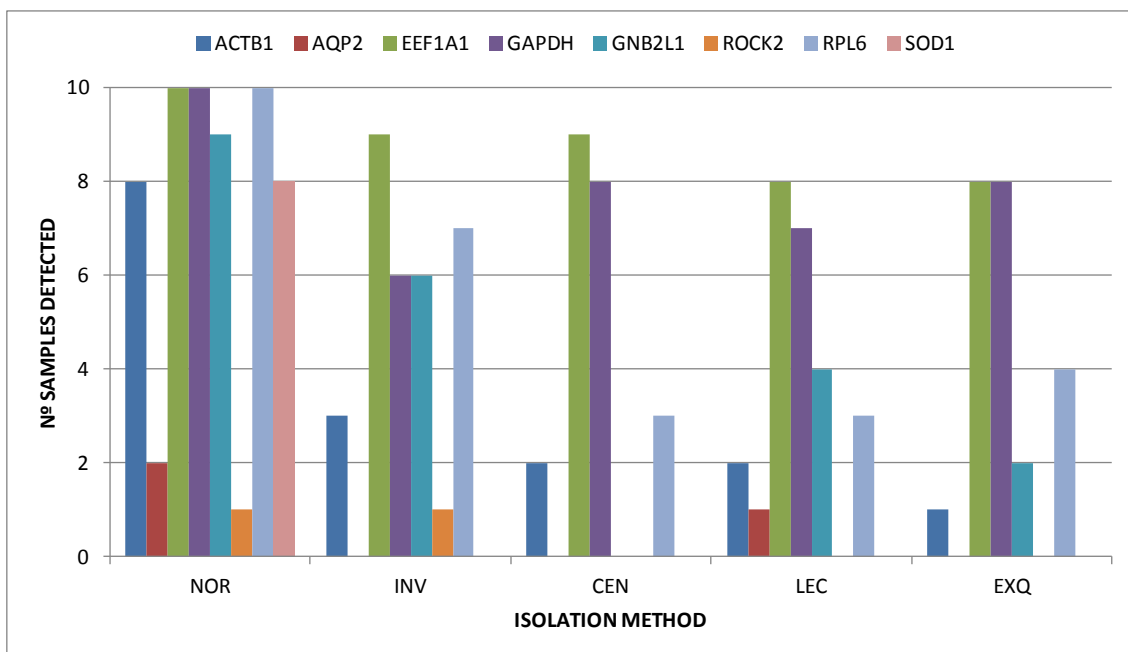




Figure 4

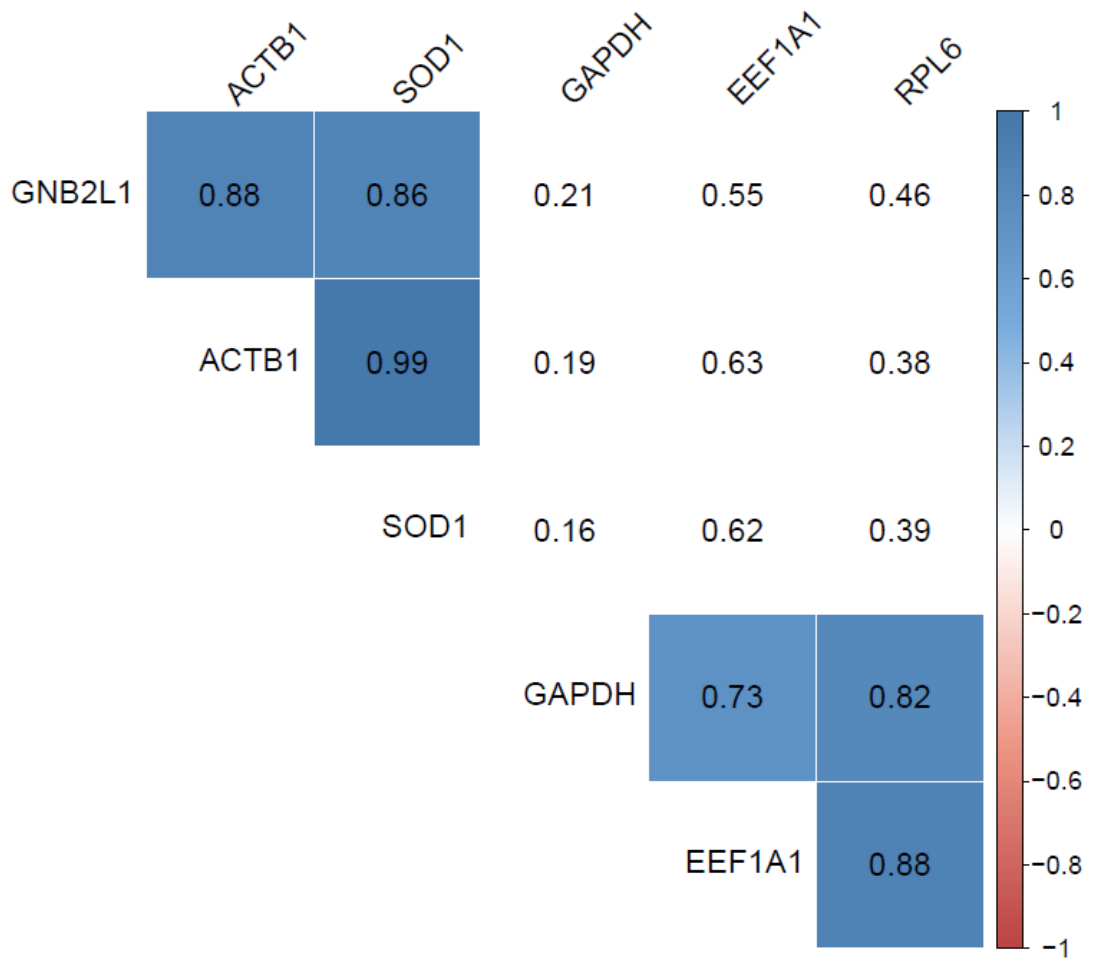


Figure 5

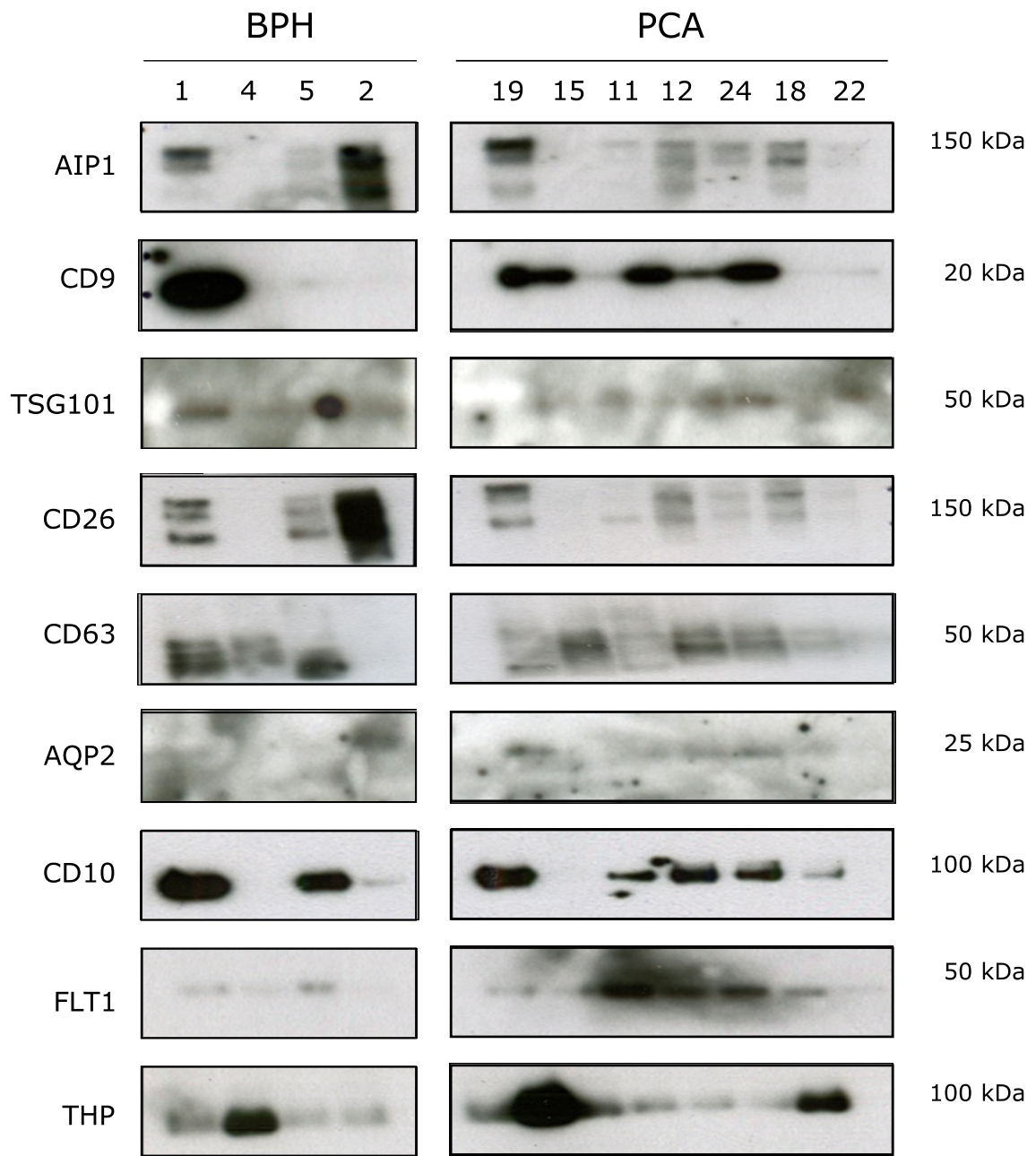
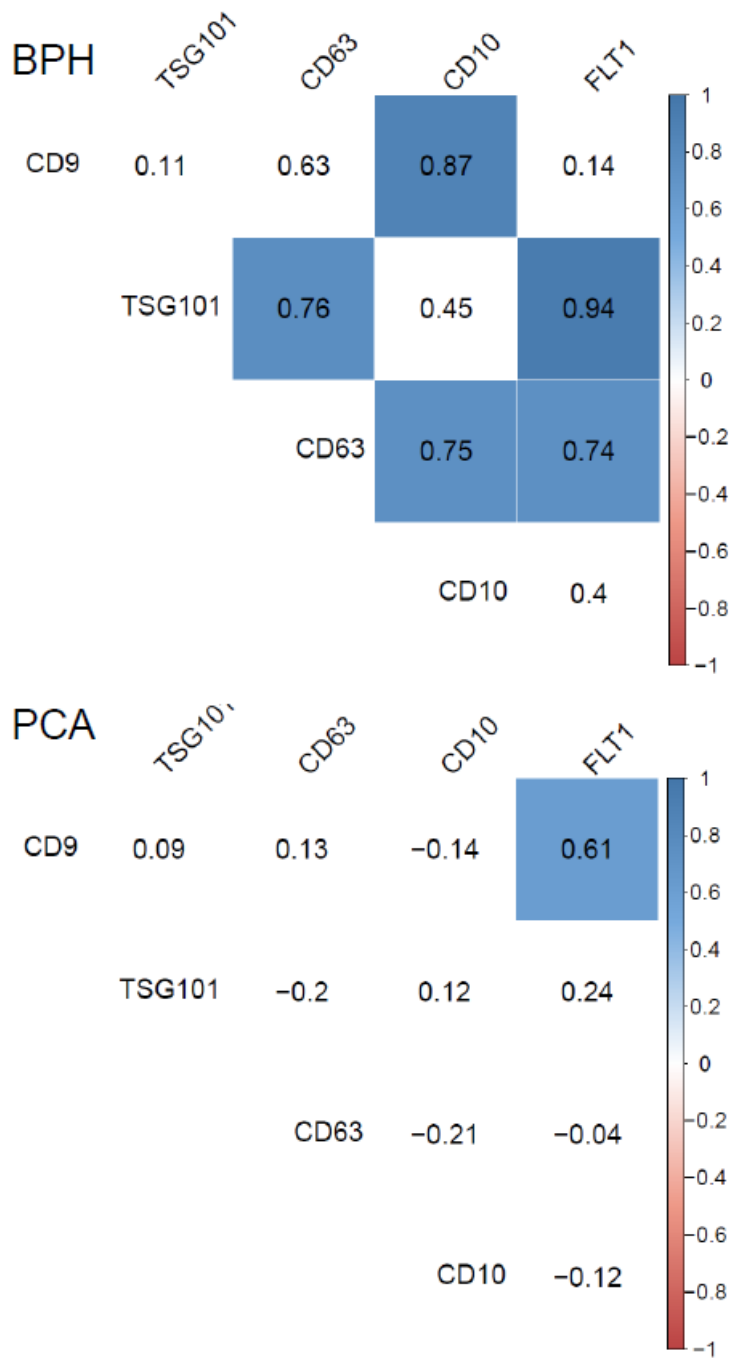
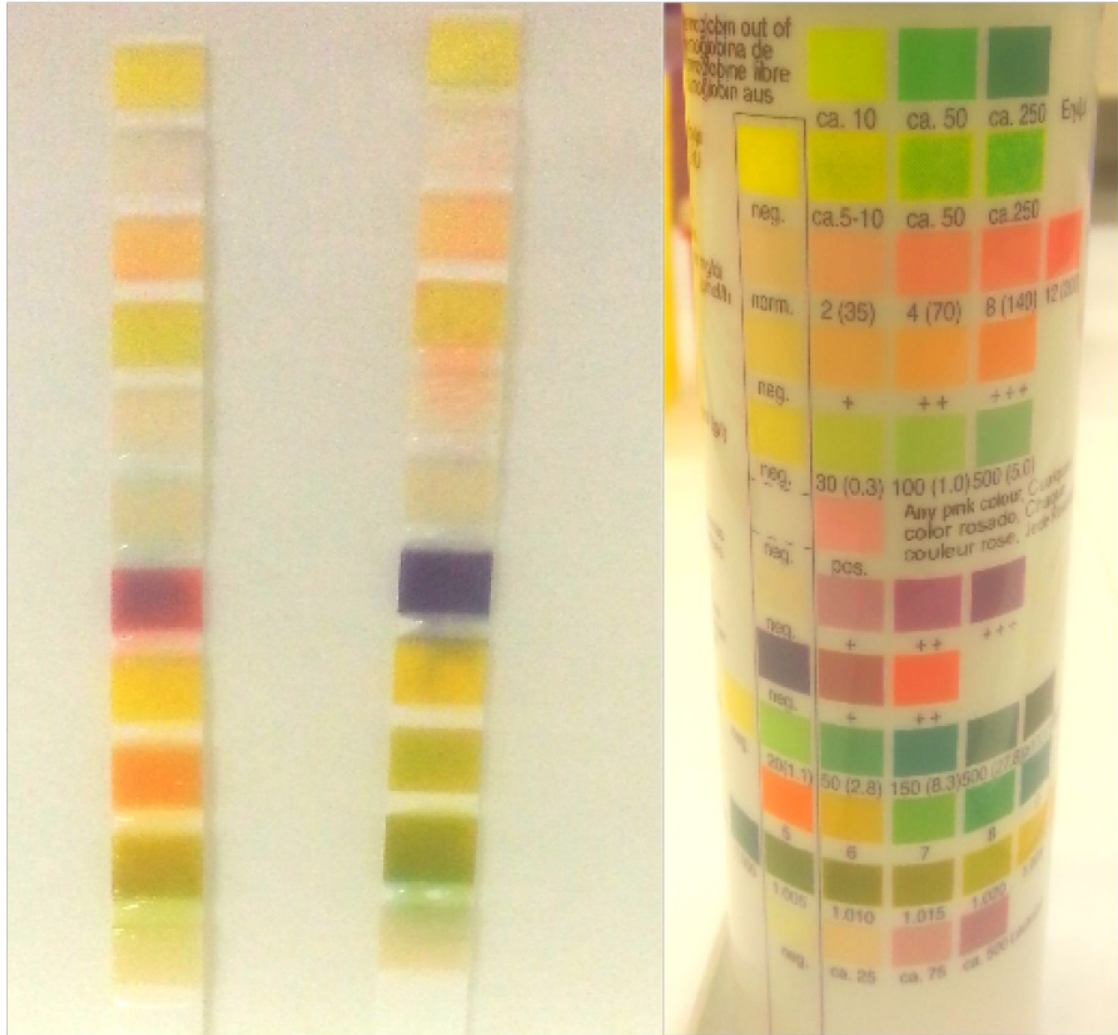


