

Estudio de nuevas proteínas que se unen a Espinofilina y su papel en tumorigénesis

Trabajo Fin de Grado

Julia Rodrigo Muñoz

Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia



Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría

Estudio de nuevas proteínas que se unen a Espinofilina y su papel en tumorigénesis

Julia Rodrigo Muñoz

Sevilla, junio 2022

Tutor: Lourdes González-Miret Martín

Departamento: Nutrición y Bromatología

Trabajo experimental

Realizado en el grupo de Biología Molecular del Cáncer dirigido por el Dr. Amancio Carnero.

Resumen

El cáncer es una patología heterogénea y asociada a la edad, cuyo origen tiene lugar tras una sucesión de cambios genéticos y/o epigenéticos de genes claves en la fisiología celular, los cuales acaban desatando la transformación de las células normales a células tumorales en un proceso de diversas etapas llamado tumorigénesis.

ESPINOFILINA (SPN) es una proteína multifuncional implicada, junto con la fosfatasa 1 (PP1), en la desfosforilación de las proteínas reguladoras del ciclo celular. Posee un papel supresor de tumores, de tal modo que su ausencia o la aparición de alguna mutación que afecte a la formación del holoenzima SPN-PP1 puede promover un aumento de las propiedades tumorigénicas de las células. Además, sirve de anclaje para otras proteínas como la proteína plasmática asociada al embarazo (PAPPA), la cual participa en la ruta de señalización del IGF-1 y tiene un papel controvertido en el desarrollo de tumores.

Este trabajo tiene como objetivo esclarecer cuál es la relación existente entre SPN y PAPPA identificada en estudios previos y cómo influye en la tumorigénesis. Para ello, por una parte, se ha analizado la capacidad de proliferación, el número de clones y la formación de tumoresferas en una línea celular tumoral de mama con silenciamiento de PAPPA y sobreexpresión de SPN. Por otra parte, se ha estudiado el efecto que tiene aumentar la expresión de PAPPA, esta vez, en presencia o no de SPN en fibroblastos embrionarios de ratón.

Los resultados sugieren que PAPPA podría tener funciones independientes a su interacción con SPN, mientras que el efecto de SPN sí parece ser dependiente de la presencia de PAPPA.

Palabras clave: ESPINOFILINA, SPN, PAPPA, tumorigénesis, cáncer de mama, células madre tumorales

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
c-Myc tag	Etiqueta con una parte de la secuencia de la proteína c-Myc
CRISPR-Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated protein 9</i>
CSCs	Células madres tumorales
DDK tag	Etiqueta presente en SPN exógena
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EV	Vector vacío
FBS	Suero fetal bovino
G418	Geneticina o neomicina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina I
LB	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón
PAPPA	Proteína plasmática asociada al embarazo
PBS	Tampón fosfato salino
PEI	Polietilenimina
PP1	Proteína fosfatasa 1
pRB	Proteína del retinoblastoma
qPCR	PCR cuantitativa
RT-qPCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
sgARN	ARN de guía única quimérico
SPN	ESPINOFILINA
WB	<i>Western Blot</i>

ÍNDICE

Resumen	3
Abreviaturas	4
Introducción	6
1. ¿Qué es el cáncer? Propiedades de las células tumorales.	6
2. ESPINOFILINA (SPN) y su papel en tumorigénesis.....	8
3. PAPP.	10
4. Antecedentes: estudio de la relación entre SPN y PAPP.	12
Objetivos	13
Metodología	14
1. Cultivos celulares	14
2. Obtención y selección del CRISPR de PAPP.....	14
2.1 Obtención de los clones CRISPRs de PAPP.....	14
2.2 Extracción de ARN	16
2.3 Retrotranscripción de ARN	17
2.4 PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	17
2.5 Comprobación mediante Western Blot.	18
2.6 Secuenciación de los clones de CRISPRs	20
3. Transfección de las células con los plásmidos de interés	20
3.1 Amplificación de plásmidos	20
3.2 Transfección de células	21
4. Transfección de células Phoenix-E e infección retroviral de MEFs.....	22
4.1 Transfección de células Phoenix-E	22
4.2 Infección retroviral de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).....	22
5. Ensayos de tumorigenicidad	23
5.1 Curvas de crecimiento	23
5.2 Clonabilidad	23
5.3 Formación de tumoresferas.....	23
6. Análisis de datos	24
Resultados y discusión	25
1. Efecto del CRISPR de PAPP y la sobreexpresión de SPN en las propiedades tumorigénicas de la línea MDA-MB-231.	25
2. Efecto de la sobreexpresión de PAPP en MEFs SPN +/+, SPN -/- y no inmortalizados.	34
Conclusiones	37
Bibliografía	38

Introducción

1. ¿Qué es el cáncer? Propiedades de las células tumorales.

El cáncer es una enfermedad heterogénea caracterizada por un crecimiento celular descontrolado (Hanahan, 2022). Se trata de una de las primeras causas de morbi-mortalidad a nivel mundial y en España, es la segunda causa de muerte más frecuente tras las enfermedades cardiovasculares, según el Instituto Nacional de Estadística (INE).

Existen más de 100 tipos de cáncer y se pueden encontrar distintos subtipos dentro de órganos específicos (Hanahan y Weinberg, 2000). La mayoría de los tumores se generan a partir de células epiteliales (carcinomas), aunque también encontramos del tejido conectivo y muscular (sarcomas), de la sangre (leucemias, linfomas y mielomas) y del sistema nervioso (neuroblastomas y gliomas) (Instituto Nacional del Cáncer (NIH)).

Todos los tumores se desencadenan a raíz de un proceso de múltiples etapas en el que las células humanas normales adquieren un conjunto de capacidades funcionales decisivas para generar malignidad (Hanahan, 2022). Dicho proceso implica cambios dinámicos en el genoma, es decir, que tengan lugar una serie de alteraciones en distintos genes que regulan distintos aspectos de la fisiología celular haciendo que las células crezcan de manera descontrolada (Hanahan y Weinberg, 2000). Los cambios mutacionales que pueden sufrir las células son el resultado de la interacción entre factores genéticos y tres tipos de agentes externos: carcinógenos físicos como la radiación UV, químicos como el amianto o carcinógenos biológicos como virus o bacterias (Lewandowska et al., 2019). Dichas alteraciones se van acumulando y trastocando el funcionamiento de los protooncogenes, genes reguladores que codifican proteínas que intervienen en diferentes mecanismos relacionados con el crecimiento, diferenciación y muerte celular. Como consecuencia, se desencadena la activación de oncogenes o la pérdida de función de genes supresores de tumores (Hanahan y Weinberg, 2000). La aparición sucesiva de cambios genéticos puede ofrecer una ventaja proliferativa a modo de selección natural, lo cual conduce a la tumorigénesis o conversión progresiva de células humanas normales a células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2000).

De este modo, las células tumorales empiezan a multiplicarse sin control, de forma autónoma, formando el tumor primario y llegando incluso a diseminarse por otros tejidos

u órganos, los cuales invaden, ocasionando tumores secundarios en un proceso llamado metástasis (Park et al., 2020).

Las características adquiridas por las células tumorales son las siguientes:

- Capacidad para mantener la señalización proliferativa, sin sufrir inhibición por contacto con otras células.
- Evasión de supresores del crecimiento.
- Resistencia a apoptosis.
- Inmortalidad replicativa.
- Inducción de generación de vasos sanguíneos a su alrededor (angiogénesis).
- Activación de la transición epitelio-mesénquima, puesto que producen menos moléculas de adhesión en su superficie y metaloproteasas que rompen la matriz extracelular de tejidos adyacentes para colonizarlos.
- Reprogramación del metabolismo celular: el crecimiento acelerado de las células acarrea hipoxia en las partes internas de la masa tumoral.
- Evasión de la destrucción inmunitaria (Hanahan, 2022).

Los tumores son entidades complejas constituidas por células tumorales y por el microambiente tumoral en el se encuentran, el cual incluye fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), nuevos vasos sanguíneos, células inmunes infiltradas y otros componentes (Huang et al., 2020). Dentro del grupo de células tumorales tan heterogéneo en cuanto al fenotipo metabólico, se encuentra un subconjunto de células que posee capacidad de autorrenovación y diferenciación, con características similares a las células madre normales, que se denominan células madre tumorales (del inglés, *cancer stem cells*, CSC) (Park et al., 2020). Se trata de una subpoblación de células tumorales capaces de iniciar el tumor, resistir a tratamientos y causar recaídas. Proviene de células madre adultas o células diferenciadas que sufren una conversión a células pluripotentes, caracterizadas por la expresión de los factores de transcripción de Yamanaka (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*), los cuales activan genes de autorrenovación y suprimen aquellos que participan en la diferenciación celular. Además, estas células poseen gran plasticidad adaptándose al medio, pueden formar esferas *in vitro* y crecer formando colonias (Huang et al., 2020; Walcher et al., 2020; Hanahan, 2022).

Por su parte, el microambiente tumoral está compuesto por estroma y células no tumorales, con las que las células tumorales están en continua comunicación. Las células estromales juegan un papel fundamental en el desarrollo del cáncer, aportando factores de crecimiento a las células madre tumorales. Por tanto, la relevante participación del microambiente tumoral en la tumorigénesis, determina la evolución del tumor y la adaptación de las células tumorales según sus circunstancias ambientales (Muñoz-Galván et al., 2019). De este modo, la aparición de estrés en el microambiente puede inducir que las células de diferente origen, tanto tumorales como estromales, entren en senescencia (detención irreversible de la proliferación), pudiendo estimular el desarrollo del tumor y contribuir funcionalmente a la progresión de su agresividad (Hanahan, 2022).

2. ESPINOFILINA (SPN) y su papel en tumorigénesis.

ESPINOFILINA (SPN) es una proteína multifuncional que regula procesos celulares tanto a nivel de la membrana como del citoesqueleto y que se expresa en diversos tejidos, tales como: cerebro, pulmones, mamas o colon. Entre otras, desempeña importantes acciones reguladoras de la neurotransmisión y plasticidad sináptica en el sistema nervioso, donde se detectó por primera vez, en concreto en las espinas dentríticas de la corteza prefrontal, por las que recibe su nombre (Sarrouilhe et al., 2006; Carnero, 2012).

