

# El Substrato del receptor de Insulina-4 está sobreexpresado en el cáncer colorrectal y promueve la activación del ciclo celular a través de la vía Rb/E2F.

Patricia Sanmartín Salinas<sup>1,a</sup>, M. Val Toledo Lobo<sup>2</sup>, Fernando Noguerales Fraguas<sup>3,4</sup>, Miguel Toro Londoño<sup>1</sup>, Antonio Jiménez Ruiz<sup>1</sup>, Luis González Guijarro<sup>1,5</sup>

1. Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España. 2. Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Unidad de Biología celular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España. 3. Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España. 4. Departamento de Cirugía general, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, España. 5. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), España.

a. patry.sanmartin@gmail.com

**Palabras clave:** IRS4 nuclear; proliferación celular; cáncer colorrectal; ciclo celular; IRS4

## Resumen

El substrato del receptor de insulina 4 (IRS-4) es una proteína adaptadora muy poco estudiada y la hipótesis que relaciona su función con el desarrollo tumoral cada vez gana más fuerza. Los estudios se llevaron a cabo in vitro (línea celular de cáncer de colon RKO) e in vivo, utilizando biopsias humanas de cáncer colorrectal (n=20) y tejido normal adyacente (n=20). El tratamiento con dosis fisiológicas de IGF-1 produjo una translocación subcelular de IRS-4 desde el citoplasma hacia el núcleo en células RKO. La sobreexpresión de IRS-4 en dichas células dio lugar a un aumento de la proteína fosforilada del retinoblastoma (pRb Ser 809/811 y pRb Ser 705), así como de la expresión de E2F, ciclina E y ciclina D1, comparado con las células control. Algunos de estos cambios fueron parcialmente revertidos al tratar las células con wortmanina. En cuanto a los estudios realizados en las muestras de pacientes con CCR se observó mediante fraccionamiento subcelular una clara sobreexpresión de IRS-4 en el citoplasma, membrana y núcleo, mientras que los niveles de proteína fueron prácticamente indetectables en los tres compartimentos del tejido normal. Estudios inmunohistoquímicos mostraron una tinción nuclear positiva de IRS-4 en el 74% de las células tumorales. La sobreexpresión de IRS-4 en las muestras de pacientes con CCR se correlacionó positivamente y de forma significativa con el incremento de proteínas importantes del ciclo celular como ciclina D1 (r = 0.6662), Rb (r = 0.7779), pRb serina 809/811 (r = 0.6864), pRb serina 705 (r = 0.6261) y E2F1 (r = 0.8702). Nuestros resultados sugieren que el IRS-4 promueve la activación del ciclo celular a través de la activación de la vía Rb/E2F y podría servir como una diana farmacológica dada su sobreexpresión en el tejido tumoral y sus niveles apenas detectables en el tejido normal.

**Cita:** Sanmartín Salinas, Patricia; Toledo Lobo, M. Val; Noguerales Fraguas, Fernando; Toro Londoño, Miguel; Jiménez Ruiz, Antonio; González Guijarro, Luis (2018) El Substrato del receptor de Insulina-4 está sobreexpresado en el cáncer colorrectal y promueve la activación del ciclo celular a través de la vía Rb/E2F. *dianas* 7 (1): e201803a15fp. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e201803a15fp](http://journal.dianas.e201803a15fp). URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** ©2018 Sanmartín-Salinas P, Toledo-Lobo MV, Noguerales-Fraguas F, Toro-Londoño M, Jiménez-Ruiz A, González-Guijarro L. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

El substrato del receptor de insulina-4 (IRS-4) pertenece a una familia de proteínas con función adaptadora, no poseen actividad catalítica intrínseca, pero actúan como proteínas de anclaje iniciando y desencadenando la respuesta intracelular (1). EL IRS-1 y el IRS-2 han sido los dos miembros mejor estudiados y juegan un papel muy importante y no redundante en el crecimiento postnatal y en la regulación del metabolismo en la mayoría de los tipos celulares (2; 3). Una vez que los factores de crecimiento activan los receptores de insulina o IGF-1, los IRSs son rápidamente fosforilados en residuos de tirosina creando sitios de unión para reclutar y activar las cascadas de MAPK y de PI3K (4; 5). En contra, el IRS-4 parece tener un mecanismo de acción específico ya que es capaz de mantener la cascada de la PI3K constitutivamente activa en ausencia de factores de crecimiento (6; 7) y carece de la habilidad para mediar la inhibición de la tirosina fosfatasa SHP-2 (8). Además, el IRS-4 también es capaz de activar ERK, pero de manera independiente a ras/raf/MEK1/2. (9). La desregulación de las cascadas de PI3K y de ERK han sido implicadas en la carcinogénesis de la mayoría de los cánceres humanos, dado que pueden regular la progresión del ciclo celular modulando la proteína del retinoblastoma (Rb) y de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) (10).

Mientras que el IRS-1 y el IRS-2 se encuentran distribuidos de forma ubicua en el organismo (11), la expresión del IRS-4 es mucho más restricta y generalmente los niveles encontrados en los tejidos

normales son muy bajos (3; 12; 13). Hasta el momento la función biológica del IRS-4 se desconoce, pero parece que tiene un papel fundamental en la proliferación celular ya que se expresa en el tejido embrionario (6) y sus niveles suben dramáticamente durante la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial en rata (14).

El cáncer colorrectal (CCR) es el segundo con mayor mortalidad y uno de los más comunes, llegándose a diagnosticar cerca de un millón de nuevos casos cada año en el mundo (15). Hasta la fecha no hay estudios que impliquen al IRS-4 en CCR y muy pocos datos han sido publicados sobre su papel en carcinogénesis. Sin embargo la asociación del IRS-4 con su capacidad para promover la proliferación y el desarrollo tumoral está incrementando continuamente (8). Se le ha relacionado con lesiones proliferativas, tanto benignas [leiomiomas uterinos (16), exostosis subungueal (17)] como malignas [cáncer de mama (6), carcinoma hepatocelular (18), leucemia (19), y cáncer de pulmón (8)]. Recientemente el IRS-4 se ha catalogado como un gen pan-cáncer después del análisis de 7416 genomas de cáncer humano (8) y ha sido asociado con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama tratados con quimioterapia e inmunoterapia (6). El mecanismo oncogénico es desconocido, por ello el objetivo de este estudio es investigar el efecto del IRS-4 en la regulación del ciclo celular en CCR y por lo tanto verificar el papel del IRS-4 en carcinogénesis.

