



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid

Universidad Francisco de Vitoria
Facultad de Ciencias Experimentales

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Mecanismo de YAP en la
regulación de la
resistencia a vemurafenib
en cáncer colorrectal y
melanoma**



Departamento de Oncología Molecular

Autor: Carmen Mazarío Gárgoles

Directora: María Elena Rodríguez García-Rendueles

Tutor: Víctor Javier Sánchez-Arévalo Lobo

Junio, 2021

ÍNDICE

Abstract	2
Introducción	3
Resistencia terapéutica	6
Objetivo e hipótesis	8
Materiales y métodos	9
Resultados	12
YAP y dependencia	12
YAP y resistencia	21
Discusión y conclusiones	27
Bibliografía	30

ABSTRACT

La resistencia terapéutica es un gran reto en el tratamiento del cáncer. La identificación de genes que pueden predecir la respuesta al tratamiento es clave para diseñar una mejor estrategia terapéutica. YAP es un mediador de resistencia a la terapia anticancerígena. Este oncogén es el último efector de la ruta supresora de tumores HIPPO, está relacionado con un peor pronóstico y es inductor de proliferación y metástasis.

Se ha demostrado que la resistencia a vemurafenib en cáncer de tiroides, colorrectal y melanoma con la mutación BRAF^{V600E}, se debe a varios mecanismos que convergen en un aumento de la actividad de RAS produciendo una re-activación de ERK. Un mecanismo propuesto en cáncer de tiroides es a través de la activación de la ruta HER2/HER3.

El objetivo es investigar el papel de YAP en la resistencia a vemurafenib en tumores colorrectales y de melanoma; bajo la hipótesis de que YAP nuclear confiere resistencia a vemurafenib mediante la activación de HER2/HER3.

En resultados previos se vio que el 52% de las líneas celulares de cáncer tiroideo presentaban YAP constitutivamente nuclear. Las líneas con un fenotipo más agresivo presentaban mayor porcentaje de YAP nuclear. En tejidos de tumores humanos, el 65% tienen YAP nuclear, sin embargo, no existen diferencias por genotipo o fenotipo, a excepción de la variante tall cell con enriquecimiento de YAP nuclear. La expresión YAP^{S127A} en células de cáncer tiroideo con YAP citoplasmático, induce un aumento en proliferación, invasión y resistencia a vemurafenib. Esta resistencia se debe a la activación de la ruta de HER2/HER3. En un sistema no isogénico, las líneas celulares con YAP nuclear tienen una mayor expresión de pHER2/pHER3 comparado con las líneas con YAP citoplasmático.

En líneas de melanoma y colorrectales con YAP citoplasmático, se observa que la expresión de YAP^{S127A} aumenta proliferación e invasión celular. Esta inducción incrementa la resistencia a vemurafenib en la línea de melanoma mientras que no tiene efecto en las colorrectales. En las células de melanoma, YAP^{S127A} sensibiliza a verteporfina y aumenta la resistencia a vemurafenib, mientras que la combinación disminuye la viabilidad celular de manera más efectiva que de forma individual. En la línea de melanoma, la expresión del mutante produce un incremento de los niveles de mRNA de HER2 (*ERBB2*). La inducción de *ERBB2* por vemurafenib aumenta tras la expresión del mutante. Esto indica que YAP induce resistencia a vemurafenib a través de HER2, lo cual no ocurre en las líneas de cáncer colorrectal.

Estos hallazgos indican que líneas de tiroides, melanoma y colorrectales son dependientes de YAP para su viabilidad. Sin embargo, YAP nuclear induce resistencia a vemurafenib únicamente en las líneas de melanoma y tiroides, lo que indicaría un papel de YAP línea-dependiente. Estos resultados muestran a YAP como una posible nueva diana terapéutica para el tratamiento de melanoma y tiroides en combinación con vemurafenib.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de tiroides es el tumor maligno más frecuente del sistema endocrino. Existen diferentes tipos de cáncer de tiroides: diferenciado papilar (PTC), diferenciado folicular (FTC), anaplásico (ATC) y pobremente diferenciado (PDTC). El más frecuente es el carcinoma papilar, el cual constituye el 80-90% de todos los casos diagnosticados (1).