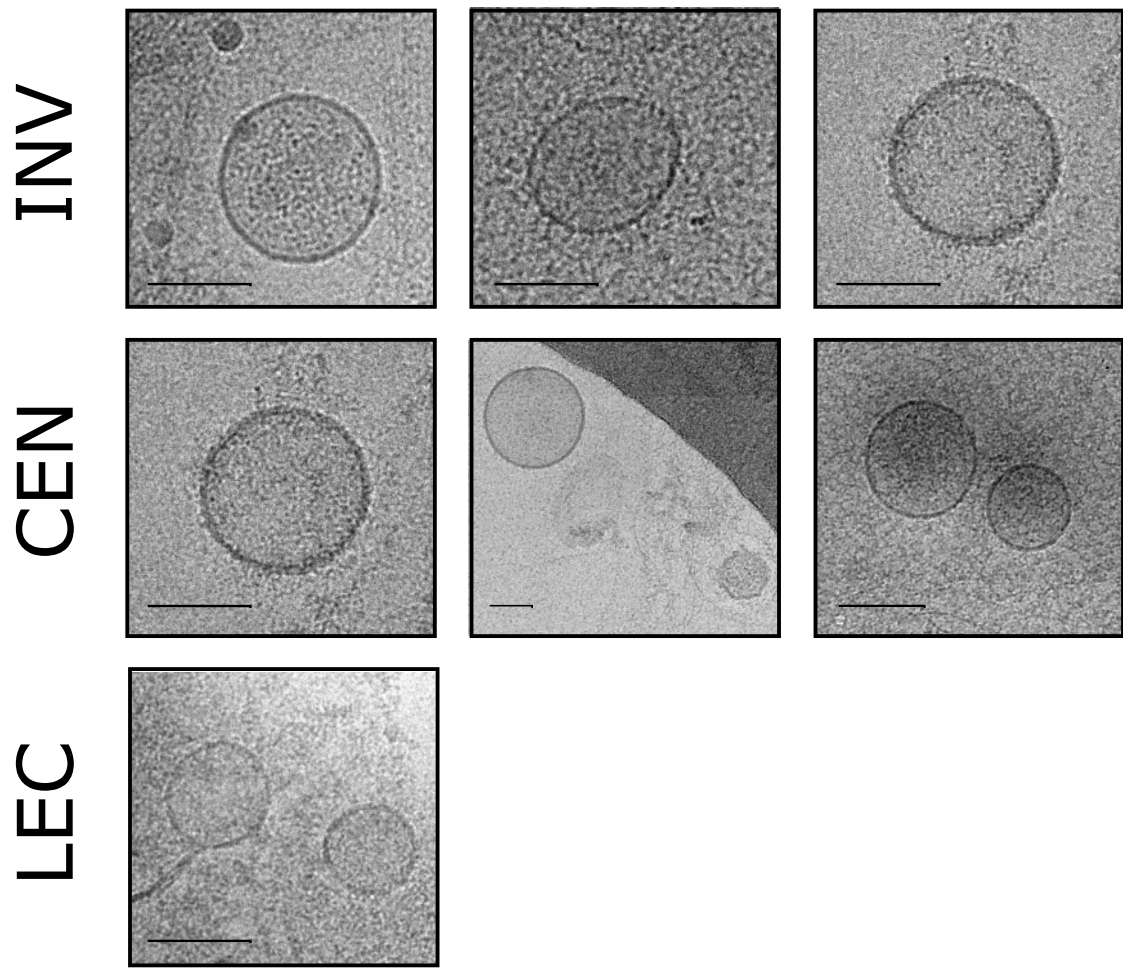
Figure 6



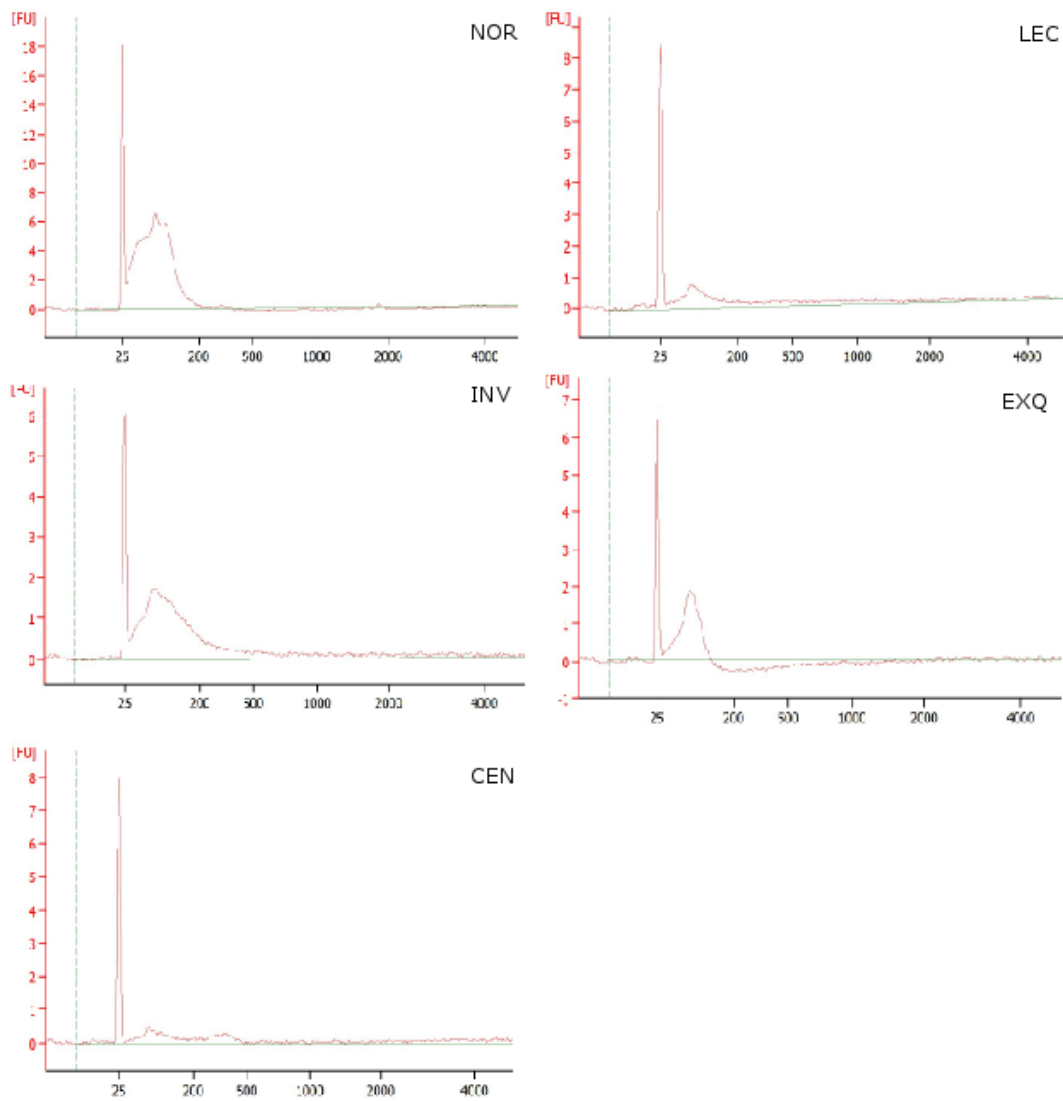
Supplemental Figure 1



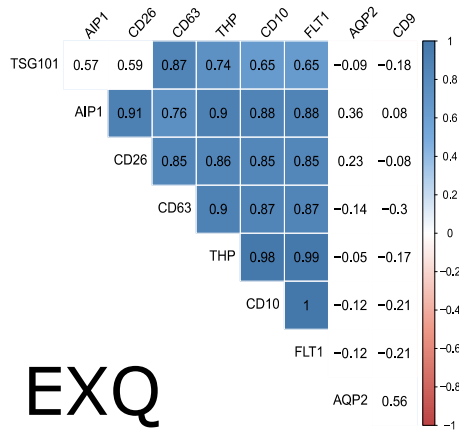
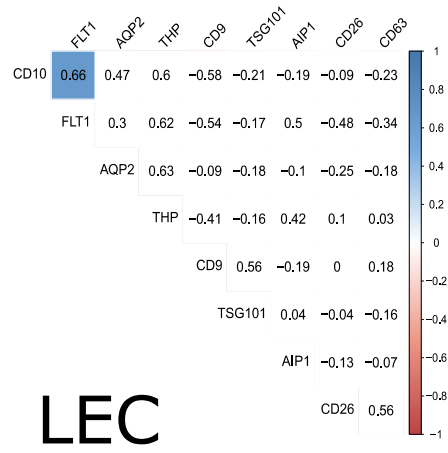
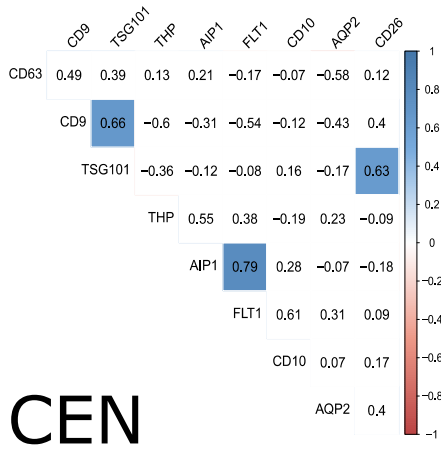
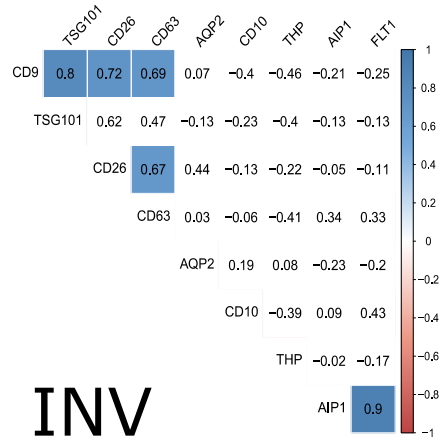
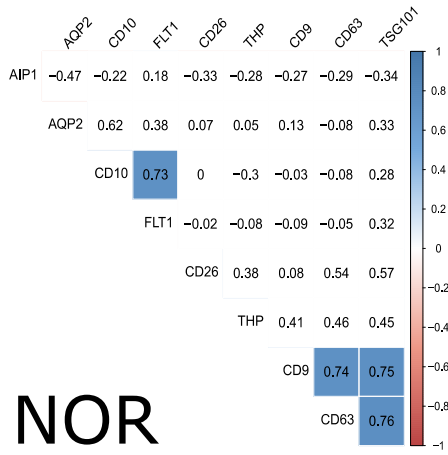
Supplemental Figure 2A



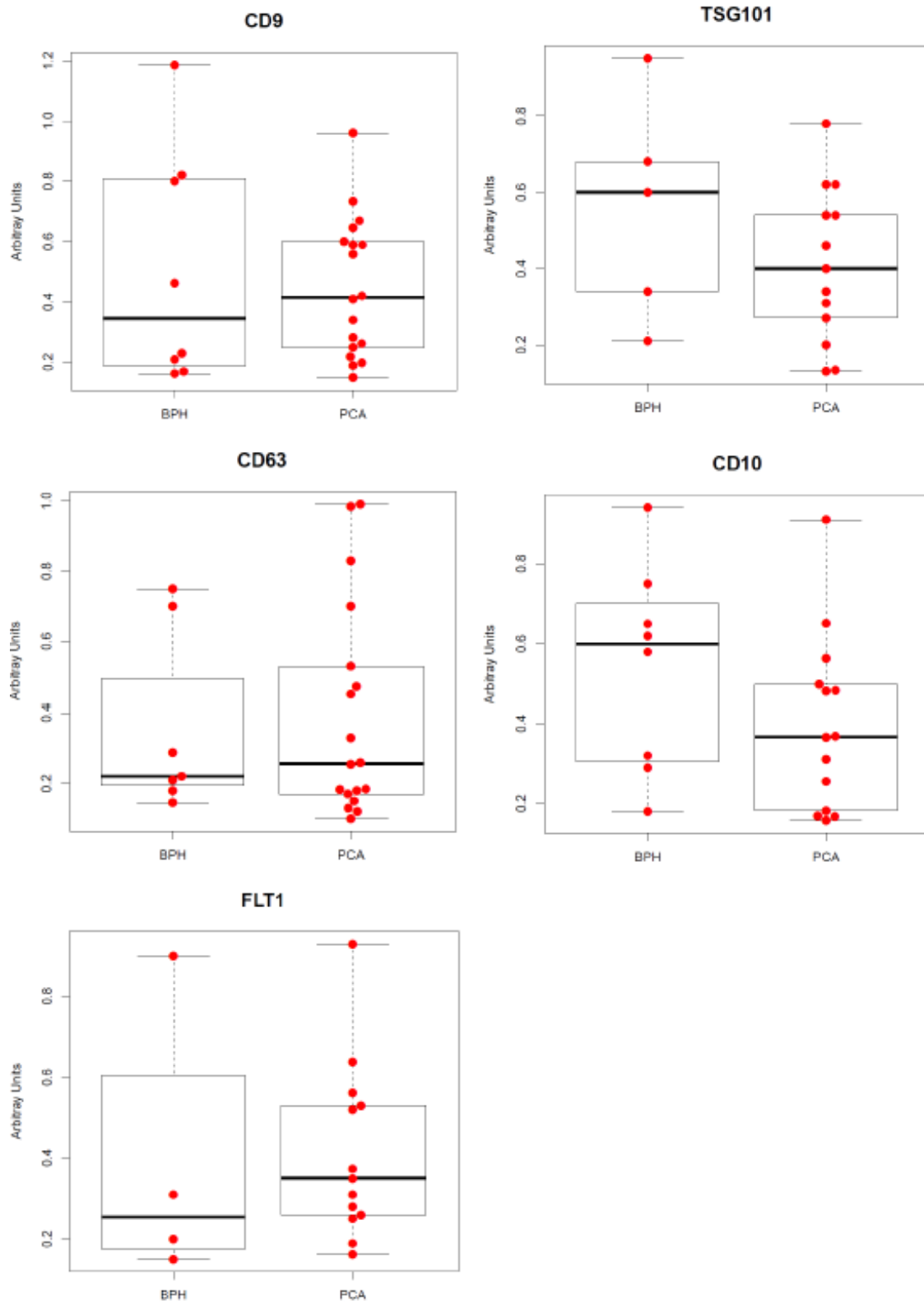
Supplemental Figure 2B



### Supplemental Figure 3

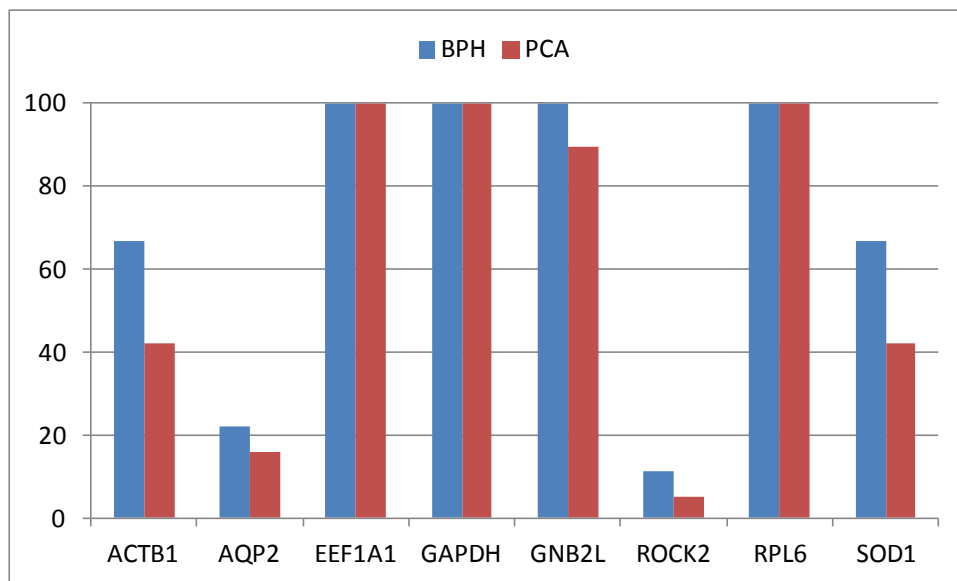


Supplemental Figure 4

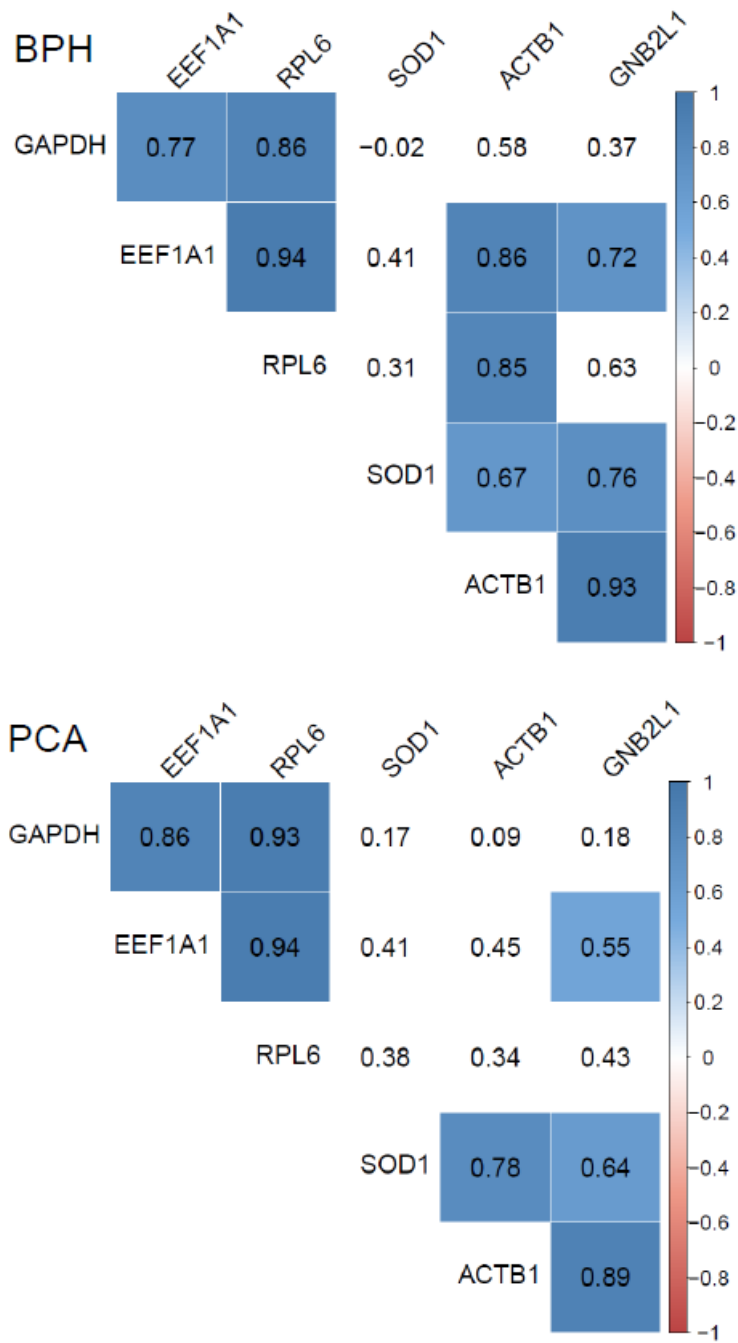




Supplemental Figure 5A



Supplemental Figure 5B



## Supplemental TABLE 1

**Table S1:** Summary of clinical data of patients with BPH or PCA

ID	CONDITION	AGE	GRADE
1	BPH	69	
2	BPH	61	
3	BPH	79	
4	BPH	73	
5	BPH	68	
6	BPH	76	
7	BPH	76	
8	BPH	77	
9	BPH	70	
10	Cancer	58	pT2c
11	Cancer	65	pT2c
12	Cancer	66	pT2c
13	Cancer	66	pT2c
14	Cancer	68	pT2c
15	Cancer	53	pT2c
16	Cancer	62	pT2c
17	Cancer	63	pT2c
18	Cancer	50	pT2c
19	Cancer	69	pT2c
20	Cancer	59	pT2c
21	Cancer	63	pT3a
22	Cancer	72	pT3a
23	Cancer	72	pT3a
24	Cancer	55	pT3a
25	Cancer	56	pT3a
26	Cancer	61	pT3b
27	Cancer	61	pT3b
28	Cancer	71	pT2c

## Supplemental Table 2

**Table S2.** Gene transcripts selected for the study.

GENE	FORWARD	REVERSE	PROBE	Life technologies reference
ACTB1				Hs99999903_m1
AQP2	acaccggctgctctatgaat	aggggtccgatccagaag	36	
EEF1A1	gtgatgctgccattgttgat	agcgacccaaaggtgata	72	
GAPDH				Hs02758991_g1
GNB2L1	cctaaccgctactggctgtg	ctacaatgatctttccctctaaatcc	57	
ROCK2	cccatcaacgtggagagc	aagcaggaaaatctaaatcaagga	42	
RPL6	tacggagcagcgaagat	tccattcgtcagagcaaaca	73	
SOD1	tcatcaatttcgagcagaagg	gcaggccttcagtcagtcc	60	

### Supplemental Table 3

**Table S3.** Relationship between clinical parameters and the protein enrichment performance of each method

SAMPLE ID	SEX	pH	DENSITY	Ascorbic Acid	CEN*	EXQ*	INV*	LEC*	NOR*
F4	F	7	1,005	NEG	37,95	1,22	17,38	57,81	58,13
F5	F	5	1,005	NEG	40,44	1,21	28,81	25,10	77,89
F1	F	7	1,01	NEG	83,27	28,94	44,04	40,76	57,40
M2	M	5	1,01	NEG	46,28	1,65	42,67	28,11	75,43
F2	F	5	1,01	POS	73,44	2,94	43,94	28,14	64,13
M1	M	5	1,015	NEG	68,74	0,90	22,71	24,26	71,73
M3	M	5	1,015	POS	62,16	11,92	29,25	28,41	81,61
F3	F	6	1,02	POS	44,41	1,21	25,14	14,48	86,21
M4	M	5	1,025	POS	67,79	0,15	51,95	46,27	60,22
M5	M	5	1,025	POS	66,52	15,67	27,79	34,68	56,93

\*The data represent the average of the relative quantification of all proteins detected for each method and sample. The color scale is calculated in vertical and range from green (sample with the poorest relative performance) to red (sample with best performance for that method)

### Supplemental Table 4

**Table S4.** Relationship between clinical parameters and the RNA enrichment performance for NORGEN-based method.

SAMPLE ID	SEX	pH	DENSITY	Ascorbic Acid						
				ACTB1*	EEF1A1*	GAPDH*	GNB2L1*	RPL6*	SOD1	
F4	F	7	1,005	NEG	35,17	26,24	28,45	33,80	27,54	35,3
F5	F	5	1,005	NEG	36,38	29,01	28,20	34,75	30,51	38,1
F1	F	7	1,01	NEG	34,90	30,93	33,17	31,91	31,77	34,5
M2	M	5	1,01	NEG	35,01	29,69	29,54	33,81	31,48	35,3
F2	F	5	1,01	POS	34,32	30,12	32,60	31,56	32,74	35,1
M1	M	5	1,015	NEG	34,92	30,46	33,19	32,36	32,41	35,8
M3	M	5	1,015	POS	34,28	30,21	31,92	30,79	32,36	36,3
F3	F	6	1,02	POS	ND	31,25	30,54	36,87	30,96	ND
M4	M	5	1,025	POS	32,04	27,99	30,97	29,77	30,74	33,5
M5	M	5	1,025	POS	ND	32,74	34,16	ND	35,35	ND

\*uEVs were enriched with NORGEN methodology and afterwards analyzed by qPCR. In the table are indicated values obtained for each gene transcript and sample. The color scale is calculated in vertical and range from green (sample not detected, ND) to red (sample with lowest Ct values, and therefore largest amounts of the specific gene transcript) Color grade is calculated in vertical, and green goes from non detected samples (ND), red (lowest Ct values, and therefore largest amounts of that specific gene transcript).

# Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation

M Salazar<sup>1,2,14,15</sup>, M Lorente<sup>1,2,14</sup>, E García-Taboada<sup>1</sup>, E Pérez Gómez<sup>1,3</sup>, D Dávila<sup>1,2</sup>, P Zúñiga-García<sup>4</sup>, J María Flores<sup>5</sup>, A Rodríguez<sup>5</sup>, Z Hegedus<sup>6</sup>, D Mosén-Ansorena<sup>4</sup>, AM Aransay<sup>7</sup>, S Hernández-Tiedra<sup>1,2</sup>, I López-Valero<sup>1,2</sup>, M Quintanilla<sup>8</sup>, C Sánchez<sup>1,3</sup>, JL Iovanna<sup>9</sup>, N Dusetti<sup>9</sup>, M Guzmán<sup>1,10</sup>, SE Francis<sup>11</sup>, A Carracedo<sup>4,12,13</sup>, E Kiss-Toth<sup>11</sup> and G Velasco<sup>\*,1,2</sup>

Tribbles pseudokinase-3 (TRIB3) has been proposed to act as an inhibitor of AKT although the precise molecular basis of this activity and whether the loss of TRIB3 contributes to cancer initiation and progression remain to be clarified. In this study, by using a wide array of *in vitro* and *in vivo* approaches, including a *Trib3* knockout mouse, we demonstrate that TRIB3 has a tumor-suppressing role. We also find that the mechanism by which TRIB3 loss enhances tumorigenesis relies on the dysregulation of the phosphorylation of AKT by the mTORC2 complex, which leads to an enhanced phosphorylation of AKT on Ser473 and the subsequent hyperphosphorylation and inactivation of the transcription factor FOXO3. These observations support the notion that loss of TRIB3 is associated with a more aggressive phenotype in various types of tumors by enhancing the activity of the mTORC2/AKT/FOXO axis.

*Cell Death and Differentiation* (2015) 22, 131–144; doi:10.1038/cdd.2014.133; published online 29 August 2014

Pseudokinases constitute a group of proteins that have a kinase-like domain that lacks at least one of the conserved catalytic residues.<sup>1,2</sup> Different studies have shown that some pseudokinases can exhibit low levels of kinase activity, while others have critical roles as activators of their specific targets.<sup>1,2</sup> Moreover, aberrant regulation of pseudokinases has been implicated in the etiology and progression of a variety of diseases, including cancer.<sup>3</sup>

The Tribbles family of pseudokinases was first described in *Drosophila* as a negative regulator of cell division in early embryogenesis.<sup>4–7</sup> There are three mammalian Tribbles isoforms (Trib1, Trib2 and Trib3), homologs to the *Drosophila* tribbles proteins, and they all share a highly conserved central kinase-like domain, which lacks catalytic residues, and a 'tribbles specific' C-terminal domain, which has been proposed to participate in the binding to different Tribbles partners.<sup>8</sup>

Tribbles pseudokinase-3 (TRIB3; also named TRB3, NIPK and SKIP3) has been proposed to interact with several proteins, including the transcription factors activating transcription factor 4 (ATF-4) and CHOP<sup>9</sup> as well as with several MAPKs.<sup>10</sup> TRIB3 has also been shown to interact and inhibit

AKT,<sup>11</sup> which has been suggested to suppress insulin signaling.<sup>11,12</sup> In addition, administration of different anticancer agents promotes cancer cell death via TRIB3 upregulation and the subsequent inhibition of Akt.<sup>13–19</sup> However, the precise molecular basis of the regulation of Akt by TRIB3 and whether loss of this pseudokinase may contribute to cancer initiation and progression remains to be clarified.

In this study, we investigated the effect of the genetic inactivation of TRIB3 in several cellular and animal models of cancer. Our findings indicate that genetic inhibition of TRIB3 enhances tumorigenesis and that this effect is due – at least primarily – to a selective inactivation of the transcription factor FOXO by the mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2)/AKT axis.

## Results

**Genetic inhibition of TRIB3 facilitates oncogene transformation and enhances the tumorigenicity of cancer cells.** As a first approach to analyze the role of TRIB3 in cancer generation and progression, we investigated the

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Complutense University, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Sanitarias San Carlos (IdiSSC), Madrid, Spain; <sup>3</sup>Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I + 12), Madrid, Spain; <sup>4</sup>CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, Derio, Spain; <sup>5</sup>Department of Animal Surgery and Medicine, School of Veterinary, Complutense University, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Institute of Biophysics, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary; <sup>7</sup>CIC bioGUNE-CIBERehd, Bizkaia Technology Park, Derio, Spain; <sup>8</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid, Spain; <sup>9</sup>Centre de Recherche en Carcérologie de Marseille (CRCM), INSERM UMR, CNRS UMR 7258, Aix Marseille Université and Institut Paoli Calmette, Marseille, France; <sup>10</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Madrid, Spain; <sup>11</sup>Department of Cardiovascular Science, University of Sheffield, Sheffield, UK; <sup>12</sup>Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain and <sup>13</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bilbao, Spain

\*Corresponding author: G Velasco, Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Complutense University, Calle José Antonio Nováis 2, Madrid 28040, Spain. Tel: +34 91 3944668; Fax: +34 91 3944672; E-mail: gvd@bbm1.ucm.es

<sup>14</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>15</sup>Current address: Cell Division and Cancer Group, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid E-28029, Spain.

**Abbreviations:** ATF-4, activating transcription factor 4; BAD, BCL2-associated agonist of cell death; BIM, BCL2-like 11; DMBA, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene; FOXO3, Forkhead box O3; GSK3, glycogen synthase kinase 3; MEF, mouse embryonic fibroblast; mTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2; PRAS40, proline-rich AKT substrate; PTEN, phosphatase and tensin homolog; RICTOR, rapamycin-insensitive companion of mTOR; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TRIB3, Tribbles pseudokinase-3

Received 06.2.14; revised 11.7.14; accepted 24.7.14; Edited by S Fulda; published online 29.8.14

susceptibility to transformation of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from *Trib3*<sup>-/-</sup> and wild-type (WT) animals (see Supplementary Methods section and Supplementary Figures S1a–e). Expression of Ras<sup>V12</sup> (a constitutively active form of the oncogene Ras) was capable of transforming MEFs derived from *Trib3*-deficient mice (Figure 1a). Similar results were obtained when the SV40 T-large antigen was used (Supplementary Figure S1f), suggesting that loss of TRIB3 facilitates oncogene-induced transformation overall. In line with this idea, a higher number of *Trib3*-deficient Ras<sup>V12</sup>-transformed (Figure 1b) and SV40-T large antigen-transformed (Supplementary Figure S1g) MEFs were obtained after several days in culture when compared with their corresponding WT counterparts.

Next, we generated Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed MEFs as a cellular model to conduct additional mechanistic studies on the role of TRIB3 in cancer. In line with the aforementioned results, a higher percentage of Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*-deficient MEFs were positive for Ki67, a marker expressed specifically in dividing cells, when compared with their corresponding WT counterparts (Figure 1c). Likewise, Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs formed four times the number of colonies in soft agar (Figure 1d) as their corresponding WT MEFs. Moreover, this behavior was abolished by re-expressing an HA-tagged form of TRIB3 in *Trib3*-deficient cells (Figures 1c and d), which strongly supports that the enhanced tumorigenic features of *Trib3*-deficient cells rely solely on the inactivation of this pseudokinase. Furthermore, the onset of tumor xenografts generated by subcutaneous injection of *Trib3*-deficient Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed MEFs in the flank of nude mice was remarkably accelerated compared with that of tumors generated with their WT counterparts (Figure 1e).

Of note, TRIB3 is focally deleted in tumors of epithelial origin and in breast cancer patients (tumorscape data set; Supplementary Table S1). In addition, analysis of gene expression profiles of cancer patients from published studies reveals that TRIB3 mRNA levels are downregulated in different tumor types (Supplementary Tables SII and SIII). Therefore we next investigated the effect of the genetic inhibition of TRIB3 in human cancer cell lines. In line with the results obtained with *Trib3*-deficient MEFs, knockdown of TRIB3 strongly enhanced the ability to form colonies in soft agar of breast carcinoma (BT474) and hepatocellular carcinoma (HepG2) cells lines (Figure 2a). Moreover, TRIB3 silencing increased the number of BT474 and HepG2 cells obtained after several days in culture (Supplementary Figures S2a–b). Furthermore, stable silencing of TRIB3 both accelerated tumor onset and enhanced the rate of tumor growth of xenografts generated with BT474 cells (Figure 2b) and accelerated the onset of HepG2 cell-generated tumors (Figure 2c). Taken together, these observations strongly support that loss of TRIB3 enhances the tumorigenic capacity of different types of cancer cells.

### Genetic deletion of *Trib3* accelerates the progression of mouse skin papillomas to a more aggressive phenotype.

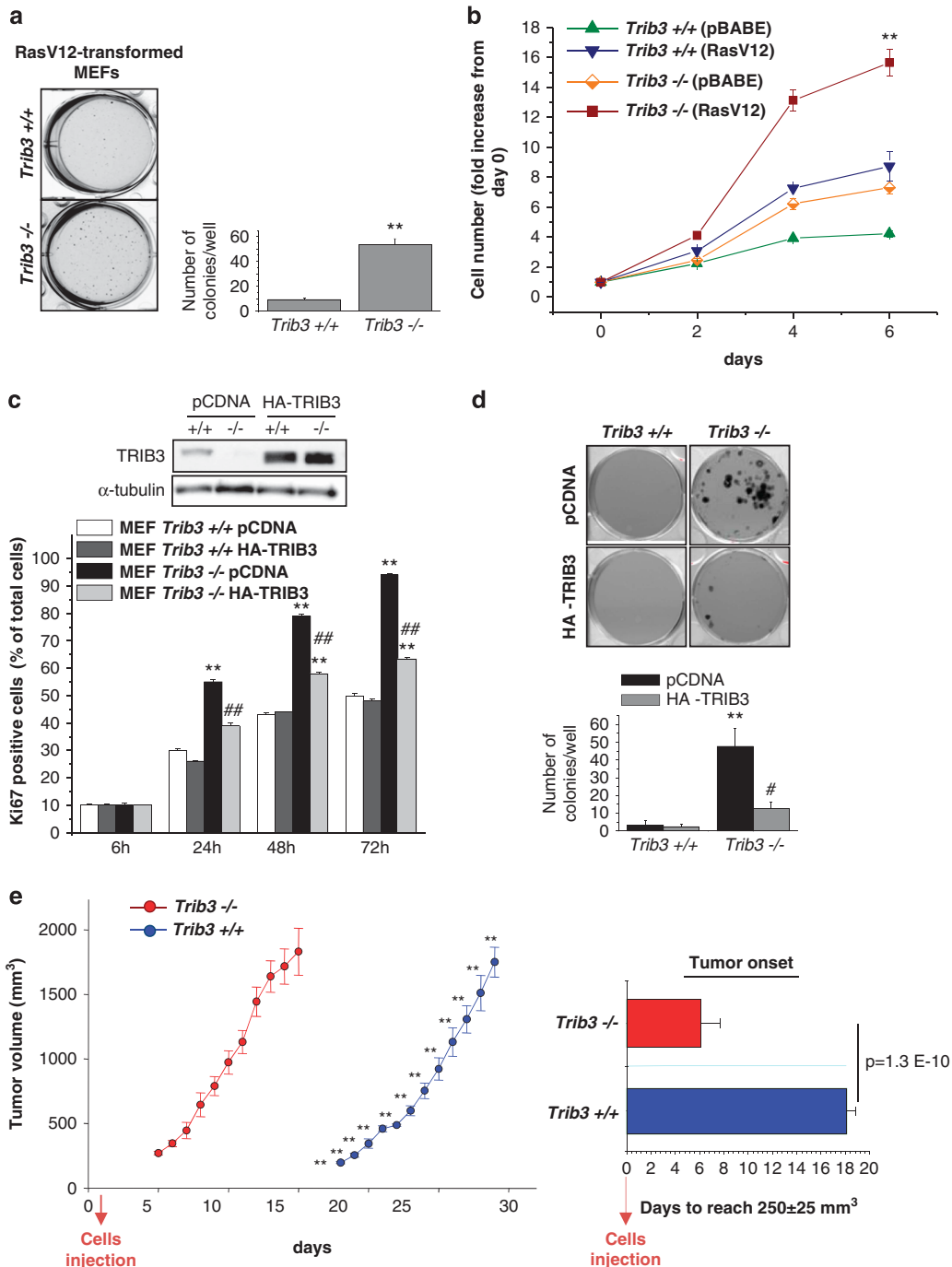
As a first approach to investigate the role of TRIB3 in the control of cancer progression, we analyzed the expression of this pseudokinase in several mouse skin carcinoma cell lines

exhibiting different degrees of differentiation and aggressiveness. Specifically, we studied the expression of *Trib3* in the MSC11B9/MSC11A5 and CarC-R/CarC cell lines, as they constitute homogenous cellular systems of malignant progression (MSC11B9 and MSC11A5 cells were derived, respectively, from the squamous component and the more undifferentiated region of the same carcinoma;<sup>20</sup> and CarC-R is a minority population of less aggressive epithelial cells isolated from the fusocellular carcinoma cell line CarC.<sup>21</sup>). *Trib3* expression was much lower in MSC11A5 and CarC cells than in their corresponding more differentiated counterparts (Figure 3a). Likewise, *Trib3* levels were lower in the spindle cell carcinoma cell line CarB when compared with those of PDV cells (derived from a squamous cell carcinoma cell line) (Figure 3a). Moreover, comparison of *Trib3* mRNA levels of normal skin, papillomas and skin carcinomas from mice revealed that *Trib3* expression correlated inversely with the aggressiveness of the lesion (Figure 3b). These observations support that downregulation of *Trib3* expression is associated with a more aggressive phenotype in mouse epithelial skin carcinomas.

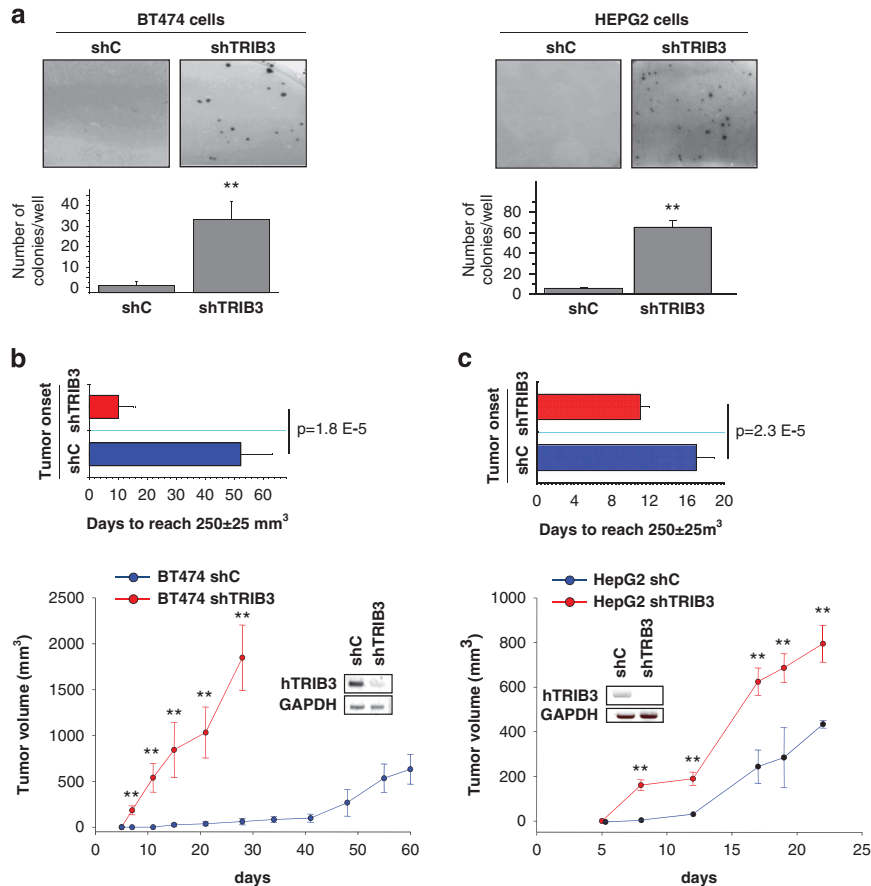
Based on these observations, we therefore next investigated the effect of *Trib3* genetic inactivation on the progression of the lesions observed in mice subjected to the two-stage skin carcinogenesis model as this is one of the best established paradigms for studying the mechanisms underlying malignant transformation *in vivo*.<sup>22</sup> Skin tumors were induced in *Trib3*<sup>+/+</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> mice of a mixed C57BL6/J 129/Ola background (see Supplementary Methods for details) by topical treatment with a single dose of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) followed by a repeated administration of the phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) for 20 weeks. After DMBA/TPA challenge, we observed no differences between *Trib3*<sup>+/+</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> mice either in the latency (time from treatment initiation to tumor development) or the size (data not shown) of the skin lesions. However, the frequency of malignant conversion, as determined by the percentage of papillomas that progressed into a more aggressive phenotype (squamous papillomas or squamous papillomas with dysplasia), was significantly higher in *Trib3*<sup>-/-</sup> mice than in their corresponding WT littermates after 20 or 32 weeks of the initiation of the treatment (Figures 3c and d). Statistically significant differences were not found between *Trib3*<sup>+/+</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> mice in the frequency of *in situ* or squamous cell carcinomas (Supplementary Figure S3).