Esta proteína está implicada en el proceso de desfosforilación de las proteínas reguladoras del ciclo celular, o proteínas RB, mediada por la proteína fosfatasa 1 (PP1), exclusivamente durante la transición entre las fases iniciales G0/G1 y G1/S. SPN presenta en su estructura dominios de unión a PP1 y actúa como proteína reguladora de su subunidad catalítica. La interacción SPN-PP1 constituye un holoenzima que regula la desfosforilación de las proteínas RB, un mecanismo fundamental para restaurar el ciclo celular y que suele estar alterado durante tumorigénesis (Verdugo-Sivianes et al., 2021). Una de las proteínas que regulan el ciclo celular y que es desfosforilada por PP1-SPN es la proteína de retinoblastoma (pRB), cuyo nombre se debe al tumor donde se encontró. Su función en su forma no fosforilada consiste en reprimir el paso de G1 a S, secuestrando factores de transcripción, que favorecen la proliferación, y frenando, con ello, el ciclo celular (Verdugo-Sivianes et al., 2021). Cuando las células están creciendo predomina la forma hiperfosforilada de pRB, mientras que cuando están en reposo prevalece la forma desfosforilada, dependiendo así su función de la actividad de la PP1. Además, se ha

comprobado que la pérdida de SPN conlleva una reducción de los niveles de PP1 y, por consiguiente, un aumento de pRB fosforilada y de la proliferación celular, que es neutralizada activando a una proteína supresora de tumores, conocida como guardián del genoma, p53 (Carnero, 2012). Por tanto, altos niveles de pRB fosforilada pueden dar como resultado un incremento de la actividad de p53, si está presente, o un aumento de las propiedades tumorigénicas, si por el contrario no lo está o es inactivo o mutado, como ocurre en la mayoría de los tumores (**Figura 1**).

ESPINOFILINA es, por ende, una proteína supresora de tumores que participa en la progresión y malignización de los mismos dependiendo de su asociación con la proteína PP1 y de la capacidad del complejo SPN-PP1 de desfosforilar a pRB durante el ciclo celular (Verdugo-Sivianes et al., 2021).

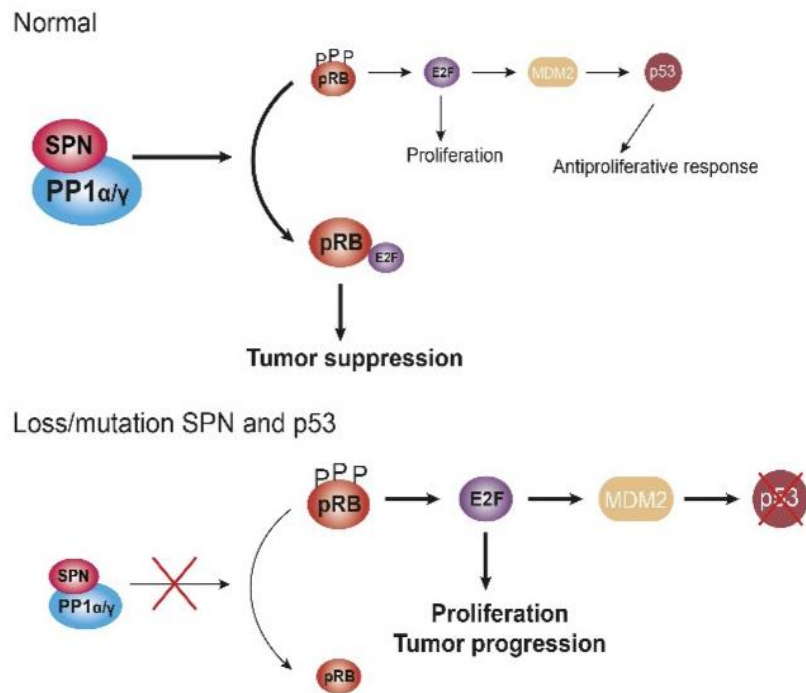


Figura 1. Esquema del mecanismo de PP1-SPN en el ciclo celular normal (arriba) y en tumorigénesis (abajo) (Verdugo-sivianes y Carnero, 2021).

El gen de la SPN se localiza en una región del genoma donde se encuentran también muchos genes supresores de tumores conocidos, como BRCA-1, cuya mutación heredada se correlaciona con una mayor predisposición a desarrollar cáncer de mama y de ovario. De igual forma, se ha descrito una mutación de SPN en muestras de tumores humanos, SPN-A566V, que afecta a la interacción entre PP1-SPN y a la capacidad de este holoenzima para regular el ciclo celular mediante desfosforilación, promoviendo así

un incremento de las propiedades tumorigénicas (Verdugo-Sivianes et al., 2021). Asimismo, la baja expresión de SPN se relaciona con un aumento de las propiedades de células madre tumorales y con un peor pronóstico del tumor. Esto ocurre en, aproximadamente, el 15% de los carcinomas de mama, los cuales se corresponden con un fenotipo menos diferenciado, más agresivo y peor supervivencia (Ferrer et al., 2016).

Su papel en el desarrollo de tumores mediando interacciones entre proteínas, fundamenta el interés de estudiar nuevas proteínas que se unan a ella y determinar cómo afectan a las propiedades de células madres tumorales y a la tumorigénesis (Sarrouilhe et al., 2006).

3. PAPP A.

PAPP A, cuyas siglas en inglés hacen referencia a “proteína plasmática A asociada al embarazo”, fue identificada como uno de los cuatro antígenos placentarios de función desconocida y en alta concentración en el plasma de mujeres gestantes. No obstante, estudios posteriores demuestran que se expresa también en otras células y tejidos no relacionados con el embarazo (Conover y Oxvig, 2018). Se trata de una zinc-metaloproteasa, una enzima localizada en la superficie celular, responsable de romper la unión específica entre el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1) y las proteínas transportadoras (IGFBPs) (Conover y Oxvig, 2018).

El IGF-1 es una hormona polipeptídica segregada en múltiples tejidos, principalmente en el hígado, en respuesta a la hormona del crecimiento (GH). Presenta funciones anabólicas, así como metabólicas, participando en la homeostasis y captación de la glucosa, en la lipogénesis y en la síntesis de proteínas (Kasprzak, 2021). La actividad del IGF-1 está regulada por la acción de las proteínas transportadoras, IGFBPs, que pueden inhibirla o potenciarla, uniéndose o no a él, respectivamente (Smith et al., 2018). La escisión de estas proteínas, en concreto de la IGFBP-4, mediante PAPP A, permite un aumento de la biodisponibilidad del IGF-1 para que interaccione con su receptor, IGF-IR, presente en la membrana celular (Conover y Oxvig, 2018).

La unión del ligando al receptor correspondiente desencadena su activación mediante autofosforilación de la tirosina quinasa y consigo, el inicio de la transducción de señales a través de distintas rutas como la ruta PI3K/Akt/mTOR y la ruta de las

quinasas MAPK, que conducen a actividades mitogénicas y antiapoptóticas (**Figura 2**) (Kasprzak, 2021).

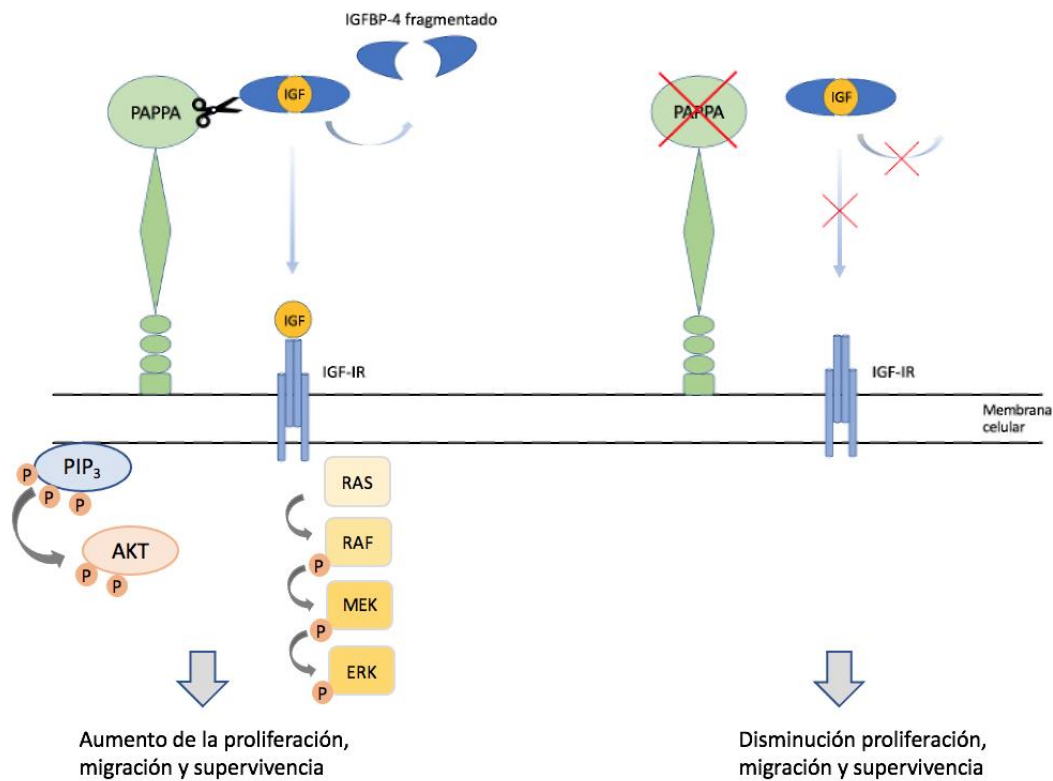


Figura 2: Señalización del IGF-1 en presencia y ausencia de PAPP. Modificada a partir de (Conover and Oxvig, 2018; Torres et al., 2019).

Por tanto, la ruta de señalización del IGF-1 puede estar asociada a la tumorigénesis, promoviendo la proliferación, diferenciación, supervivencia, metástasis y resistencia a fármacos en distintos tipos de cáncer. En esto se basa el interés en el estudio de esta ruta como potencial diana terapéutica y, en especial, de PAPP, puesto que existe cierta controversia en su implicación (Smith et al., 2018; Torres et al., 2019). Mientras que la sobreexpresión de PAPP en una variedad de tumores ha sugerido su papel como oncogén, también ha sido propuesto como supresor de tumores en lesiones precursoras de cáncer de mama, donde aparecía silenciada epigenéticamente y las cuales se volvían más invasivas tras reducir su expresión (Conover y Oxvig, 2018).

4. Antecedentes: estudio de la relación entre SPN y PAPP.

Estudios previos del grupo han demostrado mediante la técnica PLA (Proximity Ligation Assay) que las proteínas SPN-PAPP interactúan en líneas tumorales de mama (datos preliminares no publicados). Se ha descrito dicha interacción como funcional, puesto que no se ha visto correlación entre SPN y PAPP a nivel transcripcional ni a nivel de expresión proteica, de forma que SPN podría estar secuestrando a PAPP e impidiendo su actividad o viceversa.