## Materiales y Métodos

### Pacientes y muestras

Las muestras tumorales y los tejidos normales adyacentes correspondientes a 20 pacientes con CCR o adenoma tubulovelloso (AT) procedentes del Servicio de Cirugía del Hospital Universitario Príncipe de Asturias fueron procesadas. Las muestras fueron o bien embebidas en parafina o congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de la cirugía y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En el momento de la cirugía los tumores fueron estadificados siguiendo los criterios de la clasificación patológica TNM. Este estudio fue llevado a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas posteriores. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes para el uso de biopsias con propósito de investigación antes de su inclusión en el estudio.

### Construcción del plásmido y ensayos de transfección

El ADN se extrajo de células RKO usando DNeasy Blood & Tissue kit (Quiagen, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación de la secuencia del IRS4 (3880 nucleótidos) se realizó mediante una PCR de fusión, debido al gran tamaño del amplicón, usando el kit "Pwo DNA Polymerase" de Roche. El vector de expresión se construyó utilizando la secuencia del ADN del IRS-4 amplificada y se incorporó en el vector de expresión pcDNA<sup>TM</sup>3 (Invitrogen<sup>TM</sup>). pcDNA 3.1-IRS-4 y pcDNA 3.1 (control) se transfectaron de forma reversa usando TurboFect (Thermo Scientific®) siguiendo las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos estas células fueron incubadas con wortmanina (200 nM) (20) durante 17 h. 20.

siRNA y los oligos scrambled (control) fueron sintetizados por Dharmacon Research Inc. El silenciamiento se realizó usando lipofectamina (invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Líneas celulares

Las líneas celulares humanas de CCR; HTC116, HT-29, LoVo, Mawi, RKO, RKO E6, Co115, Colo 205, SW48, SW480 y las de cáncer de hígado; HepG2, HuH7, Chang se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en MEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementadas con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de solución antibiótica y antimetabólica a  $37^{\circ}\text{C}$  en un incubador al 5% de  $\text{CO}_2$ . Para estudiar el efecto del IGF-1 en pAKT, las células RKO fueron deprivadas de suero durante 72h y estimuladas con IGF-1 (0, 5, 10, 50 y 100 nM) durante 15 min.

### qPCR

El ARN total fue extraído usando RNeasy Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN genómico fue eliminado usando RNase-free DNase (Quiagen, Valencia, CA, USA). El ARN total (2  $\mu\text{g}$ ) se transcribió de forma inversa a cDNA usando AMV First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) con mezclas de cebadores. La reacción de amplificación por PCR cuantitativa se realizó usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). Las condiciones y los oligonucleótidos usados fueron previamente descritos (18).

### Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica

Las secciones de los tumores colorrectales y los tejidos normales adyacentes fueron fijados al 4% de formaldehído y embebidos en parafina. Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-

IRS-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) y uno monoclonal anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) previamente descritos (21).

Las células RKO fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio. Después de privarlas de suero durante 16 h, se estimularon con IGF-1 (25 nM) y EGF (20 ng/ml) durante 30 minutos. Los cubreobjetos fueron cubiertos con 4% de formaldehído, lavados en PBS, permeabilizados con 0.05% de Triton X-100 y bloqueados durante 10 min con suero de burro (3%). Las células se incubaron con anti-IRS-4 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) y anti-PY99 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) seguido por Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594, respectivamente. El montaje de las preparaciones se realizó con Fluoroshield™ y DAPI (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). La tinción de IRS-4 nuclear y PY99 citosólico fueron comparados en condiciones basales y de estímulo calculando la densidad óptica integrada (IOD) usando image J software (22).

### Extracción proteica

Las células RKO se homogeneizaron con buffer de lisis que contenía (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 5 µg/ml y aprotinina 5 µg/ml), posteriormente se sonicaron y se centrifugaron durante 1h a 100.000 g. Los tejidos colorrectales se disgregaron con buffer de lisis usando técnicas mecánicas. El tejido conectivo se eliminó por centrifugación (660 rpm durante 10 min a 4°C), el sobrenadante se recolectó y se volvió a centrifugar (20.000 rpm durante 3 min a 4°C). El pellet se resuspendió con buffer de lisis más Triton X-100 y se homogeneizó. La extracción de las fracciones nucleicas, de membrana y citosólicas de las células RKO y de los tejidos de CCR se llevó a cabo usando el kit de Calbiochem ProteoExtract Millipore Subcellular Proteome Extraction Kit (Millipore). Las células RKO fueron privadas de suero durante 72h y estimuladas con IGF-1 (25 nM) durante 30 min.

### Ensayos de inmunoprecipitación e inmunoblot

El IRS-4 fue inmunoprecipitado de 500 µg de proteína durante toda la noche a 4°C usando 2 µg de anti-IRS-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (23). Los lisados de células RKO (40 µg de proteína) y los homogenados de cáncer colorrectal (40 µg de proteína) se analizaron por SDS-PAGE y western blot (9). Brevemente, los extractos totales se separaron en geles de poliacrilamida con SDS al 8-10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (9).

### Análisis estadístico

La expresión de IRS-4 e IRS-1 en las distintas líneas celulares se comparó usando el test de ANOVA (una vía). La translocación de IRS-4 después de la estimulación con factores de crecimiento (IGF-1 o EGF) se analizó usando la prueba t student (dos colas). LA expresión de IRS-4 entre los diferentes tejidos de CCR se comparó usando ANOVA (una vía) seguido de corrección de Bonferrini. EL IRS-4 y los niveles de las proteínas de las vías Rb-CDK de células RKO transfectadas y tejidos CCR comprados con sanos adyacentes fueron analizados usando el test t Student (una cola). Las correlaciones entre la expresión de IRS-4 o IRS-1 y las proteínas de las vías Rb-CDK en pacientes con CCR fueron analizadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r). Para cada paciente se obtuvo la diferencia ( $\Delta$ ) entre los valores densitométricos del tejido tumoral y tejido normal. Al menos tres experimentos independientes se obtuvieron de cada resultado. Los niveles de significatividad fueron:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

## Resultados

### El IRS-4 esta sobreexpresado en células de carcinoma hepatocelular (CHC) y de carcinoma colorrectal (CCR)

Los niveles de expresión del IRS-4 fueron evaluados por western blot en un panel de 10 líneas de CCR y 3 de CHC (Fig. 1a). El IRS-4 se detectó en la mayoría de los casos como 3 bandas correspondientes a 160, 140 y 100 kDa. Como mostramos en la Fig. 1a se observa una fuerte expresión de IRS-4 en todas las líneas celulares de CCR muy superior a la de la mucosa del colon normal. Los niveles de expresión del IRS-1 e IRS-4 se analizaron también por qPCR (Fig.1b y c) en RKO, Col15, COLO608 y SW480. Las células RKO mostraron los niveles más altos de IRS-4 tanto de proteína como de ARNm e interesantemente los niveles más bajos de IRS-1. Para evitar lo máximo posible la competición entre IRS-1 e IRS-4 la línea RKO fue escogida para los experimentos sucesivos.