### Loss of TRIB3 enhances the phosphorylation of AKT in cancer cells via mTORC2.

TRIB3 has been shown to interact with and inhibit AKT, and dysregulation of this kinase has a crucial role in cancer generation and progression.<sup>23</sup> Therefore we next investigated whether the enhanced tumorigenic properties of cells in which TRIB3 has been genetically inhibited rely on an enhanced stimulation of the AKT signalling pathway. In line with this idea, Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*-deficient MEFs, as well as breast carcinoma (BT474) and hepatocellular carcinoma (HepG2) cell lines in which TRIB3 had been knocked down, exhibited an enhanced phosphorylation of AKT (Figure 4a and Supplementary Figure S4a). Moreover, the increase triggered by the genetic inhibition of *Trib3* in the number of



**Figure 1** Genetic inhibition of TRIB3 facilitates oncogene transformation and enhances the tumorigenicity of transformed embryonic fibroblasts. (a) Effect of RasV12 expression on the ability of Trib3<sup>+/+</sup> and Trib3<sup>-/-</sup> MEFs to form colonies in soft agar (cells were transduced with a retroviral vector encoding RasV12) (mean  $\pm$  S.D.;  $n=3$ ;  $**P<0.01$  from Trib3<sup>+/+</sup> MEFs). (b) Effect of transduction with a retroviral vector encoding RasV12 or with the empty retroviral vector pBABE on Trib3<sup>+/+</sup> and Trib3<sup>-/-</sup> MEF cell number. Data correspond to the number of cells at each time point (as determined by crystal violet staining) relative to the number of cells at day 0 for each experimental condition (mean  $\pm$  S.D.;  $n=3$ ;  $**P<0.01$  from RasV12-Trib3<sup>+/+</sup> MEFs). (c) Effect of HA-TRIB3 expression on the percentage of Ki67-positive RasV12/E1A-transformed Trib3<sup>+/+</sup> and Trib3<sup>-/-</sup> MEFs. Data correspond to the percentage of Ki67-positive cells relative to the total number of cells in each experimental condition (mean  $\pm$  S.D.;  $n=4$ ;  $**P<0.01$  from empty vector-transfected Trib3<sup>+/+</sup> cells and  $##P<0.01$  relative to empty vector-transfected Trib3<sup>-/-</sup> cells). Upper panel: Western blotting analysis of TRIB3 expression. A representative experiment ( $n=4$ ) is shown. (d) Effect of HA-TRIB3 expression on the ability RasV12/E1A-transformed Trib3<sup>+/+</sup> and Trib3<sup>-/-</sup> MEFs to form colonies in soft agar (mean  $\pm$  S.D.;  $n=6$ ;  $**P<0.01$  relative to empty vector-transfected Trib3<sup>+/+</sup> cells and  $#P<0.05$  relative to empty vector-transfected Trib3<sup>-/-</sup> cells). (e) Effect of Trib3 genetic inactivation on the growth of tumor xenografts generated by subcutaneous injection of RasV12/E1A-transformed MEFs in nude mice. Data correspond to the mean volume change  $\pm$  S.E.M. at each time point ( $n=8$  for each condition;  $4 \times 10^6$  cells were injected in each experimental condition). Right panel: Data correspond to the time elapsed from the injection of the cells until the tumors reach an average volume of  $250 \pm 25$  mm<sup>3</sup> (mean  $\pm$  S.E.M.;  $n=8$  for each condition;  $**P<0.01$  from tumors generated with Trib3<sup>-/-</sup> MEFs)



**Figure 2** Genetic inhibition of TRIB3 enhances the tumorigenicity of cancer cell lines. (a) Effect of TRIB3 stable knockdown on the ability of BT474 (left panel) and HepG2 (right panel) cells to form colonies in soft agar (mean  $\pm$  S.D.;  $n=3$ ; \*\* $P<0.01$  relative to BT474 or HepG2 cells stably transduced with a lentiviral vector encoding a control (non-targeted) shRNA sequence (shC)). (b and c) Effect of TRIB3 stable knockdown on the growth of tumor xenografts generated by subcutaneous injection of BT474 (b) and HepG2 (c) cells in nude mice. Data on the lower panels correspond to tumor volume (mean  $\pm$  S.E.M.;  $n=6$  for each condition; \* $P<0.05$  and \*\* $P<0.01$  from tumors generated with shC BT474 (b) and shC HEPG2 (c) cells). Upper panels: Data correspond to the time elapsed from the injection of the cells until the tumors reach an average volume of  $250 \pm 25$  mm<sup>3</sup> (mean  $\pm$  S.E.M.;  $n=6$  for each condition). Insets in panels b and c show the expression of human TRIB3 mRNA levels (hTRIB3) (as determined by RT-PCR) in tumors generated with shC- and shTRIB3-transduced cells

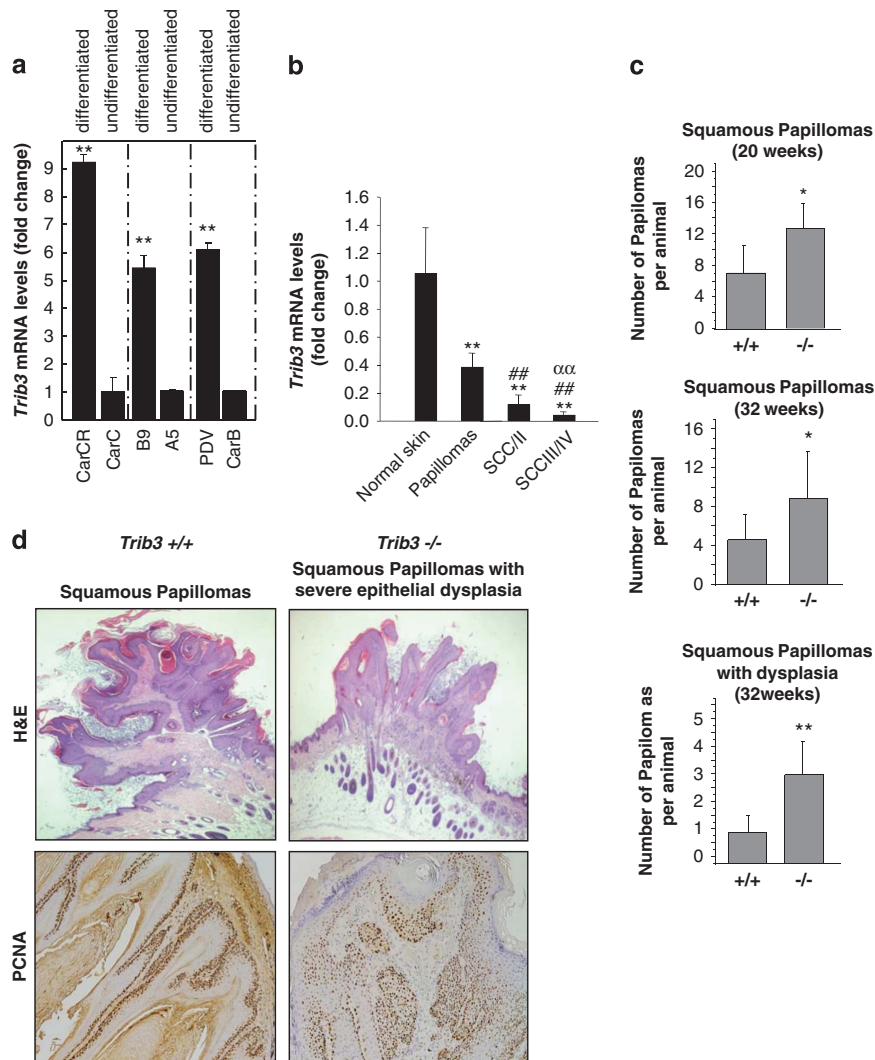
HepG2 and BT474 cells observed after several days in culture was prevented by the pharmacological inhibition of the Akt pathway (Supplementary Figures S4b–c). Likewise, knockdown of TRIB3 enhanced AKT phosphorylation in BT474- and HepG2- cell-derived tumor xenografts (Figure 4b). Moreover, tumors derived from Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> cells exhibited higher phosphorylation levels of AKT than those derived from their corresponding WT counterparts (Figure 4b). Furthermore, cutaneous squamous papillomas from *Trib3*<sup>-/-</sup> mice also showed higher AKT phosphorylation levels than the papillomas derived from their WT littermates (Figure 4c).

To investigate the mechanism by which the loss of TRIB3 enhances AKT phosphorylation, we analyzed the effect of re-expressing an HA-tagged form of TRIB3 in *Trib3*-deficient cells. TRIB3 re-expression abolished the enhanced phosphorylation of AKT in Ser 473 but did not modify the phosphorylation of the kinase in Thr 308 (Figure 4d). As AKT is phosphorylated on Ser473 by the mTORC2,<sup>24</sup> we next investigated whether the enhanced phosphorylation of AKT on Ser 473 observed in *Trib3*-deficient cells relied on the dysregulation of the phosphorylation of AKT by mTORC2. In

line with this idea, silencing of the mTORC2 protein component rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR) or incubation with the mTOR kinase inhibitor torin-1 abolished the enhanced phosphorylation of AKT observed in Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs (Figure 4e) as it also did the re-expression of HA-TRIB3 (Supplementary Figure S4d). Moreover, Rictor knockdown prevented the increase (triggered by the genetic inhibition of *Trib3*) in the number (Figure 4f) and clonogenicity (Figure 4g) of Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed MEFs, thus suggesting that the tumorigenic properties of *Trib3*-deficient cells rely on the enhanced phosphorylation of AKT by mTORC2.

**Loss of *Trib3* enhances the incidence of premalignant and malignant lesions in *Pten*<sup>+/-</sup> mice.** To investigate the relevance of the TRIB3-dependent regulation of AKT in cancer, we next analyzed the *in vivo* effect of the genetic inactivation of *Trib3* together with that of the tumor-suppressor gene phosphatase and tensin homolog (PTEN). PTEN is a highly mutated and frequently lost tumor suppressor in cancer that negatively regulates the activation of the PI3K pathway through the dephosphorylation of phosphatidylinositol 3,4,5





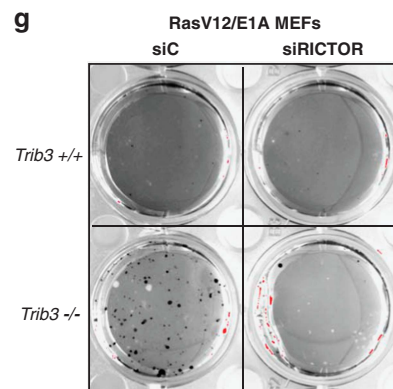
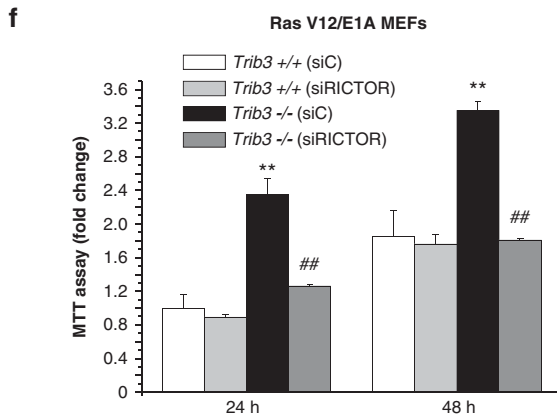
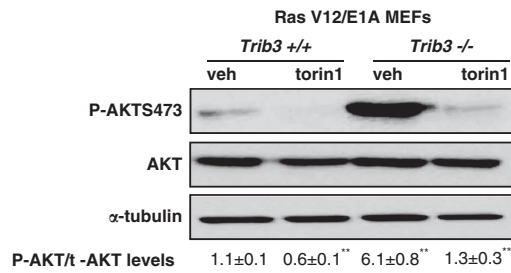
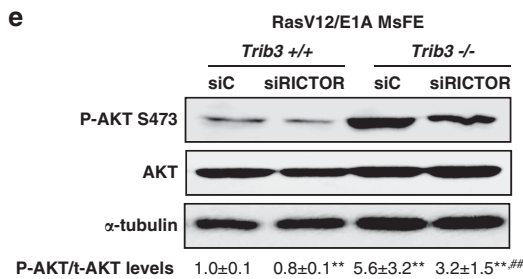
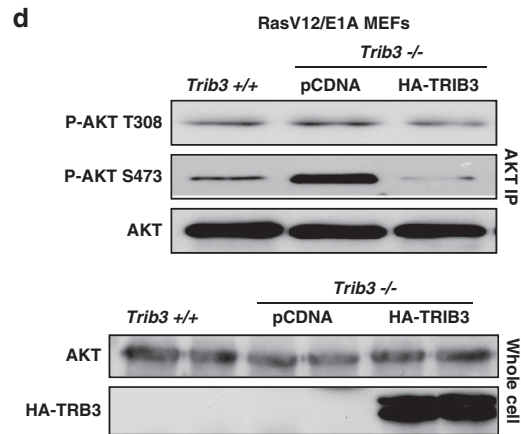
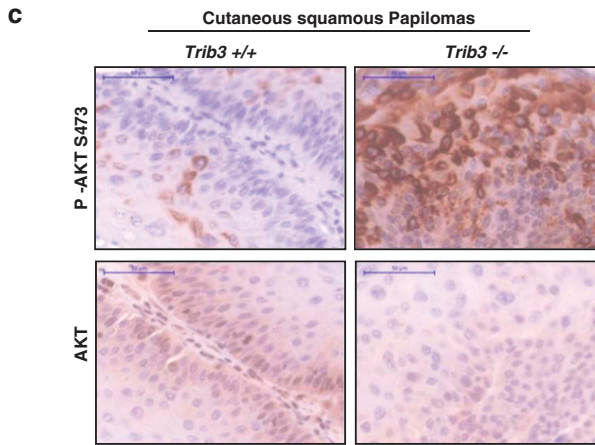
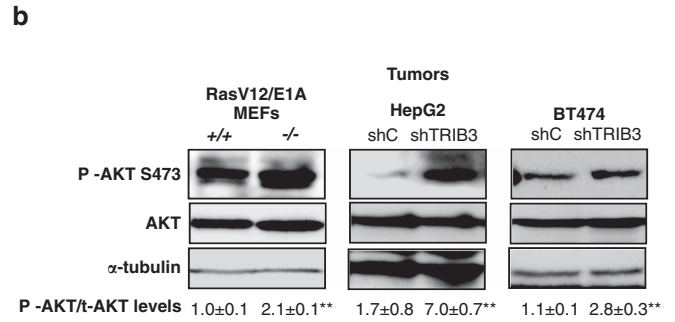
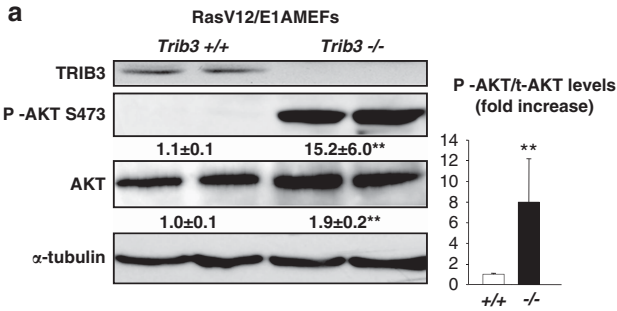
**Figure 3** TRIB3 genetic inactivation accelerates the malignant progression of mouse skin papillomas. (a) TRIB3 mRNA levels as determined by real-time quantitative PCR in different mouse skin cancer cell lines. Data are expressed as the mean fold-increase  $\pm$  S.D. relative to the corresponding less differentiated cell lines ( $n=3$ ;  $**P<0.01$  compared with undifferentiated cells). (b) TRIB3 mRNA levels as determined by real-time quantitative PCR in samples derived from normal skin, papillomas, squamous cell carcinomas (SCC) grades I and II (SCCI/II) and SCC grades III and IV (SCCIII/IV) obtained from mice subjected to the two-stage model of skin carcinogenesis. Data correspond to TRIB3 mRNA levels and are expressed as the mean fold change  $\pm$  S.D. relative to normal skin ( $n=8, 8, 6$  and  $6$  for normal skin, papillomas, SCCI/II and SCCIII/IV, respectively;  $**P<0.01$  from normal skin;  $##P<0.01$  from papillomas and  $\alpha\alpha P<0.01$  from SCC I/II samples). (c) Effect of TRIB3 genetic inactivation on the degree of differentiation and aggressiveness of the skin lesions appeared in *Trib3*<sup>-/-</sup> and *Trib3*<sup>+/+</sup> mice subjected to the two-stage skin carcinogenesis protocol (Animals were killed 20 or 32 weeks after the administration of the DMBA treatment and subsequently subjected to histopathological analyses). Data are expressed as the mean number of squamous papillomas or squamous papillomas with dysplasia per animal  $\pm$  S.E.M. (week 20: six *Trib3*<sup>+/+</sup> and five *Trib3*<sup>-/-</sup> mice; week 32: seven *Trib3*<sup>+/+</sup> and nine *Trib3*<sup>-/-</sup> mice;  $**P<0.01$  or  $*P<0.05$  from *Trib3*<sup>+/+</sup> animals). (d) Representative images of hematoxylin/eosin (upper panel,  $\times 2$ ) and PCNA staining (lower panel,  $\times 10$ ) of squamous papillomas and squamous papillomas with severe dysplasia observed in *Trib3*<sup>+/+</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> mice. See also Supplementary Fig S3

triphosphate.<sup>25</sup> Importantly, studies in mice have demonstrated that PTEN is a haplo-insufficient tumor suppressor, as genetic deletion of one copy of the gene is sufficient to unleash oncogenic responses in different organs.<sup>26</sup> Accordingly, *Pten*<sup>+/-</sup> mice exhibit an enhanced activation of the AKT pathway and spontaneously develop malignant lesions in different tissues, including prostate, adrenal glands and thyroid.<sup>27</sup> Therefore we crossed *Trib3*<sup>-/-</sup> mice with *Pten*<sup>+/-</sup> mice to study whether loss of Trib3 results in an acceleration of these lesions. Eight-month-old animals were killed, and histopathological analyses were performed to analyze the presence of premalignant and malignant lesions

in different tissues. *Trib3*<sup>-/-</sup> mice exhibited a very low frequency of lesions in the different tissues analyzed. However, *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>+/-</sup> and *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> mice showed a higher frequency of premalignant and malignant lesions than *Pten*<sup>+/-</sup> mice in prostate, adrenal glands and thyroid (Table 1, Figure 5a and Supplementary Figure S5). Specifically, 100% of *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> versus 50% of *Pten*<sup>+/-</sup> mice developed prostatic intraepithelial neoplasia. Likewise, 67% of *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> versus 37% of *Pten*<sup>+/-</sup> mice showed hyperplasia of the adrenal glands, and 11% of *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> versus 0% of *Pten*<sup>+/-</sup> mice developed pheochromocytomas (Figure 5a). Moreover, AKT phosphorylation was increased

in hyperplastic adrenal medullas of *Trib3*<sup>-/-</sup> *Pten*<sup>+/-</sup> animals when compared with the same lesion in *Pten*<sup>+/-</sup> mice (Figure 5b). These findings strongly support that loss of Trib3 accelerates the formation of premalignant and malignant lesions in *Pten*<sup>+/-</sup> mice.

**Loss of Trib3 promotes FOXO inactivation.** Next, we investigated the targets of AKT that are involved in the enhanced tumorigenic features of cells in which TRIB3 has been genetically inhibited. Remarkably, genetic inhibition of Trib3 led to an enhanced phosphorylation of some of the



downstream targets of AKT – namely the transcription factor Forkhead box O3 (FOXO3) and the BH3-only protein BCL2-associated agonist of cell death (BAD) – but not of others such as glycogen synthase kinase 3 (GSK3) or proline-rich AKT substrate (PRAS40) (Figure 6a and Supplementary Figure S6a). Likewise, phosphorylation of FOXO3 (but not of

the ribosomal protein S6 – whose phosphorylation correlates under many cellular settings with activation of the mTORC1 complex) was enhanced in TRIB3-silenced BT474 and HepG2 cells (Supplementary Figure S6b).