Por otra parte, también se ha sugerido a PAPP como un gen supresor de tumores en cáncer de mama, reduciendo la capacidad de proliferación e invasión en el caso de las líneas con sobreexpresión ectópica (datos preliminares no publicados).

Objetivos

El principal objetivo de este trabajo consiste en el estudio de la interacción entre SPN y PAPPa y su repercusión en las propiedades tumorigénicas de las células. Para alcanzarlo, se definieron los siguientes objetivos concretos:

- Estudio del efecto del silenciamiento de la expresión de PAPPa mediante la técnica CRISPR a la vez que se sobreexpresa o no SPN.
- Estudio del efecto de la sobreexpresión de PAPPa en células que no expresan SPN.

Metodología

1. Cultivos celulares

En este trabajo se empleó una línea celular inmortalizada de adenocarcinoma de mama, llamada MDA-MB-231, y fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), tanto presenescentes como inmortalizados (pase 33-34). En el caso de los MEFs inmortalizados, se utilizaron tanto MEFs que expresaban SPN (SPN +/+) como MEFs que no expresaban SPN (SPN -/-). Las células se manipularon en campanas de flujo vertical Clase II Bio-II-A en salas de cultivo estériles. Crecieron en placas de 10 cm con un tratamiento adherente, en incubadores con una atmósfera al 5% de CO₂ y a 37°C. El medio de cultivo apropiado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, un antibiótico (penicilina-estreptomicina) y un antifúngico (fungizona), ambos al 1%.

Para el mantenimiento de la línea, el medio de cultivo fue cambiado cada tres días y se llevó un control del crecimiento celular mediante observación al microscopio. Cuando la confluencia de la placa era alta se precisaba diluirla con un factor apropiado para alcanzar un número de células adecuado en el tiempo previsto. Para levantar las células y pasarlas a distintas placas se empleaba tripsina al 0'05% para la línea MDA-MB-231 y al 0'25% para los MEFs, previo aspirado del medio de cultivo y lavado con PBS (Buffer fosfato salino).

2. Obtención y selección del CRISPR de PAPP

2.1 Obtención de los clones CRISPRs de PAPP

Se utilizó el sistema CRISPR-Cas9 (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated protein 9*) para la generación de un modelo *knock-down* (o reducción de expresión) del gen de PAPP. Para ello, se empleó un plásmido, previamente diseñado en el laboratorio, que contenía un sgARN (ARN de guía única quimérico) con la secuencia CAAGGTGGTGCGCTACCGCG dirigida al exón 1 de PAPP.

2.1.1 Infección lentiviral

El primer paso fue infectar las células de interés con el plásmido sgRNA-PAPPA siguiendo los pasos que se describen a continuación.

Primero se realizó una cotransfección del plásmido de interés y plásmidos que permiten la producción de los lentivirus en células HEK293T. Para ello, se mezclaron 10 µg de ADN del plásmido, 8 µg del plásmido psPAX2 (que contiene los genes virales: GAG y POL) y 2 µg del plásmido pM2D-G (que contiene el gen viral VSV-G) y 80 µl del agente de transfección PEI en 1 ml de medio. Se resuspendió bien con la pipeta y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadió la mezcla gota a gota a las células HEK293T que se sembraron el día anterior de manera que estuviera a una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se les cambió el medio y se incubaron otras 24 horas a 37°C para la producción de lentivirus. Al día siguiente, el sobrenadante que contenía los virus se pasó por un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm (VWR) y se realizó una dilución 1:4 con medio fresco suplementado con 8µg/ml de polibreno (Sigma), un polication que reduce la repulsión electrostática entre el virus y la membrana celular favoreciendo la unión de los mismos. Por último, se infectaron las células receptoras con el sobrenadante lentiviral preparado. Las células infectadas se incubaron durante 4-6 horas a 37°C. Posteriormente, se les cambió el medio a las células, eliminándoles los virus y se mantuvieron 24 horas a 37°C antes de empezar el proceso de selección. Para ello, se añadió a cada placa la droga puromicina en una concentración de 0,5 µg/ml y se dejaron 3-4 semanas hasta la formación de clones de las células resistentes que poseían el plásmido, cambiando el medio con droga dos veces por semana. Posteriormente, se pasaron los clones a monocapa, obteniendo poblaciones celulares con la mezcla de todos los clones obtenidos en una placa.

2.1.2 Generación y selección de los clones de CRISPRs

Una vez que las células estuvieron seleccionadas con puromicina, se aislaron para que pudieran formar clones independientes. Para ello, las células se resuspendieron en PBS con 2% FBS y 5mM EDTA, y se pasaron por el citómetro de flujo FACS Jazz (BD Biosciences) para sembrar una célula por pocillo en placas de 96 que contenía medio con puromicina. Aproximadamente un mes más tarde, algunas células habían crecido y

formado clones procedentes de una sola célula. Cada clon se dividió en dos pocillos en una placa de 6 pocillos y se dejaron crecer.

La comprobación del éxito de la técnica CRISPR se realizó a través de la expresión de ARN, así como de la expresión proteica de PAPPa mediante Western Blot (procedimiento detallado en el apartado 3.3).

2.2 Extracción de ARN

A partir del cultivo celular sembrado en placas de 6 pocillos, dos por clon, se aspiró el medio de cultivo y se realizó un lavado de las células con Buffer fosfato salino (PBS) para eliminar los restos de medio y las células muertas. A continuación, se añadió 0'5 ml de tripsina para levantarlas y se recogieron en un *ependorf* junto con 0'5 ml de medio para centrifugarlas durante 5 minutos a 10000 rpm. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se obtuvo el pellet de células correspondiente a cada pocillo, el cual se congeló a -80°C hasta el momento de la extracción de ARN para evitar su degradación.

A la hora de extraer el ARN, se siguieron los pasos dispuestos en el protocolo del kit “*ReliaPrep RNA Cell Miniprep System*” de Promega para cada muestra. En primer lugar, se añadió al *ependorf*, 500 µl de buffer de lisis y 170 µl de isopropanol para romper el ADN y se mezcló mediante vórtex durante 5 segundos. A continuación, se transfirió el lisado a unas mini columnas dispuestas sobre tubos colectores y se centrifugó a 14000 g durante aproximadamente un minuto. El siguiente paso fue añadir a la columna 500 µl de una solución de lavado de ARN y centrifugar a 14000 g durante 30 segundos. Posteriormente, se adicionó 30 µl de una mezcla de DNasa previamente preparada. Tras un periodo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se realizaron dos lavados sucesivos, el primero con 200 µl de solución de lavado de la columna y el segundo con 500 µl de solución de lavado de ARN, centrifugando después de cada uno, a 14000 g durante 15-30 segundos, respectivamente. Se reemplazó el tubo colector por uno nuevo y se procedió a un último lavado con 300 µl de solución de lavado de ARN, aumentando el tiempo de centrifugación a 2 minutos. Finalmente, se desechó el tubo colector y se eluyó el ARN presente en la membrana de la columna con agua libre de nucleasa en un nuevo tubo, que se conservó a -80°C hasta el momento de la retrotranscripción.

2.3 Retrotranscripción de ARN

Consiste en la síntesis de ADN complementario (ADNc) de doble cadena a partir del ARN monocatenario extraído anteriormente, mediante la acción de la retrotranscriptasa.

Siguiendo el protocolo de retrotranscripción, se preparó un volumen superior al necesario para todas las muestras de una disolución compuesta, en las proporciones dictadas, por: un buffer, los cebadores de secuencias aleatorias que permiten la unión de la enzima a la mayoría de los fragmentos de ARN (*random primers*), los desoxirribonucleótidos (dNTPs), la retrotranscriptasa y agua libre de nucleasa. Por cada 10 μ l de muestra de ARN, cuantificado previamente en NanoDrop para tener una muestra de 0,5 μ g, se añadieron en un mini *eppendorf* en frío otros 10 μ l de la mezcla preparada, obteniendo un volumen final de 20 μ l por muestra. A continuación, se introdujeron en el termociclador y se sometieron a una reacción de transcripción reversa, que consiste en: en 10 minutos a 25°C, 37 minutos a 120°C y 5 minutos a 85°C. Finalmente, se almacenaron a -20°C hasta su análisis por RT-qPCR.

2.4 PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La PCR cuantitativa o en tiempo real es una técnica específica cuyo objetivo es la cuantificación de la expresión de genes, en este caso de *PAPPA* y *SPN*. Para llevarla a cabo se preparó una mix GoTaq, que incluía la polimerasa, junto con agua libre de nucleasas y la sonda específica para el gen de estudio (*PAPPA* (Hs01032307_m1); *SPN* (Hs00261636_ml)), así como para el gen de control endógeno, *GAPDH* (Hs03929097_g1).

Las sondas están formadas por oligonucleótidos que hibridan con regiones concretas del ADNc, en cuyo extremo 5' presenta un fluoróforo y en el extremo 3' un *quencher* que inhibe la fluorescencia del fluoróforo cuando están próximos. Durante la progresión de la reacción, cuando la polimerasa alcanza la sonda, la degrada y el fluoróforo se libera emitiendo fluorescencia, que es medida por los sensores del termociclador.

Las sondas para diferenciar los niveles de expresión de *SPN* endógena y *SPN* exógena fueron diseñadas mediante la aplicación *Custom Taqman® Gene Expression Assays* de Thermo Fisher Scientific. Para la sonda *SPN* endógena se utilizó como

secuencia diana la parte final de la secuencia codificante y parte del extremo 3' del ARNm del gen *SPN*, mientras que para la sonda *SPN* exógena se utilizó la secuencia de las etiquetas c-Myc y DDK y parte de la secuencia del plásmido pCMV6 *SPN*, justo detrás de dichas etiquetas.

En una placa de 384 pocillos, se cargaron 10 µl por pocillo: 8 µl de la mix y 2 µl de muestra de ADNc, para cada una por triplicado. Finalmente, se introdujo la placa en el termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). El programa de PCR consistió en 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C.

Para analizar los resultados se calculó la media de los valores de ciclo umbral (Ct) de cada muestra y se normalizaron respecto al gen constitutivo, empleando $2^{-\Delta Ct}$ con los programas SD y RG Manager (Applied Biosystems). Para normalizar las muestras se usó GAPDH como control endógeno. Cada reacción se hizo por triplicado y se realizaron al menos 3 experimentos independientes para gen analizado.