El cáncer de tiroides papilar presenta una tasa de supervivencia elevada (99%) (2). Este tipo de cáncer es tratable mediante cirugía, tiroidectomía, basada en la extirpación de la glándula tiroides. Después de la extirpación puede suministrarse una terapia de hormona tiroidea (levotiroxina), un medicamento que contrarresta la deficiencia de la hormona tiroidea. Otra opción de tratamiento tras la cirugía es el yodo radioactivo, se administra para destruir cualquier resto de tejido tiroideo no extraído durante la cirugía. Este tratamiento también se usa para tratar recidivas o metástasis (3).

Por otro lado, el cáncer de tiroides anaplásico y pobremente diferenciado tienen una menor frecuencia (5-10%), pero son altamente agresivos. La quimioterapia, radioterapia o la cirugía son prácticamente inefectivas, la tasa de supervivencia es menor de 6 meses posterior al diagnóstico, y menos del 10% de pacientes tratados sobreviven a largo plazo (4).

Las personas que padecen melanoma tienen una tasa de supervivencia general a 5 años, desde el momento del diagnóstico inicial, del 95%. Esta supervivencia depende del grosor del melanoma, de la afectación de los ganglios linfáticos y de la posible diseminación del melanoma a sitios distales (5). Por otro lado, en cáncer colorrectal la tasa de supervivencia a 5 años es del 65%. Sin embargo, estas tasas varían dependiendo del estadio, siendo la tasa de supervivencia a 5 años de pacientes con estadio localizado de cáncer colorrectal del 90% (6). Actualmente, el tratamiento para ambos carcinomas es la cirugía. Después de la extirpación, y en caso de metástasis, se administra quimioterapia o radioterapia (5,7)

Una de las rutas más alteradas en cáncer es la ruta de las MAPK, principalmente por mutaciones en: RAS y RAF. La vía MAPK, regula la transcripción de genes implicados en proliferación, diferenciación y supervivencia. La activación de esta ruta comienza a partir de un receptor tirosina quinasa (RTK) de membrana (entre los que destaco EGFR, HER2, HER3) que consta de un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que contiene los dominios con actividad tirosina quinasa.

Brevemente, el RTK activa a una proteína GTPasa monomérica llamada RAS, la cual mediante fosforilaciones y reclutamiento de proteínas adaptadoras activa a la familia de MAPK3 llamadas RAF, que activan a la familia MAPK2 llamadas MEK1/2 y finalmente éstas activan a las MAPK denominadas ERK1/2. Éstas se translocan al núcleo donde se unen a factores de transcripción para regular la expresión de genes relacionados con proliferación. RAS además conecta con la ruta de PI3K/AKT/mTOR, una ruta de supervivencia relacionada con migración celular (Imagen 1). La ruta MAPK/PI3K está muy frecuentemente alterada en cáncer. En células cancerosas cada quinasa puede tener mutaciones que favorezcan la activación o inhibición de diferentes genes y dicha alteración puede ser suficiente para una transformación maligna (1).

Es importante estudiar los diferentes niveles de esta vía y su relación con el descontrol de procesos celulares que pueden desencadenar en tumor.