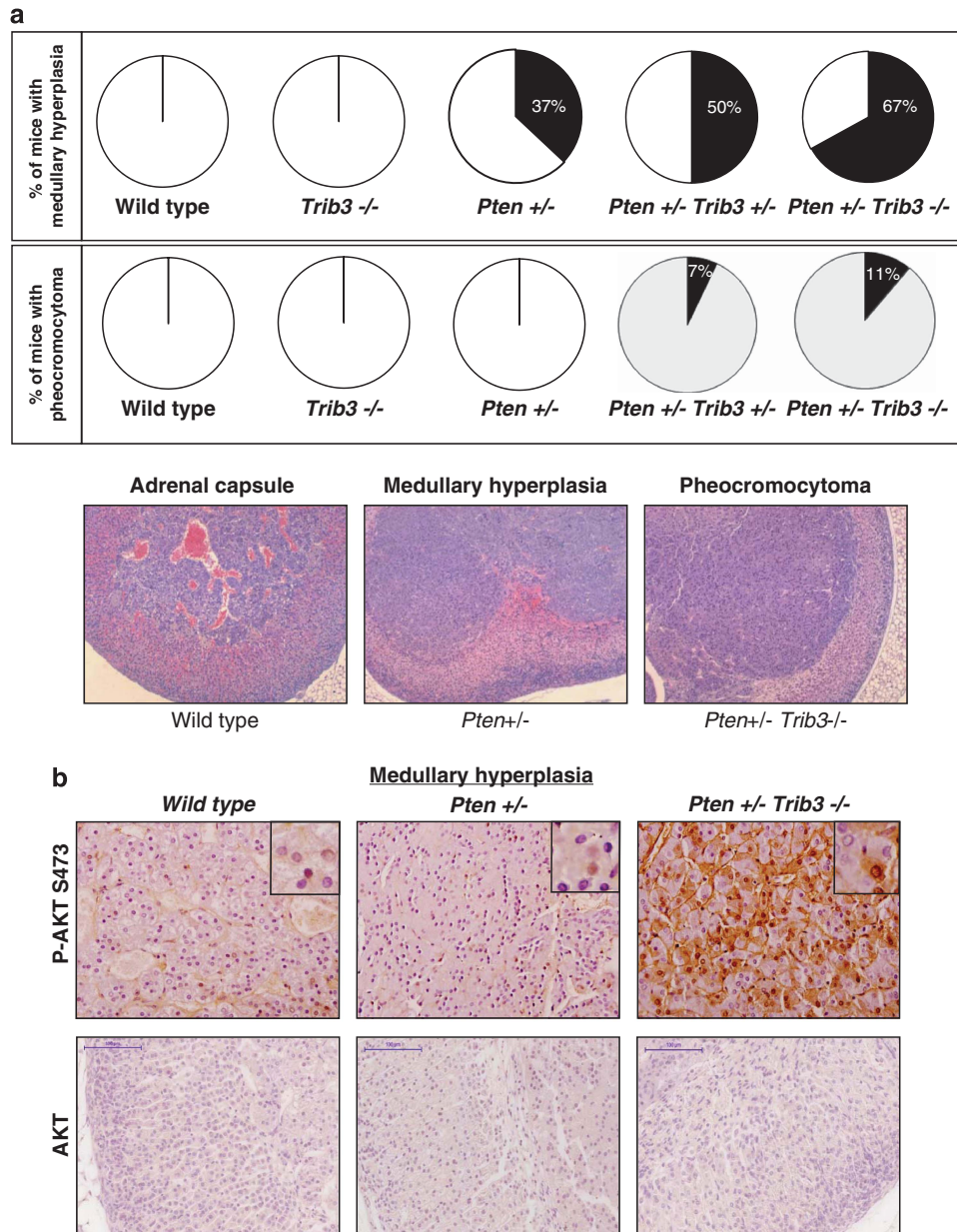
We therefore next investigated whether the enhanced phosphorylation of FOXO3 and BAD observed in TRIB3-deficient cells

**Table 1** Loss of TRIB3 accelerates the formation of premalignant and malignant lesions in *Pten*<sup>+/-</sup> mice

	Wild type n = 14	<i>Trib3</i> <sup>+/-</sup> n = 9	<i>Trib3</i> <sup>-/-</sup> n = 12	<i>Pten</i> <sup>+/-</sup> n = 8	<i>Pten</i> <sup>+/-</sup> <i>Trib3</i> <sup>+/-</sup> n = 14	<i>Pten</i> <sup>+/-</sup> <i>Trib3</i> <sup>-/-</sup> n = 9
<b>Lymph node</b>						
Lymphoid hyperplasia submandibular	0%	0%	0%	62%	57%	67%
Lymphoid hyperplasia abdominal ganglia	0%	0%	0%	0%	0%	22%
<b>Thyroid</b>						
Hyperthyroidism	0%	11%	0%	12%	64%	55%
Thyroid adenoma	0%	0%	0%	0%	14%	11%
<b>Liver</b>						
Lymphoid infiltrates	0%	0%	8%	12%	0%	0%
Steatohepatitis	0%	0%	0%	0%	7%	11%
<b>Intestine</b>						
Adenoma	0%	0%	0%	12%	7%	11%
<b>Spleen</b>						
Lymphoid hyperplasia	0%	0%	0%	0%	0%	11%
	Wild type n = 9	<i>Trib3</i> <sup>+/-</sup> n = 5	<i>Trib3</i> <sup>-/-</sup> n = 4	<i>Pten</i> <sup>+/-</sup> n = 4	<i>Pten</i> <sup>+/-</sup> <i>Trib3</i> <sup>+/-</sup> n = 12	<i>Pten</i> <sup>+/-</sup> <i>Trib3</i> <sup>-/-</sup> n = 3
<b>Anterior prostate</b>						
Hyperplasia	11%	0%	0%	75%	100%	100%
Adenoma	0%	0%	0%	25%	36%	67%
PIN	0%	0%	0%	50%	63%	33%
<b>Dorsal prostate</b>						
Hyperplasia	11%	0%	0%	50%	83%	100%
Adenoma	0%	0%	0%	0%	25%	0%
PIN	0%	0%	0%	50%	75%	100%

Incidence of premalignant and malignant lesions (as determined by histopathological analysis) in different tissues and organs of 8-month-old wild-type, *Trib3*<sup>+/-</sup>, *Trib3*<sup>-/-</sup>, *Pten*<sup>+/-</sup>, *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>+/-</sup> and *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> mice. Values in bold correspond to lesions that are more frequent in *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>+/-</sup> and *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> mice than in *Pten*<sup>+/-</sup> mice.

**Figure 4** Loss of TRIB3 enhances the phosphorylation of AKT in cancer cells via mTORC2. (a) Effect of TRIB3 genetic inactivation on AKT phosphorylation of RasV12/E1A-transformed MEFs. Values below each of the western blottings correspond to the densitometric analysis of the ratio Phospho-Akt (P-Akt)/tubulin and total Akt (t-Akt)/tubulin, respectively, and are expressed as the mean fold change ± S.D. relative to *Trib3*<sup>+/+</sup> cells. Data on the right panel correspond to the P-Akt/t-Akt ratio and are expressed as the mean fold change ± S.D. relative to *Trib3*<sup>+/+</sup> cells. (*n* = 4; \*\**P* < 0.01 from *Trib3*<sup>+/+</sup> cells) (b) Effect of TRIB3 genetic inactivation (left panel) or stable knockdown (middle and right panels) on AKT phosphorylation as determined by western blotting analysis of tumor xenografts generated by subcutaneous injection of RasV12/E1A-transformed MEFs (left panel), HepG2 (middle panel) and BT474 (right panel) cells in nude mice. Data correspond to the densitometric analysis of AKT phosphorylation expressed as the P-Akt/t-Akt ratio relative to *Trib3*<sup>+/+</sup>-MEFs (left panel), shC BT474 (middle panel) or shC BT474 (right panel) tumors (*n* = 3; mean ± S.D.) (\*\**P* < 0.01 from tumors generated with *Trib3*<sup>+/+</sup> MEFs, shC HEPG2 or shC BT474 cells). (c) Effect of TRIB3 genetic inactivation on AKT phosphorylation of cutaneous squamous papillomas. Representative images (× 40) of P-AKT and t-AKT immunohistochemistry staining from three cutaneous squamous papillomas per experimental condition are shown. (d) Effect of HA-TRIB3 expression on the phosphorylation of Akt on Thr 308 and Ser 473 of RasV12/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs (*n* = 3, a representative experiment is shown). Upper panel: AKT was immunoprecipitated from cell extracts obtained from RasV12/E1A-transformed *Trib3*<sup>+/+</sup> or *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs transfected with an empty vector (pCDNA) or a plasmid encoding HA-TRIB3. Lower panel: Analysis of total AKT and HA-TRIB3 levels in the corresponding whole cell extracts (samples were loaded by duplicate). (e) Effect of RICTOR knockdown (left panel) or incubation in the presence of torin1 (250 nM, 18 h; right panel) on the phosphorylation of AKT on Ser 473 of RasV12/E1A-transformed *Trib3*<sup>+/+</sup> or *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs (*n* = 3; a representative western blotting analysis is shown). Values below each of the western blottings correspond to the P-Akt/t-Akt ratio and are expressed as the mean fold change ± S.D. relative to shC, *Trib3*<sup>+/+</sup> (left panel) or veh-treated *Trib3*<sup>+/+</sup> (right panel) cells. (*n* = 3; \*\**P* < 0.01 from shC *Trib3*<sup>+/+</sup> (left panel) or veh-treated shC *Trib3*<sup>+/+</sup> (right panel) cells and ##*P* < 0.01 from shC *Trib3*<sup>-/-</sup> cells (left panel) or from veh-treated *Trib3*<sup>-/-</sup> (right panel) cells) (f) Effect of RICTOR knockdown on the number (as estimated by the MTT test) of RasV12/E1A-transformed *Trib3*<sup>+/+</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs. Data are expressed as the mean fold increase ± S.D. relative to siC *Trib3*<sup>+/+</sup> MEFs at 24 h; (*n* = 4; \*\**P* < 0.01 from siC-transfected *Trib3*<sup>+/+</sup> MEFs; ##*P* < 0.01 from siC-transfected *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs). (g) Effect of RICTOR knockdown on the ability of RasV12/E1A-transformed *Trib3*<sup>+/+</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs to form colonies in soft agar (*n* = 3. Images of one representative experiment are shown). (e–g) Transfection with RICTOR siRNA reduced RICTOR mRNA levels (as determined by quantitative real-time PCR) of *Trib3*<sup>+/+</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> cells by 83 ± 1 and 91 ± 2%, respectively (*P* < 0.01 from the corresponding siC-transfected RasV12/E1A-MEFs; *n* = 4)

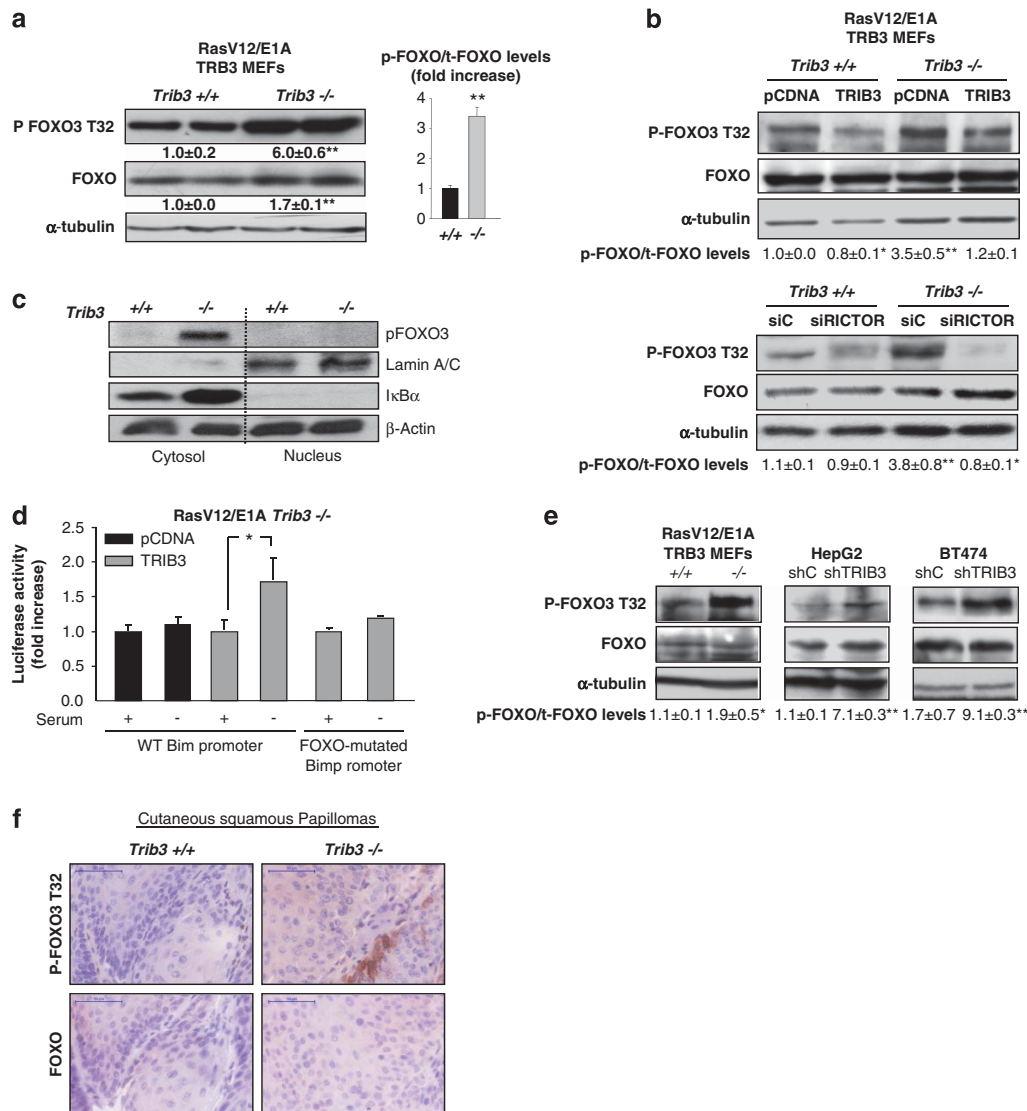


**Figure 5** Loss of TRIB3 enhances the incidence of premalignant and malignant lesions in *Pten*<sup>+/-</sup> mice. (a) Effect of the genetic inactivation of TRIB3 on the incidence of premalignant and malignant lesions in the adrenal glands of *Pten*<sup>+/-</sup> mice. Data are expressed as the percentage of animals of each genotype that exhibit hyperplasia of the adrenal glands (upper panel) or pheochromocytomas (middle panels). Bottom panel: Representative microphotographs ( $\times 10$ ) of the different lesions observed in the adrenal glands of *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>+/-</sup> and *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> animals stained with hematoxylin/eosin. (b) Representative microphotographs of anti-phospho AKT and total Akt immunostaining of the adrenal glands of WT, *Pten*<sup>+/-</sup> and *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> animals. Note that the hyperplastic region located in the medulla of the adrenal gland exhibits strong phospho-AKT immunostaining in *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> mice but not in *Pten*<sup>+/-</sup> mice ( $n=3$ ;  $\times 40$ ). Insets show details of the different panels at higher magnification. See also Supplementary Figure S5

relied on the dysregulation of the phosphorylation of AKT by mTORC2. In line with this idea, silencing of the mTORC2 protein component Rictor or incubation with the mTOR kinase inhibitor torin-1 abolished the enhanced phosphorylation of FOXO and BAD observed in *Trib3*-deficient MEFs at the same extent as the re-expression of HA-TRIB3. By contrast, phosphorylation of Pras40 was not modified in any of those experimental conditions (Figure 6b and Supplementary Figures S6c and d).

It has been widely reported that the FOXO family of transcription factors has an important tumor-suppressing

role.<sup>28</sup> As genetic inhibition of *Trib3* enhances FOXO3 phosphorylation – an event that typically leads to the inactivation and the subsequent sequestration in the cytosol of this transcription factor<sup>23,29,30</sup> – we asked whether the activity of FOXO is altered in *Trib3*<sup>-/-</sup> cells. In line with this idea, FOXO3 exhibited a primarily cytosolic localization in Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs subjected to serum withdrawal – an insult that typically leads to FOXO3 translocation to the nucleus<sup>30</sup> (Figure 6c). In contrast, the distribution of FOXO3 was mainly nuclear in



**Figure 6** Loss of TRIB3 promotes FOXO inactivation. (a) Effect of TRIB3 genetic inactivation on the phosphorylation of FOXO, of Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed MEFs. Values below the western blottings correspond to the densitometric analysis of the ratio Phospho-FOXO (P-FOXO)/tubulin and total FOXO (t-FOXO)/tubulin respectively and are expressed as the mean fold change ± S.D. relative to Trib3<sup>+/+</sup> cells. Data on the right panel correspond to the P-FOXO/t-FOXO ratio and are expressed as the mean fold change ± S.D. relative to Trib3<sup>+/+</sup> cells. (n = 4; \*\*P < 0.01 from Trib3<sup>+/+</sup> cells) (b) Effect of TRIB3 re-expression (upper panel), and RICTOR knockdown (lower panel) on the phosphorylation of FOXO, of Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed Trib3<sup>+/+</sup> and Trib3<sup>-/-</sup> MEFs. Values at the bottom of the panels correspond to the P-FOXO/t-FOXO ratio and are expressed as the mean fold change ± S.D. relative to pCDNA Trib3<sup>+/+</sup> (upper panel) or siC-transfected Trib3<sup>+/+</sup> (lower panel) MEFs. (n = 3; \*\*P < 0.01 and \*P < 0.05 from pCDNA Trib3<sup>+/+</sup> (upper panel) or siC-transfected Trib3<sup>+/+</sup> (lower panel) cells. Transfection with RICTOR siRNA reduced RICTOR mRNA levels (as determined by quantitative real-time PCR) of Trib3<sup>+/+</sup> and Trib3<sup>-/-</sup> cells by 83 ± 1 and 91 ± 2%, respectively (n = 4; P < 0.01 from the corresponding siC-transfected RasV12/E1A-MEFs). (c) Effect of serum withdrawal on the sub-cellular distribution (as determined by cellular fractionation and subsequent western blotting analysis of cytosolic and nuclear fractions) of endogenous FOXO in RasV12/E1A-transformed Trib3<sup>+/+</sup> and Trib3<sup>-/-</sup> MEFs. β-Actin was used as a loading control. IκB-α and Lamin A/B were used as markers of the cytosolic and the nuclear fractions, respectively (n = 3; a representative experiment is shown). (d) Effect of serum withdrawal on the activity of the Bim promoter of RasV12/E1A-transformed Trib3<sup>-/-</sup> MEFs transfected with a vector encoding HA-TRIB3 or a control plasmid and co-transfected with a luciferase reporter vector containing the sequence of the Bim promoter (WT or mutated on the FOXO-binding sites). Data correspond to the luciferase activity and are expressed as the mean fold increase ± S.D. relative to HA-TRIB3-transfected Trib3<sup>-/-</sup> cells incubated in the presence of serum (n = 3; \*P < 0.05 from serum-treated HA-TRIB3-transfected Trib3<sup>-/-</sup> cells). (e) Effect of TRIB3 genetic inactivation (e, left panel) or stable knockdown (e, middle and right panels) on FOXO phosphorylation as determined by western blotting analysis of tumor xenografts generated by subcutaneous injection of RasV12/E1A-transformed MEFs (left panel), HepG2 (middle panel) and BT474 cells (right panel) in nude mice. Values in the bottom of the panels correspond to the P-FOXO/t-FOXO ratio and are expressed as the mean fold change ± S.D. relative to Trib3<sup>+/+</sup> tumors (left panel) or shC HepG2 tumors (middle panel) or shC BT474 tumors (right panel) (n = 3; \*\*P < 0.01 or \*P < 0.05 from tumors generated with Trib3<sup>+/+</sup> MEFs, shC HEPG2 or shC BT474 cells). (f) Effect of TRIB3 genetic inactivation on FOXO3 phosphorylation of cutaneous squamous papillomas. Representative images (× 40) of phospho-FOXO1/3 or total FOXO3 immunohistochemistry staining from three cutaneous squamous papillomas per experimental condition are shown. See also Supplementary Figure S6

Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed Trib3<sup>+/+</sup> MEFs upon the same experimental conditions (Figure 6c). Likewise, serum withdrawal – which triggers the upregulation of the Bcl-2 family

gene Bcl-2 interacting mediator of cell death (BCL2-like 11 (BIM)) in a FOXO-dependent manner – led to the activation of the Bim promoter in Trib3<sup>+/+</sup> but not in Trib3<sup>-/-</sup> cells

(Supplementary Figure S6e). Furthermore, TRIB3 re-expression restored the ability of serum deprivation to activate the *Bim* promoter in *Trib3*<sup>-/-</sup> cells, and this effect was abolished when the FOXO-binding sites were mutated in this promoter, thus supporting that TRIB3 participates in the regulation of FOXO activity (Figure 6d). To investigate the *in vivo* relevance of our findings, we next analyzed whether genetic inhibition of TRIB3 affects the phosphorylation of FOXO in tumor samples. Knockdown of TRIB3 enhanced FOXO3 phosphorylation in HepG2- and BT474-cell-derived tumor xenografts (Figure 6e) which occurred in concert with an enhanced expression of a the cell proliferation marker Ki67 in those tumors (Supplementary Figures S6f and g). Likewise, tumors derived from Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> cells exhibited a higher phosphorylation of FOXO (Figure 6e) that was associated with an enhanced Ki67 immunostaining (Supplementary Figure S6h) compared with tumors derived from their corresponding WT counterparts. Furthermore, cutaneous squamous papillomas from *Trib3*<sup>-/-</sup> mice also showed higher FOXO1/3 phosphorylation levels than the papillomas derived from their WT littermates (Figure 6f).

**Loss of Trib3 enhances tumor growth via FOXO inactivation.** To study whether the enhanced tumorigenic properties of *Trib3*<sup>-/-</sup> cells relies on FOXO inhibition, we made use of a construct encoding a form of FOXO3 in which the residues phosphorylated by AKT are mutated to Ala (FOXO-A3). Unlike the endogenous form of FOXO3, the FOXO-A3 mutant is located in the nucleus of *Trib3*<sup>-/-</sup> cells (Figure 7a). Moreover, the expression of FOXO-A3 in *Trib3*<sup>-/-</sup> cells re-established the pattern of FOXO-regulated genes (Supplementary Figure S7a), as well as the ability of serum deprivation to activate the *Bim* promoter (Supplementary Figure S7b). In addition, FOXO-A3 expression abolished the increase in the number of cells and the enhanced clonogenicity characteristic of *Trib3*<sup>-/-</sup> cells (Figures 7b and c).