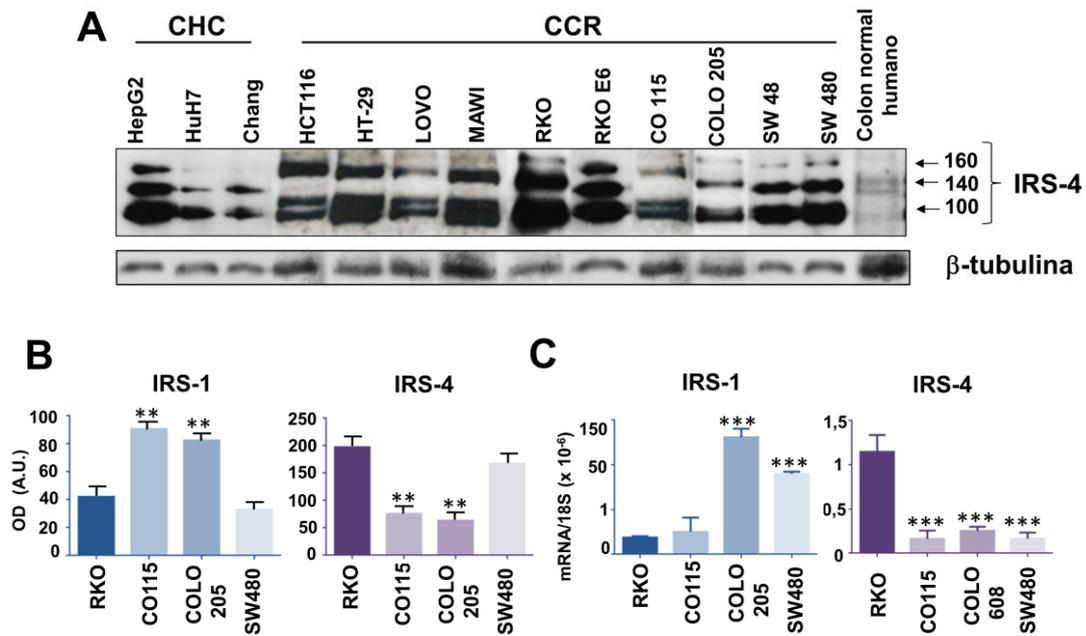


Figura 1.- El IRS-4 esta sobreexpresado en líneas celulares de cáncer de hígado. (A) Western Blot de la expresión de IRS-4 en líneas de cáncer de Hígado (HepG2, HuH7, Chang), colon (HCT-116, HT-29, LOVO, Mawi, RKO, RKO-E6, CO115, COLO205, SW48 y SW480) y en tejido colónico normal humano. (B) Gráficas obtenidas por análisis densitométrico de tres experimentos independientes realizados por western blot. (C) Niveles de expresión de ARNm de IRS-1 e IRS-4 detectados por qPCR (valores relativos al valor de 18s en cada muestra) Niveles de significatividad: \*\*p<0.010; \*\*\*p<0.001. OD densidad óptica, A.U. unidades arbitrarias.

### La estimulación con IGF-1 promueve la translocación del IRS-4 al núcleo

Determinamos la localización subcelular del IRS-4 mediante inmunofluorescencia en condiciones basales y después de un estímulo de 25 nM con IGF-1 o 20 ng/ml of EGF (Fig. 2a) durante 30 minutos. El IRS-4 (verde) se encontró en el citosol y en el núcleo de células deprivadas de suero (Fig. 2a). Después del estímulo con IGF-1, la presencia de IRS-4 incrementó en el núcleo de las células RKO. Sin embargo, el EGF no fue capaz de inducir la translocación nuclear (Fig. 2a). Para confirmar la activación de los receptores de tirosina por IGF-1 y EGF, el mismo procedimiento fue llevado a cabo usando el anticuerpo contra PY99 (rojo) (Fig. 2a). Mediante el programa image j se determinó la densidad óptica integrada (IOD) del IRS-4 nuclear y de los residuos citoplasmáticos de tirosina después de la estimulación con IGF-1 y EGF (Fig. 2b). El IGF-1 incrementó significativamente ( $p<0.01$ ) la localización nuclear del IRS-4 comparado con las condiciones basales, mientras que el efecto del EGF no fue significativo (Fig. 2b). De forma similar los residuos fosforilados en tirosina incrementaron significativamente ( $p<0.01$ ) después del tratamiento con respecto a las condiciones basales (Fig. 2c). Para corroborar la presencia de receptores de IGF-1 funcionales en las células RKO, estas fueron tratadas con diferentes concentraciones de IGF-1 (0, 5, 10, 50 y 100 nM) y los niveles de pAKT se determinaron por inmunoblot (Fig. 2d). El IGF-1 fue capaz de inducir la fosforilación de AKT de una manera dependiente a la concentración ( $EC_{50}=2.5$  nM) mientras que los niveles de IRS-4 se mantuvieron constantes (Fig. 2d).

Para confirmar la translocación del IRS-4 al núcleo, las células RKO se fraccionaron en membrana, citosol y núcleo, antes y después de la estimulación con IGF-1 (25 nM) durante 30 min. En cada fracción subcelular se analizaron los niveles de pAKT, AKT e IRS-4 por inmunoblot. El IRS-4 estaba presente en las tres fracciones, sin embargo el tratamiento con IGF-1 indujo la translocación del IRS-4 desde la fracción citosólica a la nuclear, mientras que no se observó ningún cambio en las cantidades referentes a la fracción de membrana (Fig. 2e). El enriquecimiento nuclear y citosólico se chequeo usando anti-H4 y anti GAPDH respectivamente (datos no mostrados).