2.5 Comprobación mediante Western Blot.

I. Extracción y cuantificación de proteína total

Para efectuar la extracción de proteínas y poder hacer la comprobación de la transfección mediante Western Blot, en primer lugar se recogió el pellet de células. Para ello, a partir de una placa de 10 cm, se aspiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS a 4°C. A continuación, se añadió un 1 ml de PBS y se levantaron las células de la placa con ayuda de un *scraper*. El volumen se añadió a un *ependorf* para centrifugarlo y obtener el pellet, que se conservó en frío. El siguiente paso fue añadir el tampón de lisis RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer*, compuesto por: Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 (IGEPAL) 1% (Sigma), desoxicolato de sodio 1% (Sigma), SDS 0,1%, Na₃VO₄ 1mM (Sigma), EDTA 0,5 pH 8)), encargado de romper las membranas celulares, y los inhibidores de fosfatasas y de proteasas (Sigma). Posteriormente, se sonicó cada muestra durante 3 ciclos de 15 segundos al 40% de potencia, para lisar la membrana nuclear, y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener las proteínas en el sobrenadante, que se conservó a -20°C, y desechar el precipitado con los restos celulares.

A la hora de cuantificar proteínas es necesario tener la misma concentración de cada muestra para cargar el gel. Para ello, se determinó la concentración total de proteína en cada muestra empleando una técnica colorimétrica, el ensayo de Bradford. En una placa de 96 pocillos, se cargó 2 μ l de muestra por pocillo por triplicado y 200 μ l de colorante Bradford, el cual se une a las proteínas y permite apreciar una mayor tonalidad conforme mayor concentración de proteínas presente. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y los resultados se compararon con una recta patrón de concentraciones crecientes de BSA (albúmina de suero bovino). Finalmente, se extrapolaron los valores de absorbancia en la ecuación de la recta y se hallaron las concentraciones de cada muestra, a partir de las cuales se calculó el volumen de carga para cada una en el gel.

II. Western Blot (WB)

En primer lugar, se añadió un volumen adecuado de tampón de carga Laemmli según el volumen de muestra y se desnaturalizaron las proteínas sometiéndolas a 95°C durante 5 minutos. A continuación, se procedió mediante electroforesis a la separación de las proteínas en geles de acrilamida al 6 y 8%, según el peso molecular de la proteína en estudio.

Seguidamente, se llevó a cabo la transferencia de cada gel a membranas de nitrocelulosa a 400 mA durante 2 horas o 30V durante toda la noche, en caso de proteínas de mayor peso molecular (gel al 6%). Una vez transcurrido ese tiempo, las membranas se bloquearon con un tampón compuesto de PBS-Tween y 3% BSA durante 2 horas en agitación, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Posteriormente, se incubaron toda la noche con la dilución apropiada del anticuerpo primario en tampón de bloqueo y agitación (**tabla 1**). Al día siguiente, se retiró el exceso de anticuerpo primario no unido específicamente a la proteína de interés mediante tres lavados de la membrana de 10 minutos con PBS-Tween y se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario, unido a peroxidasa (**tabla 1**). Por último, se lavó nuevamente la membrana con PBS-Tween para retirar el anticuerpo secundario sobrante y se procedió al revelado de la membrana a través de una reacción de quimioluminiscencia, con un revelador de baja o media intensidad como sustrato, en el equipo Chemidoc.

Tabla 1: Características de los anticuerpos empleados para la técnica de Western Blot.

Anticuerpos	Proveedor y referencia	Dilución WB
SPN (policlonal conejo)	Chemicon (AB5669)	1:4000
α -tubulina (monoclonal ratón)	Sigma Aldrich (T9026)	1:10000
anti-DDK tag (monoclonal ratón)	OriGene (TA150014)	1:1000
PAPPA (monoclonal conejo)	Abcam (ab174314)	1:1000
anti-ratón-HRP (policlonal)	Abcam (ab97046)	1:5000
anti-conejo-HRP (policlonal)	Abcam (ab97051)	1:5000

2.6 Secuenciación de los clones de CRISPRs

Para secuenciar los clones de CRISPRs elegidos, se extrajo el ADN genómico mediante el kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche) y se mandó a secuenciar al servicio de Genómica y Secuenciación del IBiS.

3. Transfección de las células con los plásmidos de interés

3.1 Amplificación de plásmidos

Los plásmidos que se emplearon se detallan a continuación:

Tabla 2: Características de los plásmidos empleados.

Plásmido	Resistencia en eucariotas	Resistencia en bacterias	Origen
PCMV6-EV	Puromicina / G418	Ampicilina	Origene
PCMV6- SPINPHILIN (ref. RC213696)	G418	Kanamicina	Origene
PCMV PAPPA	Puromicina	Ampicilina	Vector Builder

Para obtener el plásmido de interés en cantidades necesarias para después transfectar las células, lo primero que se llevó a cabo fue la transformación de bacterias quimiocompetentes mediante choque térmico.

En primer lugar, se añadieron 1-5 μ l del ADN plasmídico que se pretendía amplificar a alícuotas de 50 μ l de bacterias de la cepa *Escherichia coli* DH5a y se incubaron durante media hora en hielo. A continuación, se colocaron durante 30 segundos a 42°C y seguidamente dos minutos en hielo nuevamente. El siguiente paso fue diluir la mezcla hasta 1 ml añadiendo 950 μ l de medio LB (Luria Bertani) en un ambiente séptico y mantenerla en agitación durante una hora a 37°C. Posteriormente, se centrifugó para concentrar las bacterias y poder desechar gran parte del sobrenadante. Se sembraron unos 200 μ l de bacterias por placa de LB-agar con kanamicina o ampicilina, el antibiótico para seleccionar exclusivamente aquellas transformadas que tuviesen el plásmido con el gen de resistencia.

Al día siguiente, se preparó un tubo de 5ml de medio LB junto con 5 μ l de antibiótico y se sembró alguna colonia aislada crecida en la placa. Tras esperar unas 6 horas en agitación a 37°C, se tomaron 5 ml de ese preinóculo en campana y se añadieron a un matraz con 100 ml de medio LB y 100 μ l de antibiótico. El inóculo se dejó reposar toda la noche a 37°C.

Por último, el tercer día se llevó a cabo la extracción y purificación del plásmido amplificado presente en las bacterias usando el kit Maxiprep de PureLink (Invitrogen).

3.2 Transfección de células

La transfección consiste en la introducción de material genético en las células eucariotas, en este caso, el plásmido con el gen de interés y el vacío. En la técnica realizada se empleó TransIT, un agente de transfección polimérico que se combina con el ADN plasmídico y forma unos complejos capaces de atravesar la membrana celular mediante endocitosis.

Para ello, se sembraron las células de las dos condiciones (parental y CRISPR 39) en una placa de 6 pocillos con una dilución apropiada para obtener al día siguiente una confluencia aproximada del 70%. El día posterior se prepararon dos tubos, cada uno con uno de los plásmidos, el agente de transfección y medio de cultivo y se dejaron incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras cambiar el medio de la placa, se repartió cada tubo gota a gota por dos pocillos y se incubaron 48 horas a 37°C.

Al cabo de dos días, se cambió el medio y se pasó cada pocillo a una placa de 10 cm para comenzar el proceso de selección al día siguiente. Para ello, se añadió la droga G418 o puromicina a cada placa en una proporción de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ y 0,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, según la condición y se dejaron 3 semanas hasta la formación de clones de las células resistentes que poseían el plásmido, cambiando el medio con droga dos veces por semana.

Una vez seleccionadas, cada placa con una condición distinta se dividió en 4 placas con una dilución 1:4, las cuales se destinarían a mantenimiento, congelación, extracción de proteínas y de ARN. Para la comprobación de la transfección mediante q-PCR y Western Blot se procedió tal como se detalla en los apartados anteriores, 2.4 y 2.5, respectivamente.

4. Transfección de células Phoenix-E e infección retroviral de MEFs

4.1 Transfección de células Phoenix-E

Para generar los virus con los que infectar luego las células de interés, en primer lugar se sembraron en medio DMEM, 4 placas de 10 cm con células Phoenix-E, células humanas embrionarias de riñón HEK293T que ya poseen capacidad para expresar los genes retrovirales *GAG*, *POL* y *ENV* (ecotrópico), a una confluencia del 60% y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al alcanzar una confluencia del 70%, se transfectaron dos placas con el plásmido de PAPPa y las otras dos con el plásmido vacío, empleando, en este caso, polietilimina (PEI) como agente de transfección.

Al día siguiente, se cambió el medio para evitar la toxicidad del agente de transfección y se incubaron las placas a 32°C para incrementar la estabilidad viral durante 48 horas. Tras ese tiempo, se recolectó en un falcon el medio de las células productoras que contenía los virus y se pasó a través de un filtro de acetato de celulosa 0,45 μm con ayuda de una jeringa. A continuación, se añadió la mitad del volumen recuperado de medio fresco y 8 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno (Sigma), que facilita la formación de agregados.

4.2 Infección retroviral de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

Las células receptoras se sembraron en 3 placas de 6 pocillos (10^5 células por cada pocillo), una para condición: presenescentes, immortalizados (SPN+/SPN+) e immortalizados (SPN-/SPN-). Una vez alcanzada una confluencia aproximada del 50%,

se eliminó el medio y se añadió 2 ml del sobrenadante con los virus y polibreno, dos pocillos para cada plásmido, y medio libre de virus en el control. A continuación, se centrifugaron las placas a 1500 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente, para contribuir a la unión de los agregados virales a las células, y seguidamente se incubaron a 32°C durante 6-8 horas. Pasado dicho tiempo, se les cambió el medio a las células, eliminándoles los virus, y se mantuvieron 72 horas a 37°C antes de empezar el proceso de selección detallado en el apartado 3.2.

5. Ensayos de tumorigenicidad

5.1 Curvas de crecimiento

Se realizó un recuento de células viables no teñidas con azul de tripán en la cámara de Neubauer y se sembraron 2000 células para MDA-231 y 20000 células para los MEFs por pocillo, tres por condición, en 7 placas de 12 pocillos. Al día siguiente, se fijó con glutaraldehído una primera placa, que se consideró el día cero y el primer punto de la curva. Posteriormente, cada 48 horas se fueron obteniendo los sucesivos puntos de la curva y, una vez fijadas todas las placas, se tiñeron con cristal violeta. Finalmente, se midió indirectamente la concentración de células correspondiente a cada día, midiendo la absorbancia de cristal violeta diluido en ácido acético a 595 nm en el espectrofotómetro. Los valores de los distintos puntos se representaron en una gráfica respecto al día cero.