Therefore, we next analyzed the effect of the stable expression of the FOXO-A3 mutant on the ability of Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs to generate tumor xenografts. As shown in Figure 7d, the growth rate of tumors generated with Foxo-A3-*Trib3*<sup>-/-</sup> cells was strongly reduced

in comparison with that of *Trib3*<sup>-/-</sup> cells. Likewise, tumors derived from FOXO-A3-*Trib3*<sup>-/-</sup> cells exhibited a decreased expression of Ki67 when compared with those generated with *Trib3*<sup>-/-</sup> cells (Figure 7e). Taken together, these observations strongly support that the enhanced tumorigenic properties of Trib3-deficient cells rely – at least in major part – on the enhanced phosphorylation and subsequent inhibition of FOXO transcription factors.

## Discussion

Several observations presented in this work show that TRIB3 has a remarkable tumor-suppressive role. For example, (i) oncogenic transformation is facilitated in MEFs derived from Trib3-deficient mice; (ii) genetic inhibition of TRIB3 enhances proliferation, clonogenicity and the ability to generate tumor xenografts of oncogene-transformed MEFs and of several human cancer cell lines; (iii) loss of TRIB3 enhances the frequency of malignant conversion of papillomas generated in mice subjected to DMBA/TPA treatment; and (iv) loss of TRIB3 enhances the incidence of premalignant and malignant lesions in *Pten*<sup>+/-</sup> mice.

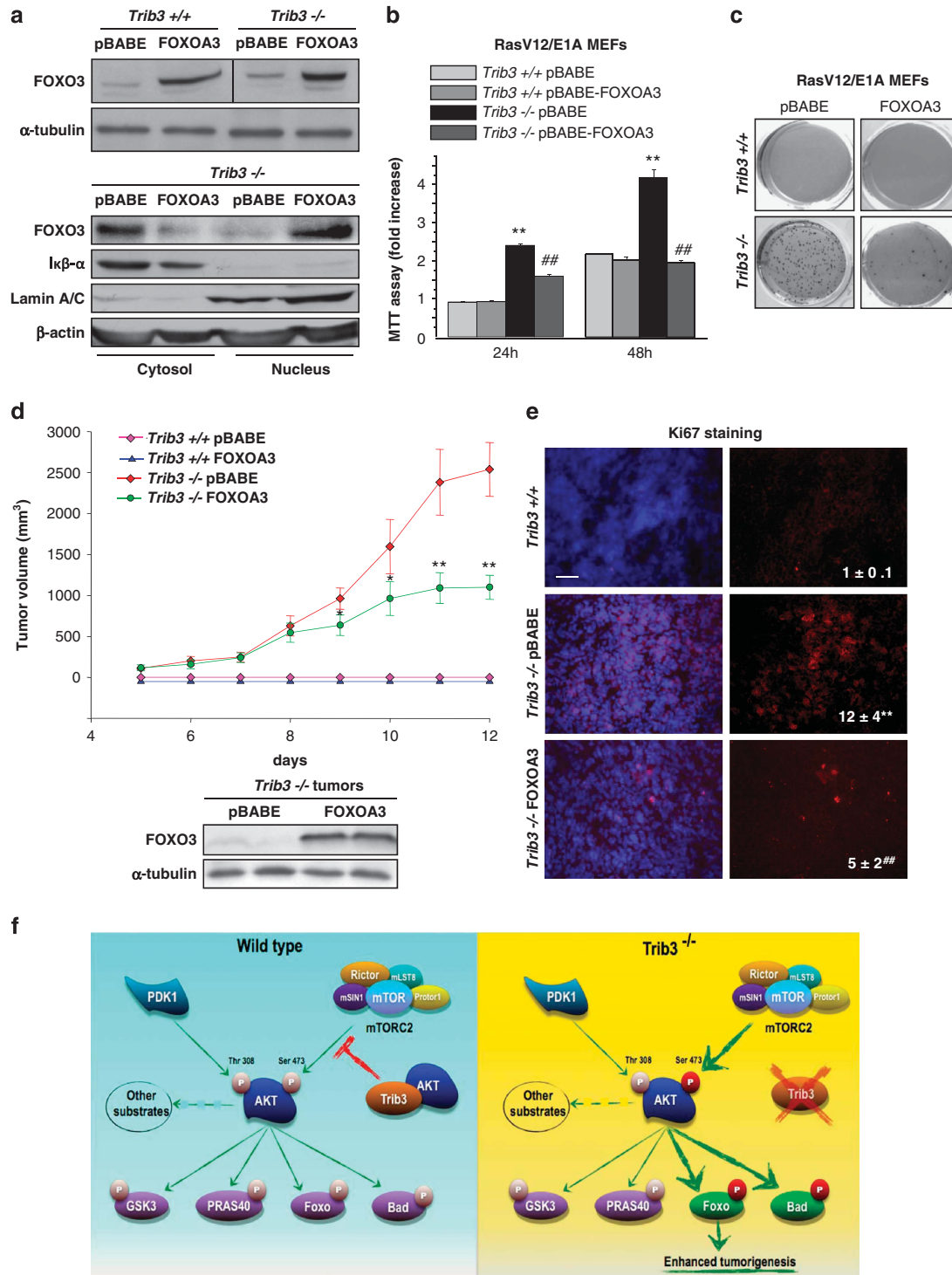
Our findings demonstrate that the tumor inhibitory role of TRIB3 relies to a large extent on the ability of this pseudokinase to regulate the activity of the AKT pathway. In line with this idea, we found that the genetic inactivation of Trib3 enhances the effect of the deletion of one of the two copies of *Pten* on the formation of premalignant and malignant lesions in mice. Of note, AKT phosphorylation is increased in hyperplastic adrenal medullas of *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> animals when compared with the same lesion in *Pten*<sup>+/-</sup> mice, thus suggesting that loss of Trib3 produces an increase in the phosphorylation of AKT that contributes to the malignant progression in this tissue. In the same line of reasoning, *Trib3*<sup>-/-</sup> mice subjected to the two-step skin carcinogenesis protocol generated papillomas of a more aggressive phenotype and with higher levels of AKT phosphorylation than papillomas generated in WT littermates. Likewise, tumor xenografts generated with Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs or with different cancer cell lines in which TRIB3 had been knocked down exhibited an enhanced phosphorylation of AKT when compared with their corresponding WT or control

**Figure 7** Loss of TRIB3 enhances tumor growth via FOXO inactivation. (a) Upper panel: Analysis of FOXO protein levels in Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>+/+</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs stably transfected with a constitutively active version of FOXO (FOXOA3) or the corresponding empty vector (pBABE). Lower panel: Sub-cellular distribution (as determined by cellular fractionation and subsequent western blotting analysis of cytosolic and nuclear fractions) of FOXO protein in Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs stably transfected with FOXOA3.  $\beta$ -Actin was used as a loading control.  $\text{I}\kappa\text{B}$  and Lamin A/B were used as markers of the cytosolic and the nuclear fractions, respectively ( $n=3$ ; a representative experiment is shown). (b) Effect of TRIB3 genetic inactivation and stable expression of FOXOA3 on the number of Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed MEFs (as estimated by the MTT test) at the indicated time points. Data are expressed as the mean fold change  $\pm$  S.D. relative to pBABE-*Trib3*<sup>+/+</sup> cells at 24 h (mean  $\pm$  S.D.;  $n=3$ ; \*\* $P<0.01$  from pBABE-*Trib3*<sup>+/+</sup> cells; # $P<0.01$  from pBABE-*Trib3*<sup>-/-</sup> cells). (c) Effect of TRIB3 genetic inactivation and stable expression of FOXOA3 on the ability of Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed MEFs to form colonies in soft agar ( $n=3$ ). A representative experiment is shown. (d) Effect of FOXOA3 stable expression and TRIB3 genetic inactivation on the growth of tumor xenografts generated by subcutaneous injection of Ras<sup>V12</sup>/E1A-transformed MEFs in nude mice. Data are expressed as the mean tumor volume  $\pm$  S.E.M for each experimental condition ( $n=8$  for each condition; volume of *Trib3*<sup>-/-</sup> FOXOA3 cell-derived tumor is compared with that of tumors derived from *Trib3*<sup>-/-</sup> pBabe cells; \*\* $P<0.01$  from pBABE-*Trib3*<sup>-/-</sup> cell-derived tumors). Lower panel: Analysis of FOXO protein levels in tumors derived from FOXOA3-*Trib3*<sup>-/-</sup> and pBABE-*Trib3*<sup>-/-</sup> cells. (e) Analysis of Ki67 immunostaining in samples from tumors derived from pBABE-*Trib3*<sup>+/+</sup>, pBABE-*Trib3*<sup>-/-</sup> and FOXOA3-*Trib3*<sup>-/-</sup> cells. Values in the lower right corner of microphotographs correspond to the Ki67-stained area relative to the total number of nuclei in each section and are expressed as the mean fold change relative to pBABE-*Trib3*<sup>+/+</sup> tumors  $\pm$  S.D. (\*\* $P<0.01$  from pBABE-*Trib3*<sup>+/+</sup> tumors; # $P<0.01$  from pBABE-*Trib3*<sup>-/-</sup> tumors; 18 sections for each of the 3 dissected tumors for each condition were counted). Representative microphotographs are shown. (f) Proposed model of the mechanism by which TRIB3 controls tumorigenesis. TRIB3 interacts with AKT, which regulates the phosphorylation of the kinase by the mTORC2 complex (left panel). Genetic inhibition of TRIB3 in combination with different oncogenic signals facilitates the hyperphosphorylation of AKT on Ser 473 by the mTORC2 complex and the subsequent hyperphosphorylation and inactivation of the transcription factor FOXO3 (as well as of the BH3-only protein BAD) but not of the other AKT downstream targets. The hyperphosphorylation and inactivation of FOXO is responsible – at least in part – for the enhanced tumorigenic features of TRIB3-deficient cells. See also Supplementary Figure S7 and Supplementary Table SII

siRNA-transfected counterparts. Taken together, these observations strongly suggest that TRIB3 limits the capacity of AKT to become overactivated in response to oncogenic signals.

Our findings also define the mechanism of the tumor-suppressive activity of TRIB3 downstream of AKT, which relies on the selective regulation of FOXO3 activity. Thus, re-expression of a mutant form of FOXO3 in which the residues

phosphorylated by AKT have been mutated to Ala abolished the enhanced proliferation and clonogenicity of TRIB3-deficient cells and re-established the pattern of FOXO-regulated genes characteristic of WT cells. Furthermore, re-expression of this construct decreased proliferation and growth rate of tumors generated with Trib3-deficient cells. Although care should be taken in the interpretation of data derived from the overexpression of a transcription factor,



these observations support that FOXO3 inactivation has a crucial role in the enhanced tumorigenic features of cells in which Trib3 is genetically inactivated. Nevertheless, the expression of the FOXO-A3 mutant affected the rate of tumor growth but did not modify the time to occurrence of tumors derived from *Trib3*<sup>-/-</sup> cells, thereby suggesting that – together with the regulation of FOXO activity – TRIB3 may use additional mechanisms to control tumorigenesis. Further research should therefore clarify the role played by FOXO in the regulation of cell survival and proliferation in cells in which TRIB3 has been genetically inhibited. Likewise, future studies should investigate whether the regulation of additional AKT targets (such as BAD) or of other targets of TRIB3 (including, for example, those previously implicated in the control of cell proliferation such as ATF-4, SMAD3 or CtIP<sup>3,31–33</sup>) may also contribute to the tumor-suppressor activity of TRIB3.

TRIB3 has been previously shown to interact with AKT,<sup>11,15</sup> although the precise mechanism by which this interaction regulates the activity of the kinase as well as the physiological consequences of this inhibition had not been completely clarified yet. Data presented here show that TRIB3 regulates the phosphorylation of AKT by the mTORC2 complex. Of potential relevance in this context, Sabatini's group has shown that genetic ablation of the mTORC2 component RICTOR affects the phosphorylation of FOXO but not of GSK3 or TSC2,<sup>34</sup> thereby suggesting that phosphorylation of AKT in Ser 473 could be sufficient for the kinase to phosphorylate some of its substrates. In line with this observation and with the notion that TRIB3 participates in the regulation of AKT phosphorylation by mTORC2, we found that genetic inactivation of TRIB3 leads to an enhanced phosphorylation of FOXO and BAD but not of GSK3 or PRAS 40. Moreover, we recently found that treatment with  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (a compound derived from the plant *Cannabis sativa* that exerts anti-tumor effects in mouse models of cancer<sup>14,15,35</sup>) triggers AKT inhibition via an enhanced interaction of TRIB3 with AKT and a subsequent decrease in the interaction of AKT and TRIB3 with the mTORC2 complex.<sup>19</sup> Our data also show that Trib3 interacts more strongly with WT AKT, or with AKT mutants in which Thr 308 and Ser 473 have been mutated to Ala, than with AKT mutants in which these two phosphorylatable residues have been mutated to Asp to mimic the negative charge associated with their phosphorylation (author's unpublished observations). Altogether, these observations cogently support that the interaction with TRIB3 negatively regulates AKT by restricting the access of the kinase to the mTORC2 complex (a schematic of the proposed model is shown in Figure 7f). Moreover, our findings also show that TRIB3 may contribute to the regulation of AKT selectivity for some of its substrates. Of note, total Akt levels are increased in *Trib3*<sup>-/-</sup> RasV12/E1A-transformed MEFs when compared with their corresponding WT counterparts. Although this effect is much less pronounced than that of TRIB3 genetic inactivation on Akt phosphorylation and does not take place in HepG2 or BT474 cells in which TRIB3 expression was silenced, these observations suggest that TRIB3 may also have a role in the regulation of AKT stability.

Analysis of gene expression profiles of cancer patients from published studies reveals that TRIB3 mRNA levels are downregulated in different tumor types (Supplementary

Tables SII and SIII). Likewise, high TRIB3 protein levels are associated with good prognosis in breast cancer patients.<sup>36</sup> In addition, TRIB3 is focally deleted in tumors of epithelial origin (tumorscape data set; Supplementary Table SI), thus supporting that loss or downregulation of TRIB3 is an event associated with human cancer. Nevertheless, other studies have found an upregulation of TRIB3 mRNA levels in human cancers.<sup>33,37</sup> In addition, previous observations by other laboratories indicate that TRIB3 can enhance proliferation and invasiveness of cancer cells *in vitro*,<sup>31–33</sup> and a recent study has shown that knockdown of TRIB3 produces a moderate increase in the growth of orthotopic xenografts generated with MDA-231 breast cancer cells.<sup>38</sup> A plausible explanation for the apparently contradictory results obtained here and in those studies could be the existence of differences in the genetic alterations, the degree of differentiation or other relevant phenotypic characteristics in the cell lines used in the various studies. In support of this idea, and as shown in the present study, silencing of TRIB3 produces heterogeneous effects on the tumorigenic properties of different cancer cell lines as it enhances the growth rate of tumors generated with U87MG cells (data not shown), accelerates the onset of HepG2 cell-derived tumors and hastens both processes in tumors generated with BT474 cells. Thus, although the findings presented here cogently support that genetic inhibition of TRIB3 enhances tumorigenesis in several genetic contexts and, specifically, in the presence of activating mutations of *Ras* or the deletion of one of the copies of *Pten*, further research should clarify whether inactivation or enhanced expression of TRIB3 may produce a different outcome in a distinct genetic or cellular context. It is worth noting that it has been reported that TRIB3-null animals show upregulation of TRIB1 and TRIB2 in at least some tissues.<sup>39</sup> As TRIB2 is associated with induction of acute myelogenous leukemia<sup>40,41</sup> and TRIB1 with other malignancies,<sup>42,43</sup> changes in the levels of the other Tribbles isoforms may also contribute to the phenotype observed in *Trib3*<sup>-/-</sup> animals.

In summary, results presented here show that genetic inhibition of TRIB3 increases tumorigenesis in several animal models of cancer and that this effect is due – at least primarily – to the enhanced phosphorylation of AKT by the mTORC2 complex and the subsequent hyperphosphorylation and inactivation of FOXO3. These results may help to set the basis for the development of novel targeted therapies for the management of cancer.

## Materials and Methods

A list of the reagents used, primer sequences, antibodies and other materials, together with additional details of all techniques used in this study can be found in Supplementary Methods.

**Generation of *Trib3*<sup>-/-</sup> mice.** *Trib3*<sup>+/-</sup> mice (B6;129S5-Trib3Gt(OS-T324148)Lex/leg obtained from European Mouse Mutant Archive, EMMA, München, Germany; ID: EM-02346, LEXKO-1947) were back crossed with C57/BL6 for 10 generations and were then inter-crossed to generate homozygous knockout embryos. This line was developed using the OST324148 OmniBank ES cell line from a sequence tagged gene trap library.<sup>44</sup> Briefly, the gene trap vector included a two expression cassettes (Supplementary Figure S1a). The first cassette encoded for a splice acceptor site (SA), followed by a fusion protein of beta-galactosidase and neomycin, thereby disrupting transcription of the targeted mRNA. The second cassette encoded for a 'diagnostic marker', followed by a



splice donor site and was used to determine the site of insertion for the targeting vector by 3' RACE. Using this gene trap vector, the TRIB3 allele was targeted in the first intron (Supplementary Figure S1b). The sequence shown in Supplementary Figure S1c includes 250 nucleotides on either side of the insertion site, denoted by an asterisk (data kindly provided by Lexicon Pharmaceuticals, The Woodlands, TX, USA). Exons 2–4 encode for the TRIB3 Open Reading Frame (highlighted in red). Insertion of the gene trap vector prevented the expression of the TRIB3 protein, as demonstrated by an anti-TRIB3 western blotting (Supplementary Figure S1e), and did not produce a truncated version of Trib3 as we had previously proposed in a previous work.<sup>19</sup>

**Generation of *Pten*<sup>+/-</sup> *Trib3*<sup>-/-</sup> animals.** *Pten*<sup>+/-</sup> mice (C57/Bl6/J) were kindly provided by Dr Manuel Serrano (Spanish Cancer Research Center, Madrid, Spain). Characterization of these animals has been previously described.<sup>45</sup> *Pten*<sup>+/-</sup> mice were crossed with *Trib3*<sup>+/-</sup> mice and the progeny inter-crossed. Animals of the different genotypes were killed at 8 months of age, and histopathological analyses of different organs were performed. All procedures involving animals were performed with the approval of the Complutense University Animal Experimentation Committee in compliance with Spanish and European official regulations.

**Genotyping.** Tail genomic DNA were isolated using standard procedures. Primers used for PCR genotyping were: 5'-CCGCGACGAATGAAAGGTTTA-3'; 5'-AGACTCCGAGAGCTGCTCAGTTAGG-3' for wt (*Trib3*) allele (483 bp) and 5'-CCGCGACGAATGAAAGGTTTA-3', 5'-AAATGGCGTACTTAAGCTAGCTTGC-3' for KO (*Trib3*) allele (381 bp). PCR conditions were 40 cycles (30 s at 95 °C, 30 s at 65 °C and 30 s at 72 °C; supplementary Figure S1). Genotyping of *Pten* animals has been previously described.<sup>45</sup>

#### Skin chemical carcinogenesis model: animals and treatments.

As pure C57BL6/J mice are refractory to DMBA/TPA-induced carcinogenesis, *Trib3*<sup>-/-</sup> animals were bred to the DMBA/TPA-sensitive 129/Ola strain. Heterozygous animals from this progeny were inter-crossed to generate the *Trib3*<sup>+/-</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> littermates used in this study (129/SvEvBrd\_C57BL6/J mixed genetic background). For the two-stage carcinogenesis experiments, tumors were induced on the shaved dorsal skin of WT ( $n=15$ ) and TRB3 KO ( $n=20$ ) mice by topical application of a single dose of DMBA (32 mg in 200 ml of acetone), followed by twice-weekly applications of TPA (12.5 mg in 200 ml of acetone) for 20 weeks. The number of tumors (42 mm in diameter) was recorded weekly. TPA treatment was ended after 20 weeks, and animals were left untreated until week 32 after DMBA initiation to allow the development of carcinomas. Tumors were collected at different time points and histologically typed as previously described. At the end of the experiments, mice were killed and tumors or skin were collected. Samples were divided into portions that were<sup>1</sup> frozen in Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, The Netherlands) for immunofluorescence staining,<sup>2</sup> snap-frozen for protein and RNA extraction or<sup>3</sup> fixed in 10% buffered formalin, pH 7.2, for 24–72 h. All the tissues were processed by standard histological techniques for the production of 4- $\mu$ m thick sections stained with hematoxylin and eosin. Skin slides were studied and classified according to the International Classification of Rodent Tumours (1993). In four cases of animal death, necropsies were performed on all mice within 24 h of death, and samples of cutaneous masses, lung, liver, kidney, spleen, stomach, small and large intestine, adrenal and thyroid gland, reproductive tract and brain were collected and processed the same way.