### La sobreexpresión del IRS-4 incrementa las vías de señalización del retinoblastoma (Rb) y de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK)

Dado que el IRS-4 se transloca al núcleo después del tratamiento con IGF-1 y en la mayoría de los casos el punto final de la cascada de señalización del IGF-1 es el control del crecimiento y la supervivencia en muchos tejidos, quisimos determinar si el IRS-4 nuclear afectaba a la proliferación celular. Para este fin, transfectamos transitoriamente células RKO con pcDNA-IRS-4 y mediante qPCR y western blot evaluamos su expresión.

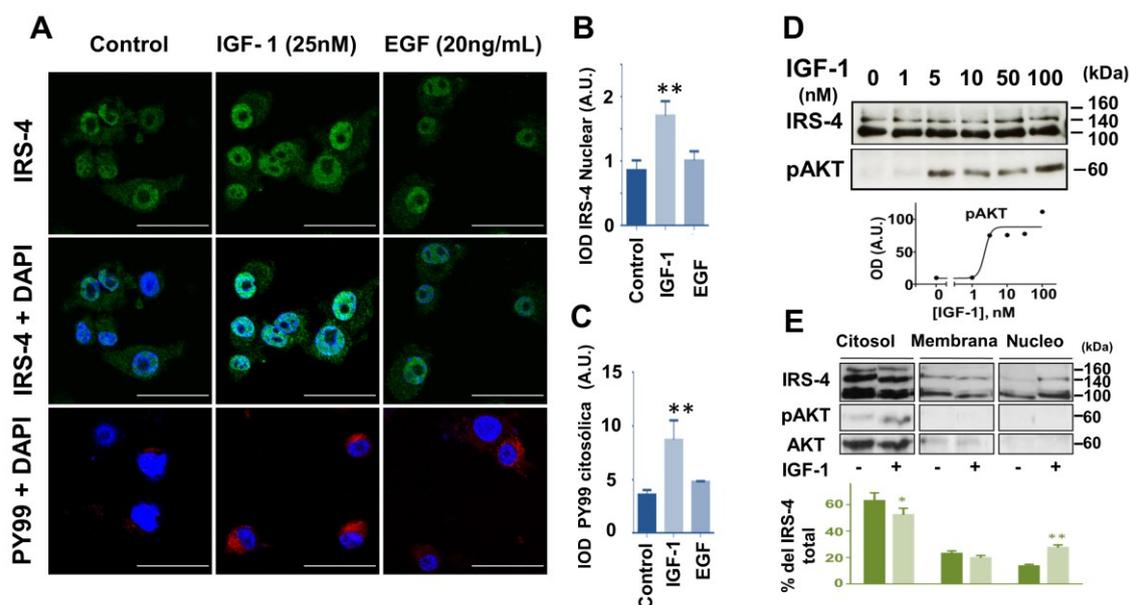


Figura 2.- El tratamiento de células RKO con IGF-1 produce la translocación del IRS-4 al núcleo. (A) Inmunocitoquímica de células RKO tratadas con IGF-1 (25nM) y EGF (20ng/ml) durante 30 min (Escala 50  $\mu$ m). Las células fueron teñidas con anti-IRS-4 (Verde) o anti-PY99 (Rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). (B) Gráfica de la intensidad óptica del IRS-4 nuclear y (C) del PY99 citosólico. (D) Western blot de IRS-4 y pAKT de extractos celulares tratados con diferentes concentraciones de IGF-1. El análisis densitométrico está representado en la parte inferior. (E) Fraccionamiento subcelular y western blot de células tratadas (+) y no tratadas (-) con IGF-1. Niveles de significatividad: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

La sobreexpresión del IRS-4 incrementa las vías de señalización del retinoblastoma (Rb) y de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK)

Se observó que las células transfectadas con pcDNA-IRS-4 presentaban niveles más altos de proteína que las células control (transfectadas con pcDNA). Este efecto fue específico y no afectó a los niveles de IRS-1 (Fig. 3a). Estos resultados fueron corroborados mediante qPCR usando cebadores específicos para IRS-4 e IRS-1 (Fig. 3b). La sobreexpresión de IRS-4 incrementó los niveles basales de pAKT (Ser 473) (Fig. 3a) e inversamente, el silenciamiento de IRS-4 disminuyó los niveles de pAKT (Ser 473) (Fig. 3c). Para evaluar los efectos de estos cambios moleculares asociados a la sobreexpresión y anulación del IRS-4 en la proliferación de las células RKO, determinamos las células viables. Después de 5 días en cultivo, la sobreexpresión de IRS-4 incrementó cinco veces el número de células con respecto a los controles (Fig. 3d). De forma contraria la anulación del IRS-4 redujo en un 30% el número de células viables con respecto al control (Fig. 3e). El incremento de los niveles de IRS-4 produjo un aumento en las cantidades de Ciclina D, Ciclina E, pRb (Ser 809, 801y 705) (Fig. 3f). Interesantemente, el factor de transcripción E2F (la diana principal de Rb) también incrementó en las células que sobreexpresaban IRS-4. Sin embargo la cantidad total de CDK 4, CDK 2, Rb y AKT no cambiaron sustancialmente con el aumento de IRS-4 (Fig. 3f). De forma general el eje pRb/E2F se activó en células RKO bajo el impacto exógeno del IRS-4. La incubación de células RKO pcDNA-IRS-4 con 200nM de wortmanina durante 17 h produjo una inhibición de la fosforilación de Rb, E2F, Ciclina D y E en células control y en aquellas que sobreexpresaban IRS-4. Interesantemente la inhibición de estas proteínas fue menos prominente en las células con altos niveles de IRS-4 (Fig. 3f), indicando que el efecto del IRS-4 sobre el eje Rb-E2F era parcialmente dependiente de la actividad de PI3K-AKT.

El IRS-4 nuclear está aumentado en tejido de cáncer colorrectal.