5.2 Clonabilidad

Las células se sembraron por triplicado en placas de 10 cm a baja densidad, unas 5000 células por placa, y fueron cultivadas en condiciones estándar durante 10 días. Transcurrido ese tiempo, se fijaron con glutaraldehído y se tiñeron con cristal violeta. Finalmente, se cuantificó el número y tipo de colonias presentes en cada placa.

5.3 Formación de tumoresferas

Se sembró una placa de baja adherencia de 12 pocillos, tres por condición y 4000 células en cada uno. Se empleó el medio de cultivo Mammocult suplementado con suero, heparina, hidrocortisona, penicilina y fungizona. Las células se cultivaron durante 4-5 días y, posteriormente, se tomaron fotos al microscopio para realizar un recuento de las tumoresferas formadas.

6. Análisis de datos

Se utilizó el programa informático Microsoft Excel para todos los análisis y representaciones gráficas de los experimentos realizados con las líneas celulares. En este trabajo solo realizamos una única réplica biológica de cada experimento con sus correspondientes tres réplicas técnicas.

Resultados y discusión

1. Efecto del CRISPR de PAPPa y la sobreexpresión de SPN en las propiedades tumorigénicas de la línea MDA-MB-231.

Para estudiar la interacción entre PAPPa y SPN, en primer lugar se disminuyó la expresión de *PAPPa* mediante la generación de un modelo CRISPR de PAPPa en la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231. Tras la obtención de un total de 40 clones, se midió la expresión de *PAPPa* en todos ellos en comparación con la línea parental mediante RT-qPCR (**figura 3**). Se seleccionaron los tres con menor expresión a nivel transcripcional (el 25, 30 y 39) y se volvieron a validar mediante RT-qPCR (**figura 4**) y Western Blot (**figura 5**). Finalmente, se confirmó que eran CRISPRs de PAPPa mediante secuenciación (**figura 6**).

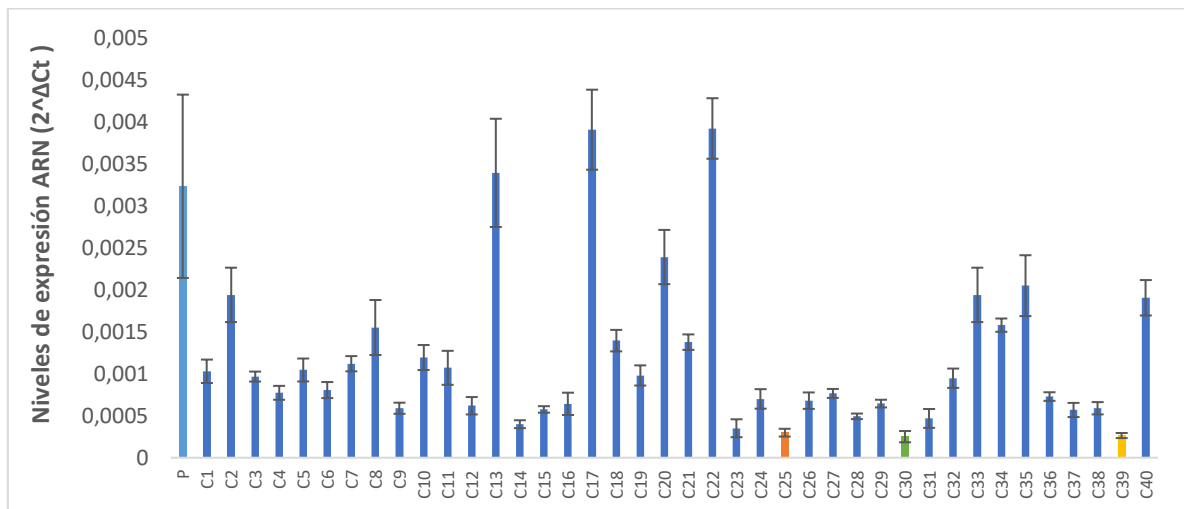


Figura 3: Comprobación mediante q-PCR de los CRISPR de PAPPa. Se representa la media de un experimento por triplicado.

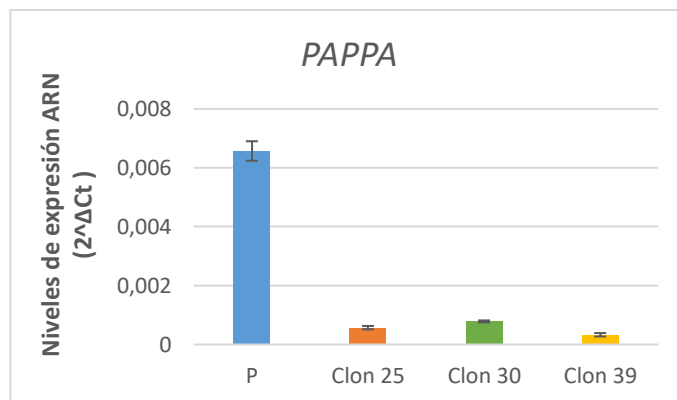


Figura 4: Recombprobación mediante q-PCR de los CRISPR seleccionados. Se representa la media de un experimento por triplicado.

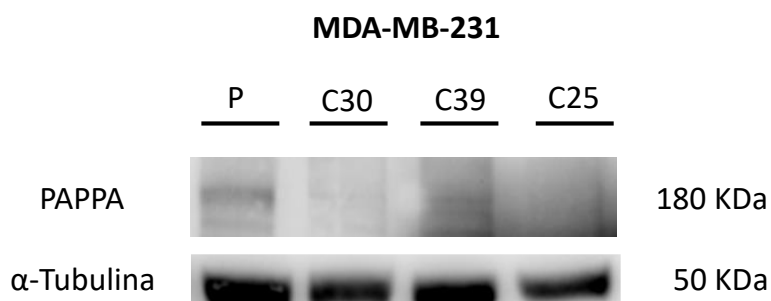


Figura 5: Comprobación mediante Western-Blot de la expresión reducida de PAPP A en los CRISPRs seleccionados en comparación con la parental.



Figura 6: Validación mediante secuenciación de los CRISPRs de PAPP A. Se compara la secuencia de cada uno de los CRISPR con la secuencia original del gen de PAPP A. En azul se resalta la secuencia del sgRNA.

A continuación, una vez generados y validados los CRISPRs de PAPP, se iniciaron los experimentos con dichos clones para estudiar el efecto del silenciamiento de *PAPP* en las propiedades tumorales y en las propiedades relacionadas con el fenotipo de células madre en la línea MDA-MB-231 en comparación con la parental. En primer lugar, llevamos a cabo ensayos de clonabilidad y de proliferación.

Para realizar la curva de crecimiento de los clones y comparar su tasa de proliferación respecto a la parental, se sembraron las células a baja densidad y se tomaron siete puntos de la curva en días alternos desde el día 0. Observamos que los clones con *PAPP* silenciado, crecían más lento que la parental, viéndose este efecto más pronunciado en el CRISPR 39 (**figura 7**).

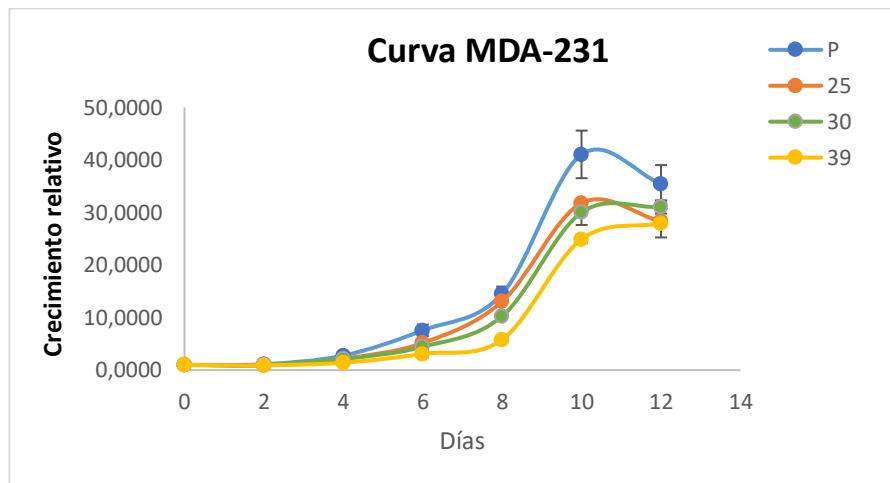


Figura 7: Ensayo curva de crecimiento de los CRISPR de PAPP seleccionados en comparación con la parental. Se representa la media de un experimento por triplicado.

Para el ensayo de clonabilidad, las células se sembraron por triplicado a baja densidad para poder observar la capacidad de formación de clones. Los resultados obtenidos muestran que el número y el tamaño de los clones en los CRISPRs era menor que en la parental (**figura 8**).