**Cell culture.** U87MG (human glioma cell line), BT474 (human breast cancer cells) and HEPG2 cells (human hepatocellular carcinoma cell line) were obtained from the American Culture Collection (Rockville, MD, USA). CarC, CarCR, MSC11B9, MSC11A5, PDV and CarB murine skin carcinoma cell lines (see text and Supplementary Methods for further details) were obtained from Miguel Quintanilla. (CarC-R is a less aggressive epithelial cell line isolated from the fusocellular carcinoma cell line CarC;<sup>21</sup> MSC11B9 (B9) and MSC11A5 (A5) cells were derived, respectively, from the squamous component and the more undifferentiated region of the same carcinoma;<sup>20</sup> PDV cells were derived from a squamous cell carcinoma; and CarB cells from a spindle cell carcinoma).

*Trib3*<sup>+/-</sup> and *Trib3*<sup>-/-</sup> MEFs were extracted as previously described<sup>46</sup> and transformed using different retroviral vectors to generate RasV12-MEFs, RasV12/E1A-MEFs, SV40 T-large antigen-MEF and FOXO3/RasV12/E1A-MEFs. Transformed/stably transfected MEFs correspond to a polyclonal mix of at least 20

different selected clones). Cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and penicillin/streptomycin (5  $\mu$ g/ml). When required, cells were seeded at a density of 5000–10 000 cells/cm<sup>2</sup> and transferred to medium containing 0.5% FBS (except RasV12/E1A-transformed MEFs, which were transferred to media containing 2% FBS) 18 h before performing the different treatments.

**Genetic knockdown by small interfering RNA.** SMARTpool siRNA duplexes (a combination of four siRNAs into a single pool, which guarantees an efficiency of silencing of at least 75%; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) were used to transiently silence the expression of the indicated genes. Controls were transfected with a non-targeted control siRNA. Transfection efficiency was >70% as monitored with a control fluorescent (red) siRNA (siGLO RISC-Free siRNA, Dharmacon).

**Infection with TRB3 shRNA- human lentiviral particles.** A pool of concentrated transduction-ready viral particles containing three shRNAs target-specific (or three shRNA non-targeted control) constructs (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was used to infect human cancer cell lines. Clones of stably silenced (or control shRNA transduced) cells were selected. At least 20 different selected clones were pooled for each of the cell lines generated.

**Luciferase assays.** Cells were transfected with a luciferase reporter constructs containing different promoters along with a Renilla luciferase expression plasmid (pRL-TK) for normalization.

**In vivo generation of tumor xenografts.** Tumors were induced by subcutaneous injection (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain) of  $4 \times 10^6$  cells in PBS supplemented with 0.1% glucose in nude mice.

**Statistics.** Except when otherwise stated, statistical analysis was performed by ANOVA with a *post-hoc* analysis by the Student–Neuman–Keuls test (paired or unpaired). Differences were considered significant when the *P*-value was <0.05. Wilcoxon's signed-rank test was used in the analysis of cumulative number of papillomas found in animals subjected to the DMBA/TPA treatment.

#### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** This work was supported by grants from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PS09/01401; PI12/02248, FR2009-0052 and IT2009-0053 to GV), Comunidad de Madrid (S2011/BMD-2308 to MG), Fundación Mutua Madrileña (AP101042012 to GV) and Breast Cancer Campaign (2012NovSP033 to EKT and GV). Purchase of the TRIB3-deficient mice (LEXKO-1947) line was funded by the Wellcome Trust. MS was recipient of a fellowship from Spanish Ministry of Education and Science (MEC), a research formation contract from Comunidad de Madrid and a Postdoctoral Research Contract from Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer (AECC); ML was sequentially the recipient of a 'Juan de la Cierva' contract, a postdoctoral contract from Spanish Ministry of Education and Science (MEC) and a postdoctoral contract from Comunidad de Madrid. AC is supported by an ERC StG (336343), the Ramón y Cajal award (Spanish Ministry of Education), the Basque Department of Industry, Tourism and Trade (Etorrek), Marie Curie Reintegration grant (277043), Movember Global Action Plan, ISCIII (PI10/01484) and the Basque Government of health (2012111086) and education (PI2012-03). EPG was the recipient of a Postdoctoral Research Contract from AECC. We thank Dr Dario Alessi (Dundee University, UK) for his expert scientific and technical support and for kindly providing antibodies for the immunoprecipitation experiments. We also thank other members of our laboratories for their continuous support.

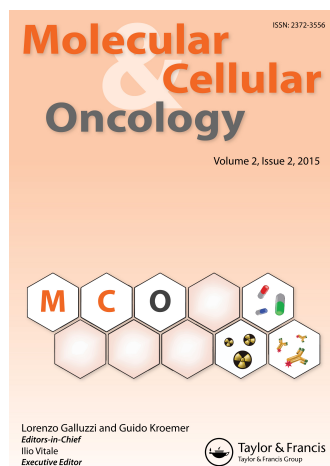
#### Author contributions

MS and ML participated in the design of the study, the performance of *in vitro* and *in vivo* experiments, the analysis and interpretation of the data and manuscript writings. EGT performed *in vitro* and *in vivo* experiments, EPG participated in the design of skin carcinogenesis experiments, analysis and interpretation of the data and critical reading of the manuscript, DD participated in the design and

performance of *in vitro* experiments, analysis and interpretation of the data and critical reading of the manuscript, PZ participated in the performance of *in vitro* experiments and analysis of the data, JMF and AR performed anatomic-pathological analyses in mice. ZH, DMA and AMA performed bio-informatics analyses, SHT and ILV participated in the performance of *in vitro* experiments; MQ provided materials and participated in the design of experiments with skin cancer cells; CS, JLI, ND, MG, SEF, AC and EKT participated in the design of the study and critical reading of the manuscript; and GV conceived and coordinated the study and wrote the manuscript.

- Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR. Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* 2006; **16**: 443–452.
- Zeqiraj E, van Aalten DM. Pseudokinases-remnants of evolution or key allosteric regulators? *Curr Opin Struct Biol* 2010; **20**: 772–781.
- Zhang H, Photiou A, Grothey A, Stebbing J, Giamas G. The role of pseudokinases in cancer. *Cell Signal* 2012; **24**: 1173–1184.
- Grosshans J, Wieschaus E. A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* 2000; **101**: 523–531.
- Mata J, Curado S, Ephrussi A, Rorth P. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* 2000; **101**: 511–522.
- Rorth P, Szabo K, Texido G. The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Mol Cell* 2000; **6**: 23–30.
- Seher TC, Tribbles Leptin M. a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* 2000; **10**: 623–629.
- Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E. Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal* 2007; **19**: 238–250.
- Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3 a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 2005; **24**: 1243–1255.
- Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC *et al*. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 2004; **279**: 42703–42708.
- Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003; **300**: 1574–1577.
- Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R *et al*. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- $\alpha$ -dependent induction of TRB-3. *Nat Med* 2004; **10**: 530–534.
- Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzman M, Velasco G *et al*. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res* 2006; **66**: 6748–6755.
- Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blazquez C, Garcia S, Giroux V *et al*. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* 2006; **9**: 301–312.
- Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Egia A *et al*. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 2009; **119**: 1359–1372.
- Nicoletti-Carvalho JE, Nogueira TC, Gorjao R, Bromati CR, Yamanaka TS, Boschero AC *et al*. UPR-mediated TRB3 expression correlates with reduced AKT phosphorylation and inability of interleukin 6 to overcome palmitate-induced apoptosis in RINm5F cells. *J Endocrinol* 2010; **206**: 183–193.
- Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N, Guzman M, Velasco G, Diaz-Laviada I. Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 1099–1111.
- Zhang J, Wen HJ, Guo ZM, Zeng MS, Li MZ, Jiang YE *et al*. TRB3 overexpression due to endoplasmic reticulum stress inhibits AKT kinase activation of tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; **47**: 934–939.
- Salazar M, Lorente M, Garcia-Taboada E, Hernandez-Tiedra S, Davila D, Francis SE *et al*. The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1831**: 1573–1578.
- Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, Balmain A. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 1991; **6**: 2363–2369.
- Pons M, Cigudosa JC, Rodriguez-Perales S, Bella JL, Gonzalez C, Gamallo C *et al*. Chromosomal instability and phenotypic plasticity during the squamous-spindle carcinoma transition: association of a specific T(14;15) with malignant progression. *Oncogene* 2005; **24**: 7608–7618.
- Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc* 2009; **4**: 1350–1362.
- Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **11**: 9–22.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **12**: 21–35.
- Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008; **133**: 403–414.
- Nardella C, Carracedo A, Salmena L, Pandolfi PP. Faithful modeling of PTEN loss driven diseases in the mouse. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011; **347**: 135–168.
- Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 289–301.
- Dansen TB, Burgering BM. Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins. *Trends Cell Biol* 2008; **18**: 421–429.
- Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7421–7426.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS *et al*. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; **96**: 857–868.
- Bowers AJ, Scully S, Boylan JF. SKIP3 a novel *Drosophila* tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia. *Oncogene* 2003; **22**: 2823–2835.
- Hua F, Mu R, Liu J, Xue J, Wang Z, Lin H *et al*. TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion. *J Cell Sci* 2011; **124**(Pt 19): 3235–3246.
- Xu J, Lv S, Qin Y, Shu F, Xu Y, Chen J *et al*. TRB3 interacts with CtIP and is overexpressed in certain cancers. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1770**: 273–278.
- Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J *et al*. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1. *Dev Cell* 2006; **11**: 859–871.
- Velasco G, Sanchez C, Guzman M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 436–444.
- Wennemers M, Bussink J, Grebenchtchikov N, Sweep FC, Span PN. TRB3 protein denotes a good prognosis in breast cancer patients and is associated with hypoxia sensitivity. *Radiother Oncol* 2011; **101**: 198–202.
- Wennemers M, Bussink J, Scheijen B, Nagtegaal ID, van Laarhoven HW, Raleigh JA *et al*. Tribbles homolog 3 denotes a poor prognosis in breast cancer and is involved in hypoxia response. *Breast Cancer Res* 2011; **13**: R82.
- Izrailit J, Berman HK, Datti A, Wrana JL, Reedijk M. High throughput kinase inhibitor screens reveal TRB3 and MAPK-ERK/TGF $\beta$  pathways as fundamental Notch regulators in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 1714–1719.
- Zareen N, Biswas SC, Greene LA. A feed-forward loop involving Trib3, Akt and FoxO mediates death of NGF-deprived neurons. *Cell Death Differ* 2013; **20**: 1719–1730.
- Rishi L, Hannon M, Salome M, Hasemann M, Frank AK, Campos J *et al*. Regulation of Trib2 by an E2F1-C/EBP $\alpha$  feedback loop in AML cell proliferation. *Blood* 2014; **123**: 2389–2400.
- Zanella F, Renner O, Garcia B, Callejas S, Dopazo A, Peregrina S *et al*. Human TRB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells. *Oncogene* 2010; **29**: 2973–2982.
- Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T *et al*. Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood* 2007; **109**: 3998–4005.
- Mashima T, Soma-Nagae T, Migita T, Kinoshita R, Iwamoto A, Yuasa T *et al*. TRB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. *Cancer Res* 2014; e-pub ahead of print 24 June 2014.
- Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R, Richter LJ, Piggott J, BeltrandelRio H *et al*. Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 14109–14114.
- Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 1998; **19**: 348–355.
- Salazar M, Hernandez-Tiedra S, Torres S, Lorente M, Guzman M, Velasco G. Detecting autophagy in response to ER stress signals in cancer. *Methods Enzymol* 2011; **489**: 297–317.

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)



[Click for updates](#)

## Molecular & Cellular Oncology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/kmco20>

### TRIB3 suppresses tumorigenesis by controlling mTORC2/AKT/FOXO signaling

María Salazar<sup>ab</sup>, Mar Lorente<sup>ab</sup>, Elena García-Taboada<sup>a</sup>, Eduardo Pérez Gómez<sup>ac</sup>, David Dávila<sup>ab</sup>, Patricia Zúñiga-García<sup>d</sup>, Juana M Flores<sup>e</sup>, Antonio Rodríguez<sup>e</sup>, Zoltan Hegedus<sup>f</sup>, David Mosén-Ansorena<sup>d</sup>, Ana M Aransay<sup>g</sup>, Sonia Hernández-Tiedra<sup>ab</sup>, Israel López-Valero<sup>ab</sup>, Miguel Quintanilla<sup>h</sup>, Cristina Sánchez<sup>ac</sup>, Juan L Iovanna<sup>i</sup>, Nelson Dusetti<sup>i</sup>, Manuel Guzmán<sup>aj</sup>, Sheila E Francis<sup>k</sup>, Arkaitz Carracedo<sup>dIm</sup>, Endre Kiss-Toth<sup>k</sup> & Guillermo Velasco<sup>ab</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology I; School of Biology; Complutense University; Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Sanitarias San Carlos (IdISSC); Madrid, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I+12); Madrid, Spain

<sup>d</sup> CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park; Derio, Spain

<sup>e</sup> Department of Animal Surgery and Medicine; School of Veterinary; Complutense University; Madrid, Spain

<sup>f</sup> Institute of Biophysics; Hungarian Academy of Sciences; Szeged, Hungary

<sup>g</sup> CIC bioGUNE-CIBERehd, Bizkaia Technology Park; Derio, Spain

<sup>h</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols; Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM); Madrid, Spain

<sup>i</sup> Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM); INSERM UMR 1068, CNRS UMR 7258, Aix Marseille Université and Institut Paoli Calmette; Marseille, France

<sup>j</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS); Madrid, Spain

<sup>k</sup> Department of Cardiovascular Science; University of Sheffield; Sheffield, UK

<sup>l</sup> Ikerbasque, Basque Foundation for Science; Bilbao, Spain

<sup>m</sup> Biochemistry and Molecular Biology Department; University of the Basque Country (UPV/EHU); Bilbao, Spain

Published online: 18 Apr 2015.

To cite this article: María Salazar, Mar Lorente, Elena García-Taboada, Eduardo Pérez Gómez, David Dávila, Patricia Zúñiga-García, Juana M Flores, Antonio Rodríguez, Zoltan Hegedus, David Mosén-Ansorena, Ana M Aransay, Sonia Hernández-Tiedra, Israel López-Valero, Miguel Quintanilla, Cristina Sánchez, Juan L Iovanna, Nelson Dusetti, Manuel Guzmán, Sheila E Francis, Arkaitz Carracedo, Endre Kiss-Toth & Guillermo Velasco (2015) TRIB3 suppresses tumorigenesis by controlling mTORC2/AKT/FOXO signaling, *Molecular & Cellular Oncology*, 2:3, e980134

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.4161/23723556.2014.980134>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Versions of published Taylor & Francis and Routledge Open articles and Taylor & Francis and Routledge Open Select articles posted to institutional or subject repositories or any other third-party website are without warranty

from Taylor & Francis of any kind, either expressed or implied, including, but not limited to, warranties of merchantability, fitness for a particular purpose, or non-infringement. Any opinions and views expressed in this article are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor & Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

It is essential that you check the license status of any given Open and Open Select article to confirm conditions of access and use.

# TRIB3 suppresses tumorigenesis by controlling mTORC2/AKT/FOXO signaling

María Salazar<sup>1,2,†,‡</sup>, Mar Lorente<sup>1,2,†</sup>, Elena García-Taboada<sup>1</sup>, Eduardo Pérez Gómez<sup>1,3</sup>, David Dávila<sup>1,2</sup>, Patricia Zúñiga-García<sup>4</sup>, Juana M Flores<sup>5</sup>, Antonio Rodríguez<sup>5</sup>, Zoltan Hegedus<sup>6</sup>, David Mosén-Ansorena<sup>4</sup>, Ana M Aransay<sup>7</sup>, Sonia Hernández-Tiedra<sup>1,2</sup>, Israel López-Valero<sup>1,2</sup>, Miguel Quintanilla<sup>8</sup>, Cristina Sánchez<sup>1,3</sup>, Juan L Iovanna<sup>9</sup>, Nelson Dusetti<sup>9</sup>, Manuel Guzmán<sup>1,10</sup>, Sheila E Francis<sup>11</sup>, Arkaitz Carracedo<sup>4,12,13</sup>, Endre Kiss-Toth<sup>11</sup>, and Guillermo Velasco<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology I; School of Biology; Complutense University; Madrid, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Sanitarias San Carlos (IdISSC); Madrid, Spain; <sup>3</sup>Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I+12); Madrid, Spain; <sup>4</sup>CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park; Derio, Spain; <sup>5</sup>Department of Animal Surgery and Medicine; School of Veterinary; Complutense University; Madrid, Spain; <sup>6</sup>Institute of Biophysics; Hungarian Academy of Sciences; Szeged, Hungary; <sup>7</sup>CIC bioGUNE-CIBERehd, Bizkaia Technology Park; Derio, Spain; <sup>8</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols; Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM); Madrid, Spain; <sup>9</sup>Centre de Recherche en Carcérologie de Marseille (CRCM); INSERM UMR 1068, CNRS UMR 7258, Aix Marseille Université and Institut Paoli Calmette; Marseille, France; <sup>10</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS); Madrid, Spain; <sup>11</sup>Department of Cardiovascular Science; University of Sheffield; Sheffield, UK; <sup>12</sup>Ikerbasque, Basque Foundation for Science; Bilbao, Spain; <sup>13</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department; University of the Basque Country (UPV/EHU); Bilbao, Spain

<sup>†</sup>These authors equally contributed to this work;

<sup>‡</sup>Current address, Cell Division and Cancer Group, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid E-28029, Spain

**Keywords:** Tribbles pseudokinases, animal models of cancer, skin carcinogenesis, PTEN, prostate cancer

In a recent article, we found that Tribbles pseudokinase 3 (TRIB3) plays a tumor suppressor role and that this effect relies on the dysregulation of the phosphorylation of v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT) by the mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2 complex), and the subsequent hyperphosphorylation and inactivation of the transcription factor Forkhead box O3 (FOXO3).

Pseudokinases—a subgroup of protein kinases that lack at least one of the conserved catalytic residues present in the kinase domain and therefore exhibit no (or very low levels of) kinase activity<sup>1</sup>—have been proposed to play critical roles as activators of their specific targets<sup>1</sup>. Likewise, their aberrant regulation has been implicated in the etiology and progression of a variety of diseases, including cancer.<sup>2</sup> Tribbles pseudokinase-3 (TRIB3; also named TRB3, NIPK, and SKIP3), which belongs to the tribbles family of pseudokinases, was first described in *Drosophila* as a negative regulator of cell division in early embryogenesis<sup>1</sup> and has been proposed to interact with different targets including mitogen activated protein kinases (MAPKs) and several transcription

factors<sup>3</sup>). TRIB3 has also been shown to interact with and inhibit v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT),<sup>4</sup> which has been suggested to suppress insulin signaling.