Analizamos la expresión de IRS-4 en la pared normal del colon, en mucosa normal, en pólipos colónicos y en lisados de RKO. El perfil de bandas del IRS-4 fue muy similar al observado con anterioridad. En el colon normal, los niveles de IRS-4 fueron mayores en el epitelio que en la pared, y los pólipos presentaron mayor cantidad que el tejido normal (Fig. 4a). Veinte pacientes con CCR (n=18) o adenoma tubulovelloso (n=2) fueron analizados mediante inmunoblot e inmunohistoquímica. Para saber la sublocalización celular del IRS-4 y su actividad en el tejido colorrectal, seleccionamos un paciente representativo y se llevó a cabo el fraccionamiento subcelular. El IRS-4 incrementó en el citosol y núcleo del tejido tumoral comparado con el tejido sano adyacente (Fig. 4b). Para medir la activación del IRS-4, los lisados celulares de cada fracción subcelular fueron inmunoprecipitados con anti-IRS-4, seguido de

immunoblot con anti-PY99. Observamos un incremento considerable en la fosforilación del IRS-4 nuclear en el tejido tumoral con respecto al normal (Fig. 4c).

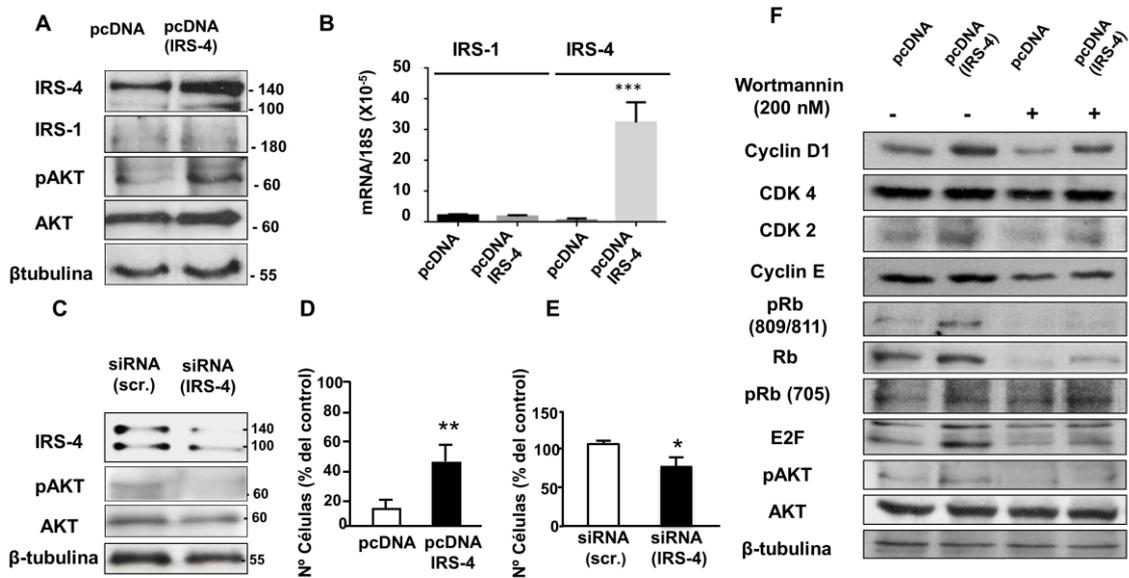


Figura 3.-La sobreexpresión de IRS-4 incrementa los niveles de las proteínas de la vía Rb-E2F.

(A) Western blot de células RKO transfectadas con pcDNA-IRS4. (B) qPCR de IRS-1 e IRS-4 después de la transfección con pcDNA-IRS-4. (C) Western blot de células RKO transfectadas con siRNA-IRS-4. (D) Gráfica que muestra el número total de células viables, antes y después de la sobreexpresión de IRS-4 y (E) de la anulación de IRS-4. (F) Células RKO transfectadas con pcDNA-IRS-4 tratadas o no, con 200nM de wortmanina durante 17 horas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Niveles de significatividad: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Para verificar las diferencias entre la expresión del IRS-4 nuclear en el tejido normal y tumoral, analizamos mediante inmunohistoquímica y la localización subcelular del IRS-4 en todos los pacientes (n=40). Confirmamos la presencia de IRS-4 en el citosol y en el núcleo de las células tumorales. La señal del IRS-4 fue comparada con la de PCNA (un marcador clásico de proliferación celular) en tejido tumoral y normal (Fig. 4d). La señal nuclear para IRS-4 fue positiva en el 74% de las células tumorales, mientras que las células normales solo presentaron el 22% (Fig. 4d). Cuando el mismo método fue aplicado para PCNA, se observó resultados positivos en el 58% de las células del tejido tumoral y un 32% de las células normales (Fig. 4d).

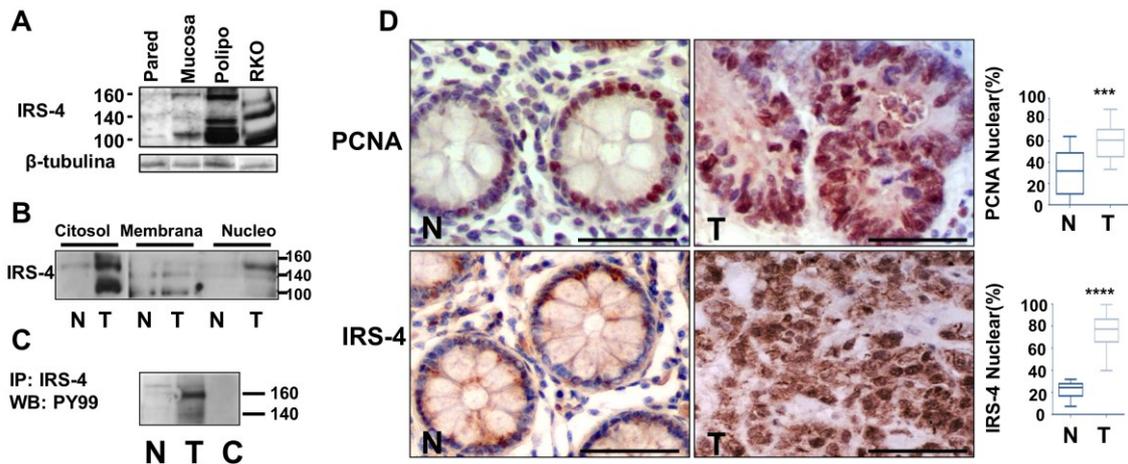


Figura 4.- El IRS-4 nuclear esta incrementado en el tejido tumoral colorrectal. (A) Inmunoblot de IRS-4 de homogenados de pared, mucosa y pólipo colónico. (B) Inmunoblot de IRS-4 del fraccionamiento subcelular de un paciente representativo, GAPDH fue usado como marcador citoplasmático y H4 como marcador nuclear (datos no mostrados). (C) Inmunoprecipitación contra IRS-4 e inmunoblot de PY99 del tejido normal y tumoral de un paciente representativo. (D) Inmunohistoquímica representativa contra IRS-4 y PCNA de tejido normal y tumoral. Escala 50 μm.