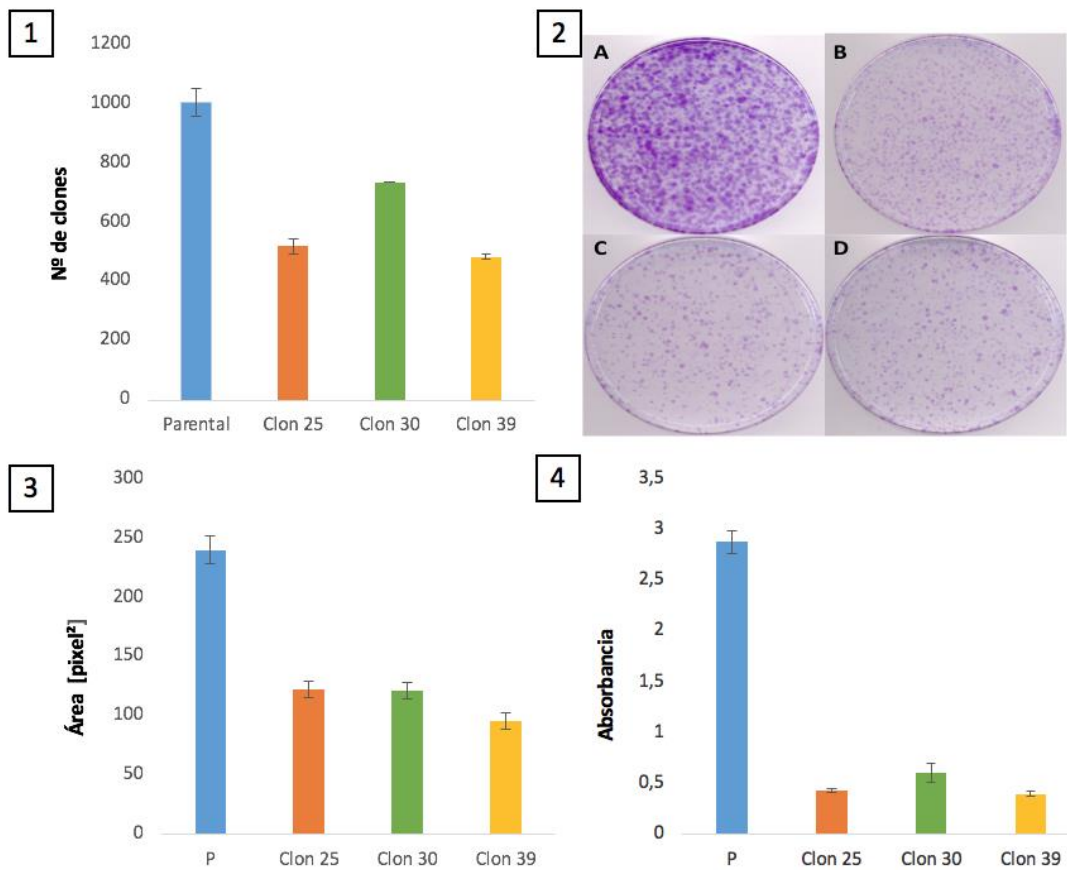


Figura 8: Ensayo de clonabilidad. **1)** Número de clones de los CRISPR en comparación con la parental. **2)** Imágenes representativas de la formación de clones. A) Parental B) CRISPR 30 C) CRISPR 25 D) CRISPR 39. **3)** Media del área de las colonias representativas en cada placa. **4)** Absorbancia media de las placas. Se representa la media de un experimento por triplicado.

La capacidad de multiplicación de un clon derivado de una célula se puede estimar a partir de los tipos de colonias presentes en una placa y del número de cada uno. En función del fenotipo, se pueden distinguir tres tipos de clones (**figura 9**):

- Holoclones: son un conjunto de células con propiedades de célula madre, con gran capacidad reproductiva, poco diferenciadas y capaces de regenerar el cultivo completo.
- Paraclones: son colonias menos desarrolladas, más pequeñas y diferenciadas, que no son capaces de regenerar el cultivo.
- Meroclones: son células con propiedades intermedias entre el holoclon y el paraclon (Barrandon y Green, 1987; Beaver et al., 2014).



Figura 9: Imágenes representativas de los distintos tipos de clones (holoclon, meroclon y paraclon) en la línea MDA-MB-231.

Tras analizar el fenotipo de los clones individuales formados y realizar el recuento de cada tipo de clon en el microscopio, se observa un mayor porcentaje de holoclones en la parental que en las células sin expresión de PAPP, en las que predomina la presencia de paraclones (**figura 10**).

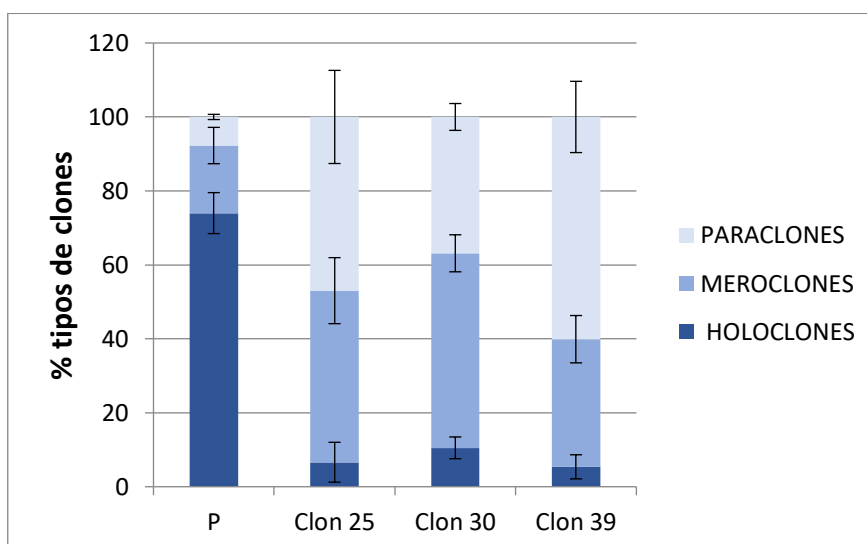


Figura 10: Ensayo de clonabilidad: porcentaje de tipos de clones de los CRISPR de PAPP, en comparación con la parental. Se representa la media de un experimento por triplicado.

Asimismo, para conocer la repercusión del CRISPR de PAPP sobre el fenotipo de célula madre tumoral realizamos una repetición del ensayo de tumoresferas. Las tumoresferas están constituidas por una población celular capaz de crecer en medio sin suero formando agrupaciones celulares en suspensión en placas especiales sin tratamiento adherente. Además, las tumoresferas poseen la capacidad de auto-renovación tras ser disgregadas, están enriquecidas en progenitores epiteliales multipotentes y presentan

altos niveles de expresión de marcadores de células madre tumorales (García-Heredia et al.,; Dontu et al., 2003).

Se observó un mayor número de tumoresferas formadas y de mayor tamaño en la línea parental que en los CRISPR (**figura 11**).

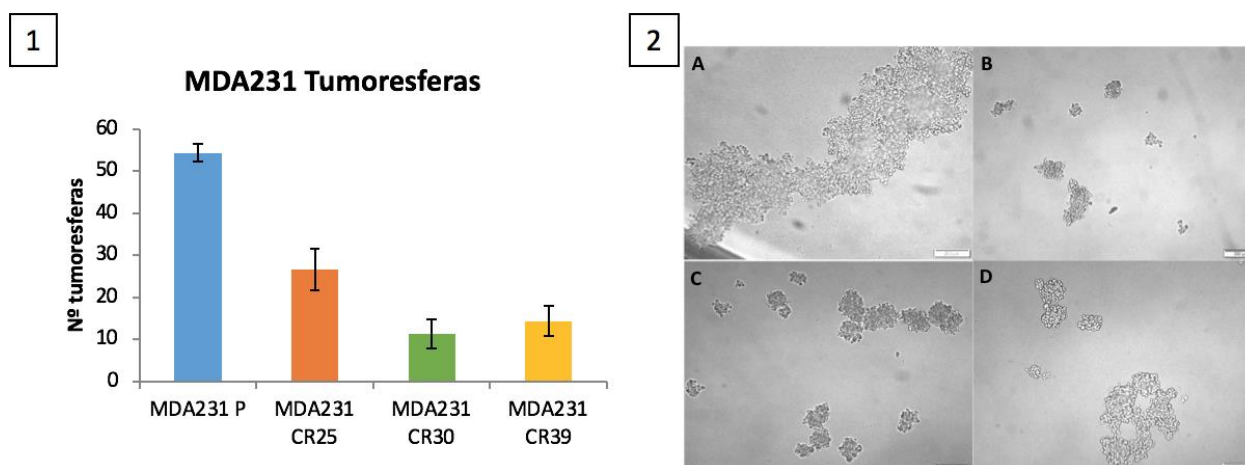


Figura 11: Ensayo de tumoresferas. 1) Número de tumoresferas de los CRISPR seleccionados en comparación con la parental. 2) Se muestran imágenes representativas de las tumoresferas formadas tras 7 días. A) Parental B) CRISPR 30 C) CRISPR 25 D) CRISPR 39. Se representa la media de un experimento por triplicado.

Tanto la menor tasa de crecimiento como la disminución en la formación de holoclonos y tumoresferas en el caso de los CRISPRs de PAPP, indican que el silenciamiento de dicho gen implica una reducción de las propiedades tumorigénicas y sugieren su posible papel como oncogen, resultado que concuerda con estudios que proponen una función oncogénica tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes tipos de tumores: de ovario, de pulmón de células no pequeñas, mesotelioma, sarcoma o melanoma (Conover y Oxvig, 2018).

En función de los resultados obtenidos, se optó por elegir el clon 39 para continuar y facilitar el estudio del efecto de la sobreexpresión o no de *SPN* en el CRISPR de PAPP en comparación con la línea parental. Por tanto, dicho clon fue el que se procedió a transfectar para sobreexpresar *SPN*.

Se comprobó que la doble transfección había tenido lugar correctamente mediante la medición de los niveles de expresión tanto de *PAPP* como de *SPN* mediante Rt-qPCR (**figura 12**), así como de la expresión proteica a través de Western-Blot de PAPP, SPN

y de la etiqueta DDK, presente al final de la proteína SPN que nos permite diferenciarla de la proteína SPN endógena (**figura 13**).

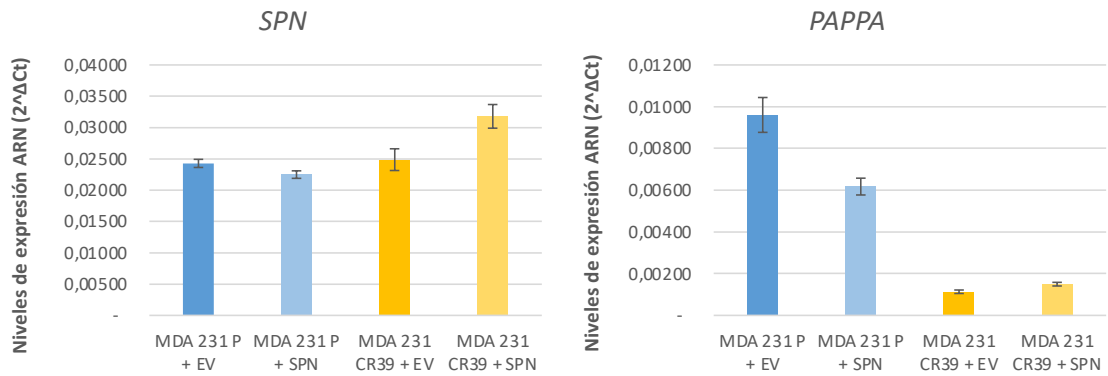


Figura 12: Validación de la sobreexpresión de SPN mediante la medición de los niveles de SPN por RT-qPCR en la línea MDA-MB-231 parental y CRISPR 39 en comparación con el vector vacío. Se representa la media de un experimento por triplicado.