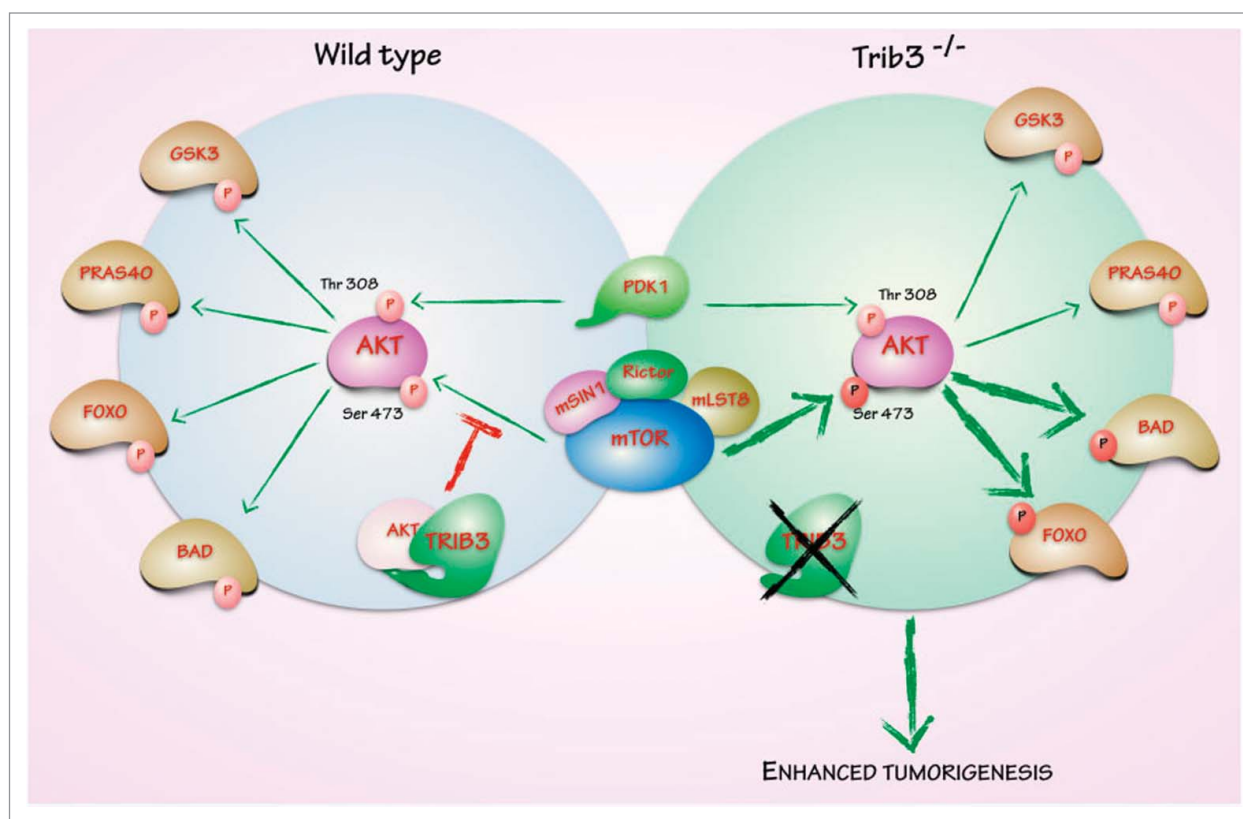
In our study,<sup>5</sup> we investigated the effect of genetic inactivation of *TRIB3* in several cellular and animal models of cancer. We found that genetic inhibition of *TRIB3* enhances tumorigenesis and that this effect relies to a large extent on the ability of this pseudokinase to regulate activity of the AKT pathway. For example, we found that loss of TRIB3 enhances the frequency of malignant conversion of papillomas generated in mice subjected to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) treatment, and that loss of TRIB3

enhances the incidence of premalignant and malignant lesions in phosphatase and tensin homolog heterozygous (*Pten*<sup>+/-</sup>) mice. Likewise, genetic inhibition of *TRIB3* enhances proliferation, clonogenicity, and the ability to generate tumor xenografts of oncogene-transformed mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and of several human cancer cell lines, with a parallel increase in the phosphorylation of AKT in samples derived from these tumors. Together, these findings indicate that genetic inhibition of *TRIB3* enhances tumorigenesis in several genetic contexts and specifically in the presence of activating mutations of rat sarcoma virus oncogene (*Hras*) or deletion of one of the copies of *Pten*. Nevertheless, other studies have found that *TRIB3* mRNA levels are

© María Salazar, Mar Lorente, Elena García-Taboada, Eduardo Pérez Gómez, David Dávila, Patricia Zúñiga-García, Juana M Flores, Antonio Rodríguez, Zoltan Hegedus, David Mosén-Ansorena, Ana M Aransay, Sonia Hernández-Tiedra, Israel López-Valero, Miguel Quintanilla, Cristina Sánchez, Juan L Iovanna, Nelson Dusetti, Manuel Guzmán, Sheila E Francis, Arkaitz Carracedo, Endre Kiss-Toth, and Guillermo Velasco

\*Correspondence to: Guillermo Velasco; Email: gvd@bbm1.ucm.es  
Submitted: 10/13/2014; Revised: 10/20/2014; Accepted: 10/21/2014  
<http://dx.doi.org/10.4161/23723556.2014.980134>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.



**Figure 1.** Putative mechanisms by which TRIB3 controls tumorigenesis. Tribble pseudokinase 3 (TRIB3) interacts with AKT, which regulates phosphorylation of the kinase by the mTORC2 complex (wild type). Genetic inhibition of *TRIB3* in combination with different oncogenic signals facilitates hyperphosphorylation of AKT on Ser 473 by the mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2 complex) and the subsequent hyperphosphorylation and inactivation of the transcription factor Forkhead box O3 (FOXO3) and the BH3-only protein BCL2-associated agonist of cell death (BAD), but not that of other AKT downstream targets. The hyperphosphorylation and inactivation of FOXO is, at least in part, responsible for the enhanced tumorigenic features of *TRIB3*-deficient cells.

increased in certain types of human cancer<sup>2,6</sup> and have proposed that *TRIB3* may play an oncogenic role.<sup>7</sup> Further research should clarify whether inactivation or enhanced expression of *TRIB3* produces different outcomes in distinct genetic or cellular contexts.

Our findings indicate that the tumor suppressive activity of *TRIB3* relies on its ability to limit the capacity of AKT to become overactivated in response to oncogenic signals. We found that genetic inactivation of *TRIB3* leads to enhanced phosphorylation of Forkhead box O3 (FOXO3) and BCL2-associated agonist of cell death (BAD), but not of other AKT substrates such as glycogen synthase kinase 3 (GSK3) or AKT1 substrate 1 (AKT1S1; also named proline rich AKT substrate or PRAS40), suggesting that *TRIB3* contributes to the regulation of AKT selectivity for some of its substrates. In line with this

idea, we have recently found that treatment with  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC, a compound derived from the plant *Cannabis sativa* that exerts antitumor effects in mouse models of cancer<sup>8,9</sup>) triggers AKT inhibition via enhanced interaction of *TRIB3* with AKT and a subsequent decrease in the interaction of AKT and *TRIB3* with the mTORC2 complex.<sup>10</sup> These observations indicate that interaction with *TRIB3* negatively regulates AKT by restricting access of the kinase to the mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2 complex) and that, through this mechanism, *TRIB3* contributes to the regulation of AKT selectivity for some of its substrates (Fig. 1).

Another conclusion of our work is that the mechanism underlying the tumor suppressive activity of *TRIB3* downstream of AKT relies at least in part on the regulation of FOXO3

activity. In support of this idea, we found that re-expression of a mutant form of FOXO3 in which the residues phosphorylated by AKT have been mutated to Ala (FOXO-A3) abolished the enhanced proliferation and clonogenicity of *TRIB3*-deficient cells and decreased the proliferation and growth rate of tumors generated with these cells. These observations support that FOXO3 inactivation plays a crucial role in the enhanced tumorigenic features of cells in which *Trib3* is genetically inactivated. Nevertheless, expression of the FOXO-A3 mutant did not modify the time to occurrence of tumors derived from *TRIB3*-deficient cells suggesting that, together with the regulation of FOXO activity, *TRIB3* may use additional mechanisms to control tumorigenesis.

In summary, our findings show that genetic inhibition of *TRIB3* increases

tumorigenesis in several animal models of cancer and that this effect is due, at least in part [AQ3], to enhanced

phosphorylation of AKT by the mTORC2 complex and subsequent

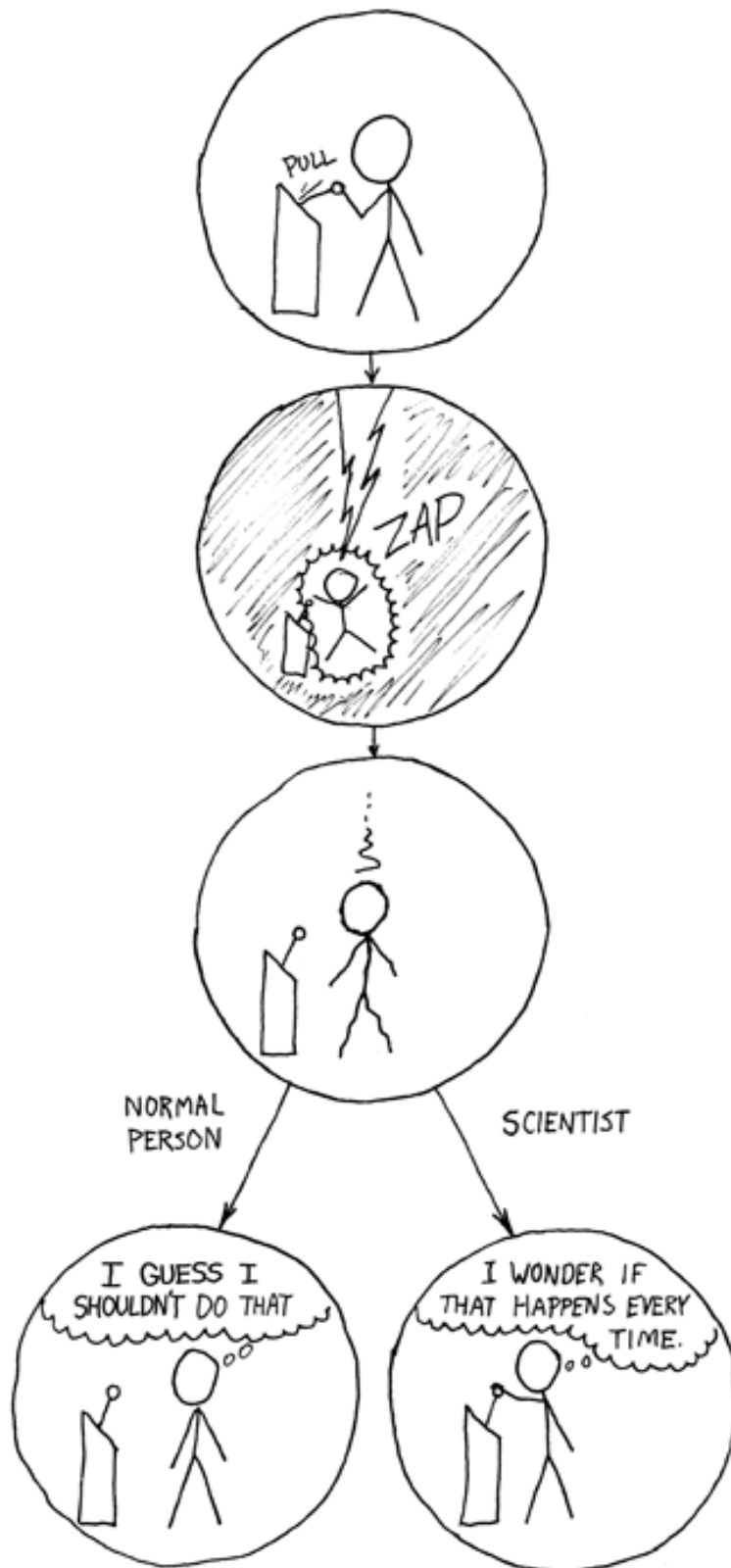
hyperphosphorylation and inactivation of FOXO3.

#### References

1. Zeqiraj E, van Aalten DM. Pseudokinases-remnants of evolution or key allosteric regulators? *Curr Opin Struct Biol* 2010; 20:772-81; PMID:21074407; <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2010.10.001>
2. Zhang H, Photiou A, Grothey A, Stebbing J, Giamas G. The role of pseudokinases in cancer. *Cell Signal* 2012; 24:1173-84; PMID:22330072; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.017>
3. Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, et al. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 2004; 279:42703-8; PMID:15299019; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M407732200>
4. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003; 300:1574-7; PMID:12791994; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1079817>
5. Salazar M, Lorente M, Garcia-Taboada E, Perez Gomez E, Davila D, Zuniga-Garcia P, María Flores J, Rodríguez A, Hegedus Z, Mosén-Ansorena D, et al. Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation. *Cell Death Differ* 2014; 22:131-44 [Epub ahead of print]; PMID:25168244
6. Xu J, Lv S, Qin Y, Shu F, Xu Y, Chen J, Xu BE, Sun X, Wu J. TRB3 interacts with CtIP and is overexpressed in certain cancers. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770:273-8; PMID:17112672; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.025>
7. Izrailit J, Berman HK, Datti A, Wrana JL, Reedijk M. High throughput kinase inhibitor screens reveal TRB3 and MAPK-ERK/TGFbeta pathways as fundamental Notch regulators in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:1714-9; PMID:23319603; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1214014110>
8. Velasco G, Sanchez C, Guzman M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:436-44; PMID:22555283; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3247>
9. Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S, et al. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 2009; 119:1359-72; PMID:19425170; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI37948>
10. Salazar M, Lorente M, Garcia-Taboada E, Hernandez-Tiedra S, Davila D, Francis SE, Guzmán M, Kiss-Toth E, Velasco G. The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831:1573-8; PMID:23567453











JORGE CHAM ©THE STANFORD DAILY

[phd.stanford.edu/comics](http://phd.stanford.edu/comics)

*Jorge Cham, Phd Comics*



*Y finalmente, tras describir, discurrir y especular ha llegado el momento de agradecer...*

*Si esta tesis pertenece a alguien, ese es Arkaitz. Gracias a su planificación, visión, constancia y a otras muchas virtudes, lo que era polvo de estrellas está a punto de convertirse en realidad. Tengo que agradecerle muchas cosas, la oportunidad que me ha dado, la paciencia que ha tenido, la tenacidad por guiarme y organizarme científicamente... Y sobre todo, las herramientas que me ha facilitado para seguir en este camino. Gracias Arkaitz por haberme permitido jugar en primera división, espero haber estado a la altura. He aprendido más de lo que hubiera podido imaginar, y esa impronta me ayudará siempre. Eskerrik asko. Mila esker Ainarari ere, atzean egoteagatik beti.*

*Esta tesis es resultado de un trabajo de equipo, en el que ha participado toda una constelación de soletes varios. Desde el caldo primigenio de "aquel verano", formado por cuatro estrellitas, hasta la galaxia luminosa que hoy en día es AClab. A cada un@ de vosotr@s le pertenece una parte de esta tesis, en tod@s he encontrado la ayuda que necesitaba en cada momento. Eskerrik asko por convertir las cuestas arriba en rectas planas. Gracias reinis!!!*

*Todo tiene un origen, y en el caso de esta tesis ese podría ser Guillermo Velasco, catalizador del Big Bang científico que hoy en día continua en expansión. Gracias a Guille y a Manolo Guzmán pude formar parte de la familia canabinoidea y realizar una estancia de la que me traje resultados, conocimientos y colegas. Gracias a tod@s. Gracias a la Dra. Flores por su colaboración en el análisis patológico.*

*Otra parte fundamental de la tesis es la resultante de la ilusión, y esa se la debo a Jim. Su curiosidad y altruismo científico son un ejemplo a seguir. You made me dream, you made me think that I could play with the stars. Thank you, especially because you make me feel that way always. Tack så mycket Emma e Itzi, por enseñarme buenas prácticas de labo, buenas formas y bondad. JDSlab for ever.*

*Esta tesis se debe también al haber tenido la oportunidad de disfrutar de un gran ambiente de trabajo. En la planta 0 hay una mezcla de risas y alegría, profesionalidad, karaokes improvisados, largas horas de experimentos, logros y decepciones en cultivos, estrés porque "no llegas" y comprensión por todo ello. Gracias a tod@s por haber hecho durante estos 6 años todo más fácil. Gracias a*

*RBlab por hacerme sentir como su adoptada. A MSRLab por vuestra alegría y buen hacer. A l@s JA por emanar luz. A GSP por aportar tan necesaria calma. A BioCel por su complicidad y amabilidad. A la -1 por sus aportaciones. Gracias caracolillas!!*

*Gracias l@s compañer@s, científic@s y no, diseminados por el 800, 801 y 502. Animalario, informática, mantenimiento, administración, limpieza... En el trato con todos he encontrado un gesto amable y una sonrisa cercana. Gracias y ánimo a l@s compañer@s que se preocupan por los demás.*

*Gracias especialmente a l@s que con su compromiso permiten el avance. Pacientes y asociaciones, personal de Biobanco Vasco, del Hospital de Basurto, del Hospital Norte de Marsella. Gracias a los Drs. S. Garcia y J.L. Iovanna. Gracias a los PLKs. Gracias a Arantxa e Iker, por estar tan pendientes de ellos como yo.*

*Esta tesis ha sido posible además gracias al portatil de Jorge, la portada de Diego, al cariño de Cris y Oskar, la complicidad de Iran, los cuidados de Cori, la comprensión de Itzi, la generosidad de Nori, los pitis con Lutxi, los yogures de Gi, las risas con Analia y Sari, las cañas con Nati, al equilibrio de Alfredo, al café de Fafa, las espuelas con Enkarni, las conversaciones con Killi, al calor de las Supernenas, a las barbacoas y sagardotegiak, a los saraos y bodorrios, a los momentos en Donosti, a las excursiones a Piris... También gracias al apoyo de tod@s los que en Atxuri y extranjero se han preocupado de preguntar "que tal con lo tuyo?". Gracias por confiar en mí y sentirnos un poco orgullos@s. Eskerrik asko a Sa y a Oski, a l@s de la uni y el master. Y a los que no están a diario pero están ahí siempre.*

*Pero sobre todo, se ha materializado gracias a que he tenido la gran suerte de poder contemplar unos espejos brillantes, de los cuales ojala pueda tener yo algún destello. Gracias abus. De su mano he conocido la tenacidad, la honestidad, la humildad, la entereza, el respeto y el valor del trabajo. El ejemplo me ayuda día a día. Su reflejo es evidente en mis padres, que lo irradian con cariño, comprensión y mimos. Gracias Ama y Aita. Gracias Ra y Be por estar siempre ahí, sin condiciones. Gracias Te y Ri por acogerme durante la estancia, cuidarme y consentirme. Gracias al resto de los miembros de la diáspora familiar, porque sé que siempre puedo contar con vosotr@s.*

*Entre todos hemos dado forma al polvo de estrellas  
Eskerrik asko guztioi bihotz-bihotzez*

*Izarren hautsa egun batean bilakatu zen bizigai,  
hauts hartatikan uste gabean noizpait ginaden gu ernai.  
Eta horrela bizitzen gera sortuz ta sortuz gure aukera,  
atsedenik hartu gabe: lana eginaz goaz aurrera,  
kate horretan denok batera gogorki loturik gaude.*

*Gizonak ba du inguru latz bat menperatzeko premia,  
burruka hortan bizi da eta hori du bere egia.  
Ekin ta ekin bilatzen ditu, saiatze hortan ezin gelditu,  
jakintza eta argia; bide ilunak nekez aurkitu,  
lege berriak noizpait erditu, hortan jokatu bizia.*

*Gizonen lana jakintza dugu: ezagutuz aldatzea,  
naturarekin bat izan eta harremanetan sartzea.  
Eta indarrak ongi errotuz, gure sustraiak lurrari lotuz,  
bertatikan irautea: ezaren gudaz baietza sortuz,  
ukazioa legetzat hartuz befi aurrera joatea.*

*Ez dadukanak ongi ohi daki eukitzea zein den ona,  
bere premiak bete nahirikan beti bizi da gizona.  
Gu ere zerbait bagera eta, gauden tokitik hemendik bertan  
saia gaitezen ikusten: amets eroak bazterturikan,  
sasi zikinak behingoz erreta, bide on bat aukeratzen.*

*Gu sortu ginen enbor beretik sortuko dira besteak,  
burruka hortan iraungo duten zuhaitz-ardaxka gazteak.  
Beren aukeren jabe eraikiz ta erortzean berriro jaikiz  
ibiltzen joanen direnak: gertakizunen indar ta argiz  
gure ametsa arrazoi garbiz egiztatuko dutenak.*

*Eta ametsa bilakaturik egiaren antziduri,  
herri zahar batek bide berritik ekingo dio urduri;  
guztian lana guztien esku jasoko dute sendo ta prestu,  
beren bizitzen edergai; diru zakarrak bihotzik ez du,  
lotuko dute gogor ta estu, haz ez dadin gizonen gain.*

*Xabier Lete*