A la derecha grafico del % de células con PCNA e IRS-4 nuclear positivo, en el tejido normal y tumoral. Resultados representan la media de ± DS de los 20 pacientes. (Niveles de significatividad: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## Sobreexpresión del IRS-4, del retinoblastoma y de las ciclinas dependientes de quinasas en el tejido de cáncer colorrectal

Examinamos la expresión de IRS-4 y de varias proteínas del punto de control G1 del ciclo celular en 20 muestras de tejido tumoral y normal adyacente. A pesar de las variaciones interindividuales, los western blot realizados mostraron un aumento significativo de IRS-4 en el tejido CCR en comparación con tejido normal adyacente ( $p = 0,0023$ ) (Fig. 5a). Aunque el IRS-1 tiene una tendencia a aumentar en las muestras de CCR, no alcanzó niveles significativos ( $p = 0,2007$ ). Los niveles de ciclina D1 ( $p = 0,0005$ ), CDK4 ( $p = 0,0002$ ), ciclina E ( $p = 0,0030$ ), CDK2 ( $p = 0,0003$ ), pRb (Ser 809/811) ( $p = 0,0037$ ), pRb (Ser 705) ( $p = 0,0043$ ), Rb ( $p = 0,0037$ ) y E2F1 ( $p = 0,0090$ ) fueron significativamente más altos en el tejido CCR comparados con el tejido normal adyacente, tal y como esperábamos (Fig. 5b).

Para estudiar con más detalle la posible asociación entre IRS-4 y las proteínas involucradas en las vías Rb-CDK en pacientes con CCR, realizamos el coeficiente de correlación de Pearson. Para cada paciente, obtuvimos la diferencia ( $\Delta$ ) entre el valor densitométrico de cada proteína en muestras de CCR y tejido normal adyacente ( $n = 20$ ). Como se muestra en Tabla I (material suplementario), las variaciones de los niveles de IRS-4 se correlacionaron significativamente con la ciclina D1 ( $r = 0,6662$ ;  $p = 0,0046$ ), pRb (Ser 809/811) ( $r = 0,6864$ ;  $p = 0,0017$ ), pRb (Ser 705) ( $r = 0,6261$ ;  $p = 0,0047$ ), Rb ( $r = 0,77779$ ;  $p = 0,0002$ ) y E2F1 ( $r = 0,8702$ ;  $p < 0,0001$ ). Sin embargo, no observamos una correlación significativa con CDK4, ciclina E y CDK2. La correlación de las variaciones de IRS-1 con las proteínas del punto de control G1 descritas anteriormente mostraron resultados marginalmente significativos para pRb (Ser 705)  $r = 0,4415$ ;  $p = 0,0434$ ), Rb ( $r = 0,4633$ ;  $p = 0,0353$ ).

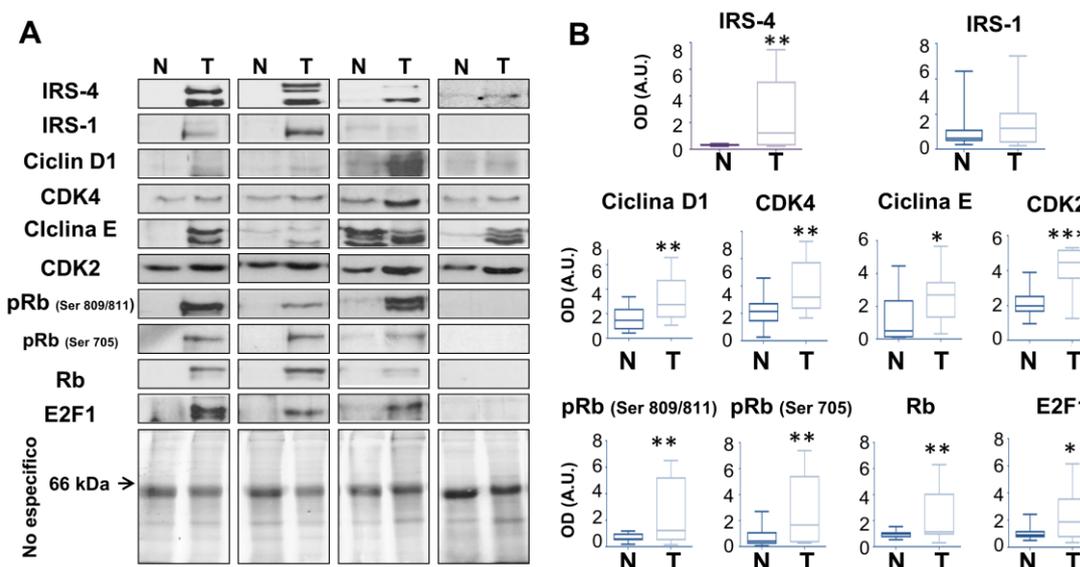


Figura 5.- Regulación positiva del IRS-4 y de la vía Rb-E2F en tejido de cáncer colorrectal. (A) Inmunoblot de IRS-4, y de las proteínas envueltas en la vía de señalización de Rb y E2F en cáncer colorrectal (T) y tejido normal adyacente (N). Como control de la calidad de los homogenados y control de carga se realizó un tinción no específica con azul coomassie. (B) Gráficos obtenidos del análisis densitométrico de los western blots de las proteínas mencionadas en los 20 pacientes. Los resultados representan la media de  $\pm$  DS de los 20 pacientes. (Niveles de significatividad: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

## Discusión

Este documento describe, por primera vez, la regulación positiva del IRS-4 nuclear en líneas celulares de cáncer de colon y en muestras tumorales de pacientes con CCR. La sobreexpresión del IRS-4 en un gran panel de líneas celulares de CCR con respecto al tejido normal, sugiere la importancia del IRS-4 en la transformación oncogénica de estas células. Esta observación ha sido expandida al CCR, en el que describimos un aumento significativo de la expresión de IRS-4 en biopsias de tejido tumoral con respecto al tejido adyacente normal. Interesantemente, conforme el epitelio pierde su estructura glandular, la expresión de IRS-4 aumenta considerablemente, lo que sugiere que esta proteína está directamente relacionada con la diferenciación del CCR. Por otra parte, los niveles de IRS-4 aumentaron con el nivel de T, que se refiere al tamaño y extensión del tumor.