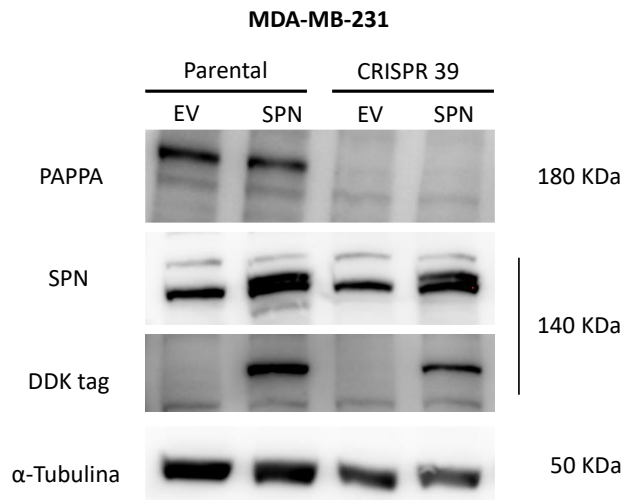


Figura 13: Validación de la sobreexpresión de la proteína SPN y la etiqueta DDK mediante Western Blot en la línea MDA-MB-231 parental y en el CRISPR 39 en comparación con el vector vacío.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de *SPN* combinado con el silenciamiento de *PAPPa*, se realizó un ensayo de proliferación comparando, por un lado, el comportamiento del CRISPR 39 y la línea parental con la sobreexpresión de SPN y, por otro lado, las dos condiciones con sobreexpresión con sus respectivos vectores vacíos.

En el ensayo de proliferación, se produjo un crecimiento más lento en el CRISPR de PAPPa que en la parental. Se observa diferencia entre el crecimiento de la parental

con y sin sobreexpresión de *SPN*, siendo menor cuando *SPN* está aumentada. Sin embargo, esta desigualdad en el crecimiento no es visible en el caso del CRISPR, ya que no hay diferencias en el crecimiento entre las células que tienen baja expresión de PAPP A y sobreexpresan o no *SPN* (**figura 14**).

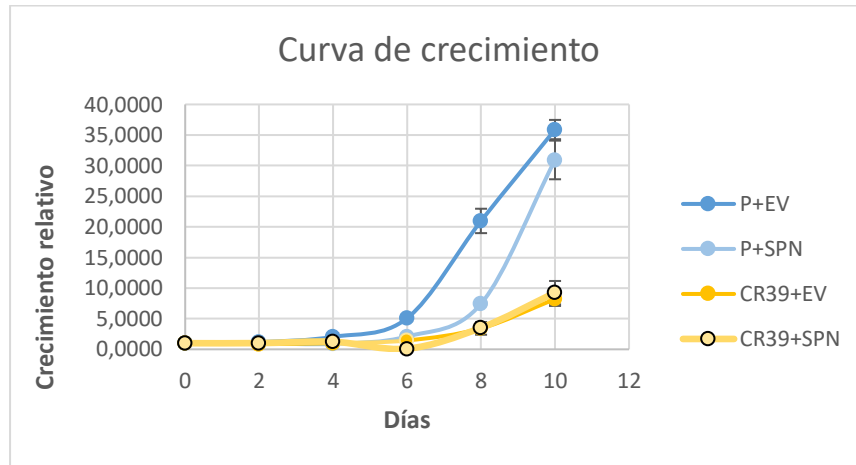


Figura 14: Ensayo curva de crecimiento en línea parental y CRISPR 39 con y sin sobreexpresión de *SPN*. Se representa la media de un experimento por triplicado.

Además, medimos la expresión de algunos factores de transcripción implicados en rutas de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre tumorales (*NANOG*, *SOX2*, *OCT4*, *KLF4*, *BMI1*). Observamos una disminución de la expresión de *NANOG* tanto al sobreexpresar *SPN* como al disminuir PAPP A, sin diferencias entre las que solo tienen disminuido PAPP A y las que además de disminuir PAPP A sobreexpresan *SPN*. Sin embargo, ocurre lo contrario con la expresión de *SOX2* y *KLF4*, ya que las células que tienen disminuida PAPP A y sobreexpresan *SPN* presentan mayores niveles de expresión. No se observan diferencias significativas en la expresión de *OCT4* y *BMI1* (**figura 15**).

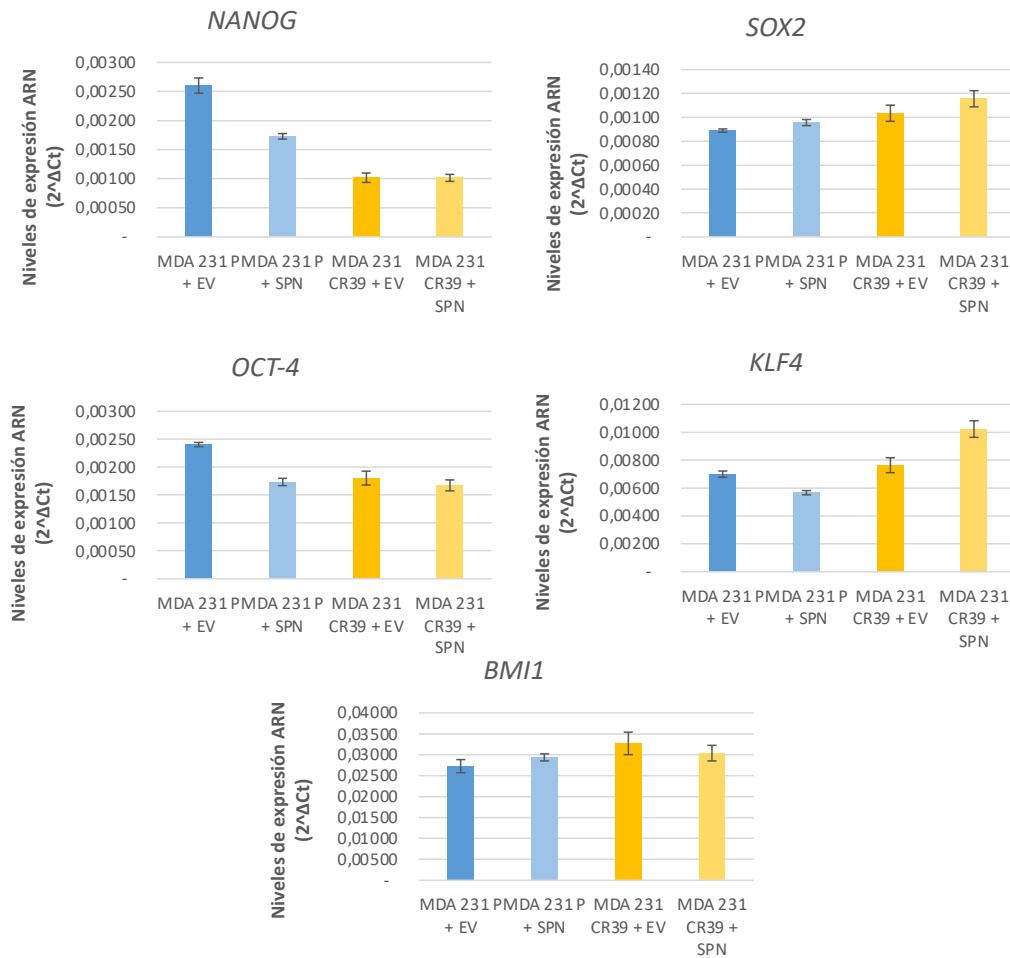


Figura 15: Efecto de la sobreexpresión de SPN en la expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre tumoral en el CRISPR de PAPPa en comparación con la parental. Se representa la media de un experimento por triplicado.

Los resultados hasta el momento nos indican que las células que tienen disminuida PAPPa crecen mucho menos que las células control, tienen menos holoclones y forman menos tumoresferas. Además, al sobreexpresar SPN también disminuye el crecimiento en comparación con las células control, ya que se ha descrito que SPN tiene una función de supresor tumoral. Sin embargo, al sobreexpresar SPN en las células con baja expresión de PAPPa no vemos diferencias con respecto a aquellas que solo tienen disminuida PAPPa.

Asimismo, se observan cambios en la expresión de genes relacionados con la pluripotencia de las células madre en los CRISPR respecto a la parental, lo que hace interesante el estudio del fenotipo de célula madre cuando se disminuye la expresión de PAPPa y se sobreexpresa SPN, quedando pendiente la realización de ensayos de

clonabilidad y de tumoresferas para esclarecer el papel de PAPPa y SPN en las propiedades de célula madre.

La menor tasa de proliferación de los CRISPRs de PAPPa se podría explicar a través de la ruta de señalización del IGF-1, puesto que la ausencia de PAPPa reduce la biodisponibilidad del ligando para unirse a su receptor y esto conduce a una menor proliferación. Por su parte, el efecto de la sobreexpresión de SPN se explicaría teniendo en cuenta su papel como supresor tumoral en el ciclo celular. Así pues, un aumento de SPN y, a su vez del holoenzima SPN-PP1, daría lugar al predominio de pRB desfosforilado y, consecuentemente, a la detención de la proliferación (Verdugo-Sivianes et al., 2021). La sobreexpresión de SPN no parece afectar al efecto provocado por la disminución de PAPPa.

2. Efecto de la sobreexpresión de PAPPa en MEFs SPN +/+, SPN -/- y no inmortalizados.

A la hora de estudiar el efecto de la sobreexpresión de PAPPa decidimos analizarlo en células que no expresan SPN en contraposición de las que sí lo expresan. Para ello, recurrimos a fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) inmortalizados tras un número de pases alto, que presentaban expresión de SPN (+/+) y otros que no expresaban SPN (-/-), los cuales se sometieron a una infección retroviral para introducir el plásmido con el gen de PAPPa.

A continuación, se llevó a cabo un ensayo de proliferación en placas de 12 pocillos con las 3 condiciones viables: MEFs SPN (-/-) + EV, MEFs SPN (-/-) + PAPPa y MEFs SPN (+/+) + EV, puesto que los MEFs (+/+) + PAPPa no llegaron a crecer ni a formar clones tras la infección. En los primeros días, se observa que los MEFs SPN (-/-) presentan un mayor crecimiento que los MEFs SPN (+/+), ya que se ha descrito que SPN es un supresor tumoral. Además, cuando sobreexpresamos PAPPa en ausencia de SPN (MEFs SPN (-/-) + PAPPa) se contempla una disminución del crecimiento en relación a los MEFs SPN (-/-), pero crecen más que los MEFs SPN (+/+) + EV (**figura 16**).