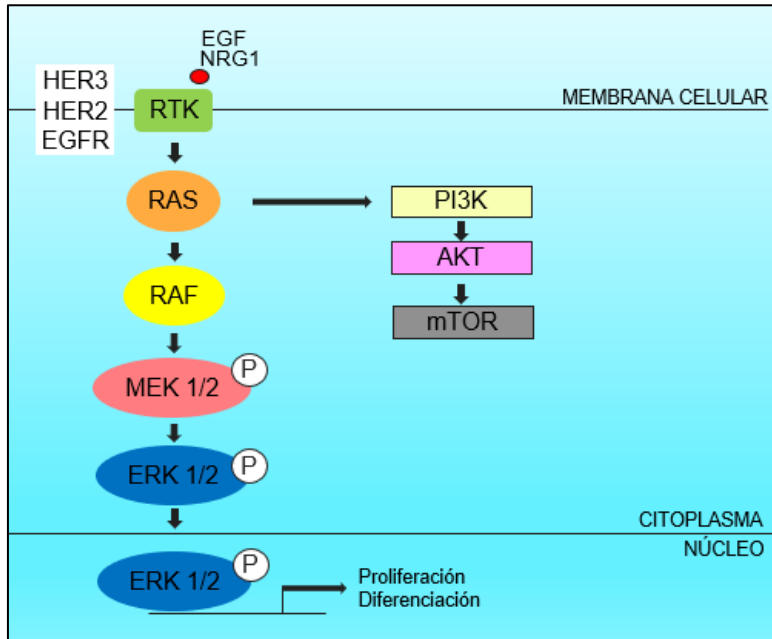


Imagen 1. Esquema representativo de la ruta de MAPK/PI3K.

RAS presenta tres isoformas: HRAS, KRAS y NRAS. Las mutaciones en esta familia de genes son muy frecuentes en cáncer entre 10-30%, sin embargo, muchos tipos de cáncer presentan mutaciones en una isoforma específica. Por ejemplo, en el caso de cáncer de tiroides y melanoma la mutación más recurrente ocurre en NRAS entre un 10-20% (8). En cáncer colorrectal la mutación suele ocurrir en KRAS entre el 22-45% (9).

Por otra parte, tenemos a la familia de quinasas serina/treonina RAF, que incluye tres proteínas: ARAF, BRAF y CRAF. Su actividad esta inducida fisiológicamente por la activación de RAS. Se han encontrado más de 30 mutaciones distintas en BRAF, que varían en actividad biológica, y pueden ser predictivas de diferencias tumorales clínicamente relevantes. La mutación más frecuente presente en alrededor de los 90% de los casos consiste en una sustitución de valina por ácido glutámico en el codón 600, esta es la denominada mutación BRAF^{V600E} la cual genera una ganancia de función. Esta mutación provoca una estimulación constitutiva de la proliferación celular y del crecimiento tumoral, produciendo una mayor agresividad. El silenciamiento farmacológico de BRAF^{V600E} inhibe la activación de la vía de las MAPK y conduce a la reversión del fenotipo maligno (10).

La mutación BRAF^{V600E} es la más frecuente en el cáncer de tiroides entre 23-83% (11), este cambio produce un aumento de la actividad de BRAF, así como también de los efectores de MAPK (MEK, ERK) lo cual incrementa la transcripción de genes implicados en proliferación y apoptosis celular. En melanoma este tipo de mutación está presente aproximadamente en el 50% de los casos (12) y en una proporción menor en carcinomas colorrectales (5-15%) (13).

Se ha descrito, sin embargo, que algunas de estas mutaciones (como por ejemplo RAS) no inician tumorigénesis o progresión tumoral por sí solas, lo que implica que necesiten

colaborar con otros eventos. La búsqueda de estos eventos es crucial para la investigación del cáncer y para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. YAP es el efector último de la ruta HIPPO y se ha descrito como importante oncogén en múltiples cánceres.

La vía de señalización HIPPO es una ruta supresora de tumores evolutivamente muy conservada que está involucrada en múltiples funciones biológicas como supervivencia, homeostasis, diferenciación celular, angiogénesis o regeneración tisular; también está encargada de la regulación de la proliferación celular y apoptosis, restringiendo la proliferación y promoviendo la muerte celular programada. Esta ruta de transducción de señales es una cascada de quinasas serina treonina, que comienza con la proteína supresora de tumores Merlin, codificada por el gen NF2, se encuentra en el citoplasma y presenta función de andamiaje del citoesqueleto de la membrana y de las quinasas de dicha ruta. Ésta produce la activación por fosforilación de la quinasa MST1/2 y ésta a su vez activa a LATS1/2, culminando la señal en el regulador transcripcional YAP (14,15) (Imagen 2).