Las proteínas que componen la familia de los IRSs han sido consideradas como proteínas con una localización exclusivamente citoplásmica o de membrana (24; 25). Fantin et al. señaló que el IRS-4 estaba concentrado en la superficie citoplásmica de la membrana con poca o ninguna presencia en los núcleos de células HEK, tanto en estado no estimulado como tratado con insulina (1). En este trabajo, hemos podido confirmar mediante inmunohistoquímica y ensayos de fraccionamiento subcelular que el

IRS-4 también se localiza en los núcleos de células RKO y en biopsias de CCR. Estudios anteriores han indicado que el IRS-1 (26; 27), el IRS-2 (28), el IRS-3 (29) y una versión truncada del IRS-4(7) pueden translocarse al núcleo, al menos bajo algún estímulo oncogénico (antígeno T SV40 o antígeno T JCV o con IGF-1). Además en células HEK 293 observaron un aumento de la expresión de IRS-4, acompañado de proliferación celular tras la infección por el adenovirus 5 E1A (30). El IRS-4 presenta al menos dos señales de localización nuclear (NLS), una dentro del dominio PH y uno en el C-terminal (31), que posiblemente podría conducir su translocación; sin embargo, las señales específicas mediadas por IGF-1 que regulan la translocación de IRS-4 al núcleo se desconocen. Para comprender esta observación, analizamos la expresión de IRS-4 nuclear en biopsias tumorales de pacientes con CCR. Los estudios inmunohistoquímicos mostraron que el IRS-4 nuclear estaba presente en el 74% de las células de CCR, mientras que el PCNA nuclear estaba presente en el 58% de las mismas muestras. En tejido normal adyacente, tanto la expresión de IRS-4 nuclear como de PCNA fue muy baja. El PCNA es una proteína que se une al ADN, es esencial para la replicación celular, y ha sido relacionada con la proliferación y la invasividad de tumores colónicos (32). Los datos mencionados sugieren que el IRS-4 nuclear podría ser relevante en el proceso carcinogénico.

Recientemente, el IRS-4 ha sido catalogado como un gen pan-cáncer, se activa debido a un proceso llamado “enhancer hijacking” que consiste en la sobreexpresión de potenciadores que se encuentran cerca de genes relacionados con el cáncer (8) y además ha sido catalogado como un oncogén en cáncer de mama (6). En este contexto, observamos que la sobreexpresión de IRS-4 en células RKO produjo un aumento en el número de las mismas, que se correlacionaba con el aumento de ciclina D1, E y de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) que conducen la progresión del ciclo celular de fase G1 a fase S y de fase G2 a M. CDK4 y CDK2 interactúan con ciclinas para formar los complejos ciclina D / CDK4 y ciclina E / CDK2 que inducen la fosforilación de Rb, el cual libera E2F, que actúa como factor de transcripción (33). La incubación de células RKO que sobreexpresaban IRS-4 con wortmanina produjo una fuerte disminución en la fosforilación de Rb y en menor medida de los niveles de ciclina E y D, lo que sugiere que el IRS-4 podría regular la vía Rb-CDK-E2F por un mecanismo dependiente de PI3K. Sin embargo, las células que sobreexpresan IRS-4 mantuvieron niveles más altos de ciclinas que las células control (pcDNA) incluso después del tratamiento con wortmanina, por lo tanto, no podemos excluir el efecto directo de IRS-4 nuclear en la expresión de ciclinas. Esta regulación podría ser posible porque, previamente, se ha demostrado que el IRS-1 nuclear (34) y el IRS-2 (35) regulan la actividad del promotor de ciclina D1. La activación transcripcional del promotor de ciclina D1 no ocurre con una versión mutada del IRS-1, la cual carece de su dominio PTB y la cual no requiere actividad PI3-quinasa (34). PTB es un dominio altamente conservado en la familia IRS, incluyendo el IRS-4 (36).

En este estudio, confirmamos una regulación positiva de las proteínas del punto de control G1 en biopsias de CCR, previamente mostrado por Li et al. (37). Concomitantemente con la activación de la vía Rb-CDK en pacientes con CCR, observamos un aumento significativo del IRS-4 en las mismas muestras. Además, cuando comparamos las variaciones de las proteínas IRS-4 y Rb-CDK entre tejido tumoral y normal, vimos una fuerte correlación y significativa (Tabla I, material suplementario). Cuando estas mismas correlaciones estadísticas fueron realizadas entre proteínas Rb-CDK e IRS-1, observamos resultados marginalmente significativos, demostrando así que el IRS-1 está modulado según la diferenciación de CCR, pero sugiere que no es el responsable del proceso de inducción del cáncer (38). Las diferencias entre IRS-1 e IRS-4 pueden explicarse por el hecho de que el IRS-1 es un gen ubicuo con un importante papel fisiológico en la regulación de la glucosa y el metabolismo (11), mientras que el IRS-4 está normalmente silenciado en el tejido adulto (3) y su regulación positiva desencadena procesos proliferativos (9; 14). En conclusión, presentamos pruebas que respaldan la capacidad, ya atribuida al IRS-4, de promover la proliferación celular (8), mostrando además que el IRS-4 nuclear se regula positivamente en CCR y que su expresión está positivamente asociada con las proteínas del ciclo celular del punto de control G1. Se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo de acción de IRS-4 en el desarrollo tumoral. Sin embargo, esta proteína podría catalogarse como una diana farmacológica, ya que su expresión es muy baja en el tejido normal, incluido el epitelio colónico.