A partir del cuarto día, existe una diferencia de crecimiento entre los MEFs (-/-) + PAPPa y los MEFs SPN (+/+) + EV que puede ser explicada en base a la densidad de saturación celular, de tal forma que una alta confluencia de los pocillos puede inhibir el crecimiento de las células con menor capacidad tumorigénica. Así pues, las células que

no reprimen su crecimiento por contacto estrecho con otras células (MEFs (-/-) + PAPP), continúan creciendo formando multicapas y presentan mayores cualidades de célula madre tumoral.

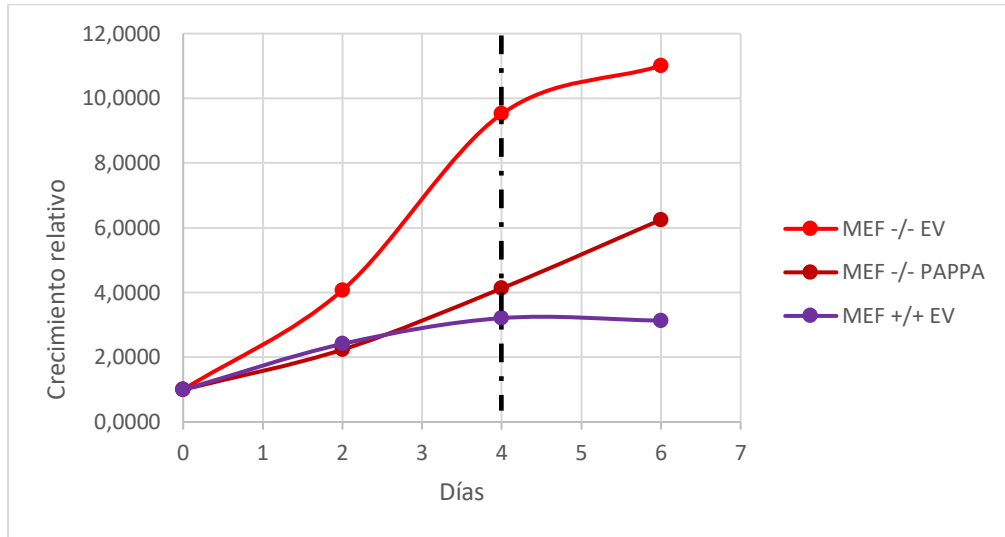


Figura 16: Ensayo de curva de crecimiento en MEFs inmortales (pase 33-34) con y sin SPN y sobreexpresión de PAPP. Se representa la media de un experimento por triplicado.

Asimismo, ya que los MEFs (+/+) + PAPP no crecían, quisimos examinar si la sobreexpresión de *PAPP* ejerce algún efecto en la inducción de la senescencia en células, puesto que la edad es uno de los mayores factores de riesgo en el desarrollo de tumores y esto se relaciona con la acumulación de células senescentes en tejidos sanos, que terminan originando un foco inflamatorio crónico y estimulando con el tiempo la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento como el cáncer (Hanahan, 2022).

Para ello, se emplearon MEFs que fueran presenescentes, es decir, que tuvieran un número de pases bajo, y se infectaron para sobreexpresar *PAPP*. A continuación, se sembraron dos placas de cada condición (vector vacío y sobreexpresión de *PAPP*) y un control negativo a baja densidad. Se fue estimando el porcentaje de confluencia de ambas placas cada 3-4 días para hacer un recuento aproximado de las células que podían estar proliferando y representar los datos en una curva de crecimiento (**figura 17**). Se observa que la sobreexpresión de *PAPP* conduce a una variación del crecimiento en comparación con el vector vacío, manteniéndose constante el porcentaje de células a partir del noveno día y disminuyendo a partir de la quincena, por lo que cabe pensar que los MEFs con un aumento de PAPP sufran un envejecimiento prematuro y finalmente se desencadene una parada proliferativa (senescencia).

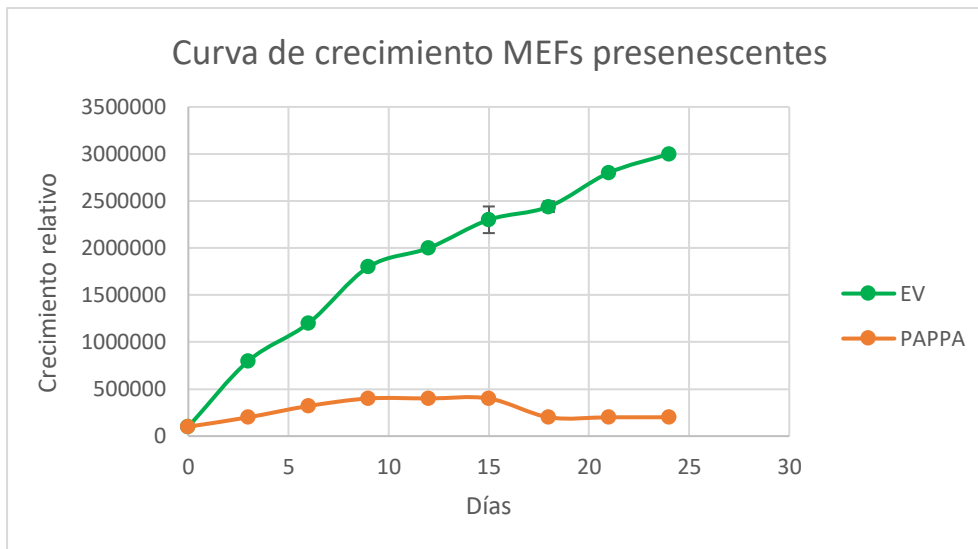


Figura 17: Ensayo de curva de crecimiento en MEFs presenescentes (pase 3) con y sin sobreexpresión de PAPP. Se representa la media de un experimento por triplicado.

SPN ha sido descrita como un supresor de tumores que interacciona con múltiples proteínas. Estudios previos del grupo demostraron la existencia de una interacción física entre SPN y PAPP y el propósito de este estudio era comprobar si dicha interacción podría tener repercusión en sus funciones. En este trabajo, hemos observado que la disminución de los niveles de PAPP mediante la técnica CRISPR en la línea celular tumoral MDA-MB-231 reduce las propiedades tumorigénicas de las células. Sin embargo, la sobreexpresión de SPN en células con bajos niveles de PAPP no parece afectar a dicho resultado. Por otra parte, hemos observado en MEFs inmortalizados SPN (-/-) que la sobreexpresión de PAPP disminuye su crecimiento, mientras que los MEFs SPN (+/+) con sobreexpresión de PAPP no crecen y los MEFs presenescentes que sobreexpresan PAPP entran antes en senescencia que los MEFs control. Por tanto, el efecto de PAPP parece ser independiente a SPN, por lo que PAPP debe tener funciones más allá de su interacción con SPN. En cambio, el efecto de SPN sí parece ser parcialmente dependiente de la presencia de PAPP. Además, tanto la sobreexpresión como la disminución de los niveles de PAPP reducen el crecimiento de las células, por lo que PAPP debe tener un papel dual en proliferación, el cual necesita ser estudiado más en profundidad.

Conclusiones

- ◆ La baja expresión de PAPPA conduce a una reducción de la proliferación, el número de clones y tumoresferas en la línea celular tumoral de mama MDA-MB-231.
- ◆ La sobreexpresión de SPN no parece tener un efecto en las células con baja expresión de PAPPA.
- ◆ La sobreexpresión de PAPPA induce senescencia temprana en fibroblastos embrionarios de ratón presenescentes y disminuye el crecimiento de MEFs inmortalizados que no expresan SPN.
- ◆ PAPPA parece presentar funciones independientes a SPN, mientras que la acción de SPN parece estar sujeta a la presencia de PAPPA.

Bibliografía

- Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84(8): 2302-6.
- Beaver CM, Ahmed A, Masters JR. Clonogenicity: Holoclones and meroclones contain stem cells. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89834.
- Carnero A. Spinophilin: A New Tumor Suppressor at 17q21. *Curr Mol Med*. 2012; 12(5): 528-35
- Conover CA, Oxvig C. PAPP-A and cancer. *J Mol Endocrinol*. 2018; 61(1): 1–10.
- Dontu G, Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003; 36 (Suppl.1): 59-72.
- Ferrer I, Verdugo-Sivianes EM, Castilla MA, Melendez R, Marin JJ, Muñoz-Galvan S, et al. Loss of the tumor suppressor spinophilin (PPP1R9B) increases the cancer stem cell population in breast tumors. *Oncogene*. 2016; 35 (21): 2777–88.
- García-Heredia JM, Verdugo-Sivianes EM, Lucena-Cacace A, Molina-Pinelo S, Carnero A. Numb-like (NumbL) downregulation increases tumorigenicity, cancer stem cell-like properties and resistance to chemotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7(39): 63611-63628.
- Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022; 12: 31–46.
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100, 57-70.
- Huang T, Song X, Xu D, Tiek D, Goenka A, Wu B, et al. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics*. 2020; 10 (19): 8721–43.
- Kasprzak A. Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Signaling in Glucose Metabolism in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(12): 6434.
- Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med*. 2019; 26 (1): 1-77.
- Muñoz-Galván S, Lucena-Cacace A, Perez M, Otero-Albiol D, Gomez CJ, Carnero A. Tumor cell-secreted PLD increases tumor stemness by senescence-mediated communication with microenvironment. *Oncogene*. 2019; 38: 1309–23.
- Park JH, Pyun WY, Park HW. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*. 2020; 9, 2308.

- Sarrouilhe D, di Tommaso A, Métayé T, Ladeveze V. Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie*. 2006; 88 (9): 1099–113.
- Smith YE, Toomey S, Napoletano S, Kirwan G, Schadow C, Chubb AJ, et al. Recombinant PAPP-A resistant insulin-like growth factor binding protein 4 (dBP4) inhibits angiogenesis and metastasis in a murine model of breast cancer. *BMC Cancer*. 2018; 18(1): 1016.
- Torres D, Hou X, Bale L, Heinzen EP, Maurer MJ, Zanfagnin V, et al. Overcoming platinum resistance in ovarian cancer by targeting pregnancy-associated plasma protein-A. *PLoS ONE*. 2019; 14(11): e0224564.
- Verdugo-Sivianes EM, Carnero A. Role of the Holoenzyme PP1-SPN in the Dephosphorylation of the RB Family of Tumor Suppressors During Cell Cycle. *Cancers*. 2021; 13: 2226.
- Verdugo-Sivianes EM, Rojas AM, Muñoz-Galván S, Otero-Albiol D, Carnero A. Mutation of SPINOPHILIN (PPP1R9B) found in human tumors promotes the tumorigenic and stemness properties of cells. *Theranostics*. 2021; 11(7): 3452–71.
- Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, et al. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front. Immunol*. 2020, 11: 1280.