En las células de tejido sano, en condiciones fisiológicas, la ruta HIPPO se activa por diversas señales (respuesta a mecanotransducción, cambios estructurales, comunicación con células vecinas, cambios en el medio) esto conlleva la activación por fosforilación de las quinasas MST1/2 y LATS1/2, las cuales fosforilan a YAP en la serina en la posición 127. Esta fosforilación retiene a YAP en el citoplasma, bloqueando la transcripción de genes implicados en proliferación celular. Este YAP fosforilado queda marcado para su unión con otras proteínas citoplasmáticas que lo retienen y lo marcan por ubiquitinación para su degradación en el proteosoma (Imagen 2). Cuando la ruta HIPPO se inactiva, YAP no se fosforila y se transloca al núcleo, forma complejo con diversos factores de transcripción y activa la transcripción de genes relacionados con supervivencia, proliferación o genes implicados en procesos de cicatrización asociados con inflamación. La familia de factores de transcripción que más frecuentemente interaccionan con YAP pertenece a la familia TEAD (Imagen 2).

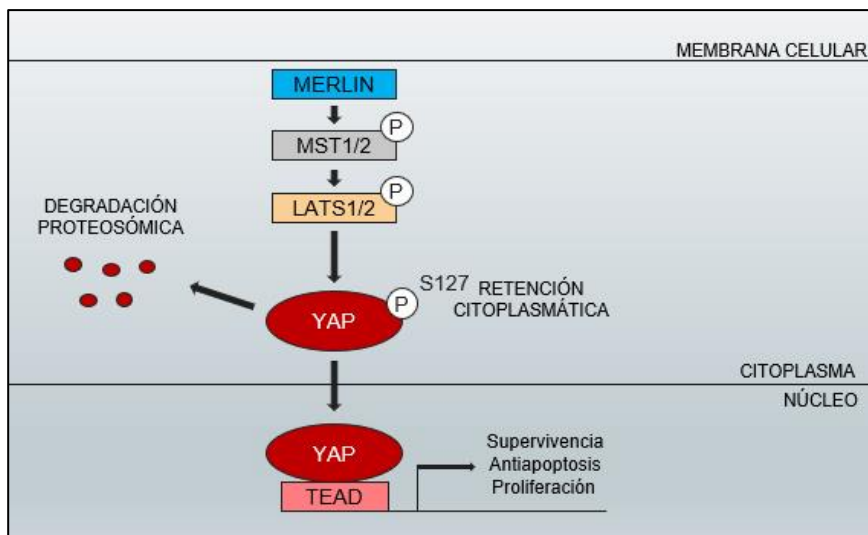


Imagen 2. Esquema representativo de la ruta canónica de HIPPO.

En las células cancerígenas, la vía de señalización HIPPO se encuentra constitutivamente inactivada ya sea por mutación, por inactivación de los componentes de HIPPO o por activación directa de YAP. De esta manera, YAP no es fosforilado y puede translocarse al

núcleo, donde interacciona con diferentes factores de transcripción (principalmente TEAD) y recluta la maquinaria de transcripción de genes específicos pro-proliferativos y anti-apoptóticos. YAP nuclear se ha descrito en múltiples cánceres y su activación induce tumorigénesis, metástasis o promoción de microambiente tumoral (14).

En cáncer de tiroides se ha descrito que la pérdida del cromosoma 22q es muy frecuente y se asocia preferentemente con mutaciones de RAS. Entre los genes que se encuentran en el cromosoma 22q, se centraron en NF2, gen supresor de tumores que codifica para la proteína Merlin, ya que su pérdida de función era frecuente en las líneas celulares de cáncer de tiroides humano. La delección de NF2 o la mutación de RAS son insuficientes por sí solos para la transformación, mientras que su alteración combinada forma tumores (PDTC) debido a una mayor señalización de MAPK. La pérdida de Merlin induce la señalización RAS en parte a través de la inactivación de la ruta HIPPO, que activa el programa transcripcional YAP-TEAD. Se encontró que las tres isoformas de RAS (mutadas y no mutadas) son dianas transcripcionales de YAP-TEAD, lo que proporciona un mecanismo de promoción de la tumorigénesis inducida por RAS. El incremento de la vía MAPK generada por la pérdida de NF2 en cánceres mutantes RAS puede ser clave en la investigación de estrategias terapéuticas (16).