## Referencias

1. Fantin VR, Sparling JD, Slot JW, Keller SR, Lienhard GE, Lavan BE. 1998. *The Journal of biological chemistry* 273:10726-32
2. White MF. 1998. *Mol Cell Biochem* 182:3-11
3. Mardilovich K, Pankratz SL, Shaw LM. 2009. *Cell Commun Signal* 7:14
4. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, et al. 1995. *Nature* 377:173-7
5. Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Hadsell DL, Lee AV. 2007. *Cell Cycle* 6:705-13
6. Ikin GJ, Boer M, Bakker ER, Hilken J. 2016. *Nat Commun* 7:13567
7. Hoxhaj G, Dissanayake K, MacKintosh C. 2013. *PloS one* 8:e73327

8. Weischenfeldt J, Dubash T, Drainas AP, Mardin BR, Chen Y, et al. 2017. *Nat Genet* 49:65-74
9. Cuevas EP, Escribano O, Chiloeches A, Ramirez Rubio S, Román ID, et al. 2007. *J Hepatol* 46:1089-98
10. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, et al. 2003. *Leukemia* 17:590-603
11. White MF. 2002. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E413-22
12. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. 2000. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E127-33
13. Numan S, Russell DS. 1999. *Brain Res Mol Brain Res* 72:97-102
14. Escribano O, Fernández-Moreno MD, Zueco JA, Menor C, Fueyo J, et al. 2003. *Hepatology* 37:1461-9
15. Siegel R, Desantis C, Jemal A. 2014. *CA Cancer J Clin* 64:104-17
16. Mehine M, Kaasinen E, Heinonen HR, Mäkinen N, Kämpjärvi K, et al. 2016. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:1315-20
17. Mertens F, Möller E, Mandahl N, Picci P, Perez-Atayde AR, et al. 2011. *Int J Cancer* 128:487-91
18. Cantarini MC, de la Monte SM, Pang M, Tong M, D'Errico A, et al. 2006. *Hepatology* 44:446-57
19. Karrman K, Kjeldsen E, Lassen C, Isaksson M, Davidsson J, et al. 2009. *Br J Haematol* 144:546-51
20. Fiddes RJ, Janes PW, Sivertsen SP, Sutherland RL, Musgrove EA, Daly RJ. 1998. *Oncogene* 16:2803-13
21. Román ID, Cano-Martínez D, Lobo MV, Fernández-Moreno MD, Hernández-Breijo B, et al. 2017. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 22:133-44
22. Ruifrok AC, Johnston DA. 2001. *Anal Quant Cytol Histol* 23:291-9
23. Cuevas EP, Escribano O, Monserrat J, Martínez-Botas J, Sánchez MG, et al. 2009. *J Cell Biochem* 108:1292-301
24. Jacobs AR, LeRoith D, Taylor SI. 2001. *The Journal of biological chemistry* 276:40795-802
25. Razzini G, Ingrosso A, Brancaccio A, Sciacchitano S, Esposito DL, Falasca M. 2000. *Mol Endocrinol* 14:823-36
26. Lassak A, Del Valle L, Peruzzi F, Wang JY, Enam S, et al. 2002. *The Journal of biological chemistry* 277:17231-8
27. Prisco M, Santini F, Baffa R, Liu M, Drakas R, et al. 2002. *The Journal of biological chemistry* 277:32078-85
28. Sun H, Tu X, Prisco M, Wu A, Casiburi I, Baserga R. 2003. *Mol Endocrinol* 17:472-86
29. Kabuta T, Hakuno F, Asano T, Takahashi S. 2002. *The Journal of biological chemistry* 277:6846-51
30. Shimwell NJ, Martin A, Bruton RK, Blackford AN, Sedgwick GG, et al. 2009. *Oncogene* 28:686-97
31. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, et al. 2009. *The Journal of biological chemistry* 284:478-85
32. Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemonia A, Czyzewska J. 2009. *Anticancer Res* 29:3049-52
33. Otto T, Sicinski P. 2017. *Nat Rev Cancer* 17:93-115
34. Wu A, Chen J, Baserga R. 2008. *Oncogene* 27:397-403
35. Wu S, Zhou B, Xu L, Sun H. 2010. *Oncol Rep* 24:1541-50
36. Giovannone B, Scaldaferrì ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, et al. 2000. *Diabetes Metab Res Rev* 16:434-41
37. Li C, Qi L, Bellail AC, Hao C, Liu T. 2014. *Oncol Lett* 7:1673-8
38. Esposito DL, Aru F, Lattanzio R, Morgano A, Abbondanza M, et al. 2012. *PloS one* 7:e36190

## Material Suplementario

### IRS-1

$\Delta$ IRS-1 vs	$\Delta$ Ciclina D1	$\Delta$ CDK4	$\Delta$ Ciclina E	$\Delta$ CDK2	$\Delta$ pRB (ser 809/811)	$\Delta$ pRb (ser 705)	$\Delta$ Rb	$\Delta$ E2F1
r	-0,02327	-0,2442	-0,03819	-0,06897	0,2317	0,4415	0,4633	0,2537
95% de intervalo de confianza	-0,5472 to 0,5138	-0,6724 to 0,3065	-0,5241 to 0,4664	-0,5785 to 0,4793	-0,2983 to 0,6526	-0,06947 to 0,7690	-0,04216 to 0,7800	-0,2769 to 0,6658
R	0,0005415	0,05965	0,001459	0,004756	0,05371	0,1950	0,2147	0,06438
p (una cola)	0,4685	0,1902	0,4442	0,4074	0,1939	0,0434	0,0353	0,1715
p	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns

### IRS-4

$\Delta$ IRS-4 vs	$\Delta$ Ciclina D1	$\Delta$ CDK4	$\Delta$ Ciclina E	$\Delta$ CDK2	$\Delta$ pRB (ser 809/811)	$\Delta$ pRb (ser 705)	$\Delta$ Rb	$\Delta$ E2F1
r	0,6662	0,2069	0,2772	0,1620	0,6864	0,6261	0,7779	0,8702
95% de intervalo de confianza	0,2096 to 0,8843	-0,3417 to 0,6503	-0,2534 to 0,6796	-0,4034 to 0,6378	0,2889 to 0,8820	0,1889 to 0,8561	0,4592 to 0,9192	0,6586 to 0,9543
R	0,4438	0,04281	0,07684	0,02624	0,4711	0,3919	0,6051	0,7573
p (una cola)	0,0046	0,2297	0,1493	0,2900	0,0017	0,0047	0,0002	< 0,0001
p	**	ns	ns	ns	**	**	***	****

Tabla I.- Correlaciones entre  $\Delta$ IRSs y proteínas de la vía  $\Delta$ Rb-E2F en tumores de pacientes con CCR.