La ruta HIPPO-YAP, es una ruta esencial en melanoma uveal, sin embargo, en melanoma de piel no está muy estudiada, aunque se ha descrito que promueve invasión celular y metástasis espontánea. En tejido de cáncer colorrectal, YAP se encuentra sobreexpresado y promueve proliferación, metástasis y transición epitelio-mesénquima en líneas celulares colorrectales.

Resistencia terapéutica

La resistencia a los medicamentos es un desafío importante en el tratamiento del cáncer. A pesar de la mejora en los resultados del tratamiento para varios tipos de cáncer en la última década, la respuesta completa y sostenida sigue siendo insuficiente debido al desarrollo de resistencias primarias o adquiridas (17). Por lo tanto, la identificación de genes que pueden predecir la respuesta al tratamiento es clave para diseñar una mejor estrategia terapéutica que prevenga la recurrencia del tumor.

Vemurafenib (PLX4032), es un inhibidor de RAF con alta especificidad por la oncoproteína BRAF mutada (V600E). En cáncer de tiroides, melanoma y colon con mutaciones en BRAF, el tratamiento con vemurafenib muestra una profunda respuesta con una disminución del tumor, sin embargo, es casi universalmente seguido con el desarrollo de resistencia a la droga con una reaparición del tumor y de manera más agresiva. La resistencia a vemurafenib se ha descrito que se debe a un incremento de la actividad de RAS induciendo un re-aumento en la expresión de pERK. Los mecanismos de activación de RAS son variados. En cáncer colorrectal se ha atribuido a la activación del receptor EGFR (18).

YAP se encuentra activado en diferentes tumores, juega un papel en la iniciación y progresión tumoral y promueve metástasis. Además, se ha descrito que induce resistencia a diferentes tratamientos como monoterapia con inhibidores, quimioterapia e incluso inmunoterapia. Este oncogén es además, sensor de las características del microambiente celular, un conjunto de señales extrínsecas e intrínsecas asociadas al cáncer anulan el microambiente inhibitor de YAP de los tejidos normales. Por estas razones, YAP representa una diana terapéutica importante (14).

Durante los últimos años está apareciendo la activación de YAP como uno de los mecanismos de resistencia en varios cánceres, especialmente contra inhibidores de EGFR y MAPK. Shalem O. y colaboradores identificaron NF2 buscando genes cuyo silenciamiento a través de CRISPR estuviera implicado en la resistencia a vemurafenib en células de melanoma humano (19). Otros estudios realizaron una búsqueda de todo el genoma con shRNAs e identificaron a YAP como un inductor de resistencia a los inhibidores de MAPK en diferentes tipos de células tumorales humanas con mutaciones BRAF (20-22). Un estudio que evaluó la reaparición del tumor después del silenciamiento del oncogén KRAS en modelos de ratón de cáncer de páncreas, detectó la amplificación del gen YAP en 3/8 de los tumores reaparecidos (23).

Independientemente, otro estudio encontró a YAP como un promotor de supervivencia después de silenciar KRAS en células de cáncer de colon con mutaciones en KRAS (24). Además, la eliminación de YAP fue suficiente para eliminar la resistencia a Selumetinib (inhibidor de MEK) y Mometinib (inhibidor de TBK/JAK) en células tumorales de pulmón con mutaciones de KRAS (25). Por otro lado, AXL (gen cuya expresión transcripcional está directamente regulada por YAP) ha sido descrito como un mecanismo de resistencia a los inhibidores de EGFR y MAPK en cáncer de pulmón y melanoma (26, 27).

En cáncer de tiroides, se descubrió que la resistencia a vemurafenib se debía a un aumento en la ruta NRG1/HER2/HER3 con la consiguiente activación de la ruta de las MAPK (pERK) (18). En resultados previos del laboratorio se ha visto que las células de cáncer tiroideo son dependientes de YAP para su viabilidad. YAP induce formación de tumores, progresión

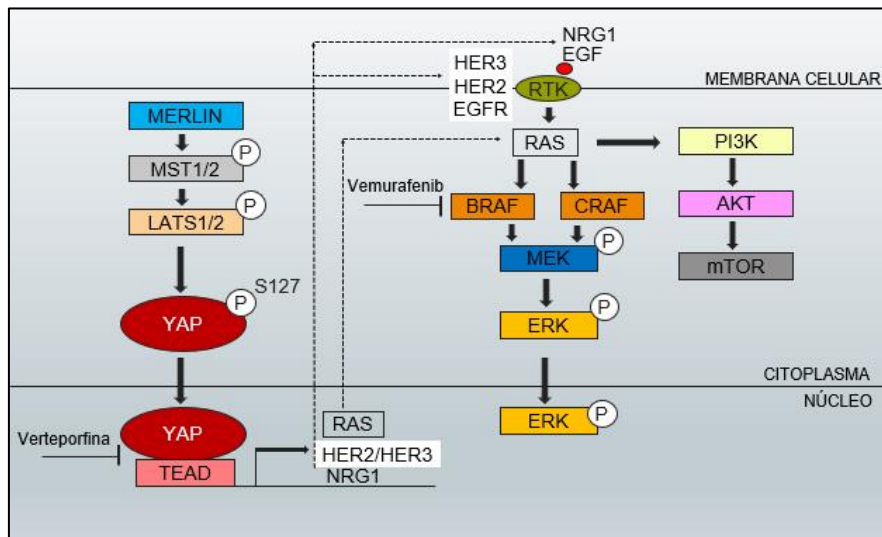


Imagen 3. Esquema representativo de la ruta HIPPO/MAPK/PI3K con los tratamientos inhibidores.

tumoral y metástasis (pulmón y tejido blando). En colaboración con otras mutaciones, como RAS o BRAF, incrementa su agresividad y frecuencia de metástasis y disminuye el tiempo de supervivencia. Así mismo, se ha visto que en líneas celulares de cáncer de tiroides, YAP está implicado en la resistencia a vemurafenib. YAP nuclear aumenta la resistencia al tratamiento mediante la activación de la ruta NRG1/HER2/HER3, lo cual se asocia con la activación de RAS que a través de la vía MAPK resulta en la reactivación de ERK (Imagen 3).

En células de cáncer de tiroides se ha visto que HER3 y HER2 son dianas transcripcionales directas de YAP, se sabe que los dominios TEA tienen sitios de unión a la región promotora de HER3. El ligando de HER2/HER3 es NRG1, cuya expresión también es aumentada por YAP, por lo tanto, el incremento de producción de los receptores como de su ligando provoca una mayor activación de esta ruta. Un tratamiento combinado con inhibidores de YAP y HER2/HER3 o RAF inducía una mayor respuesta que cada uno de manera individual.

Objetivo e hipótesis

El objetivo de este trabajo es ver si el resultado de que YAP induce la resistencia a vemurafenib encontrado en cáncer de tiroides, se aplica a otro tipo de cánceres BRAF mutados como melanoma o colorrectal.

La hipótesis es que la presencia de YAP modularía la respuesta a vemurafenib en estos tumores. La inducción del mutante de YAP^{S127A} en líneas celulares de melanoma y colon aumentaría la resistencia a vemurafenib mediante la activación transcripcional de NRG1/HER2/HER3-MAPK con el consiguiente aumento de la expresión de pERK.

Para ello, se estudió la localización constitutiva de YAP en líneas de cáncer colorrectal y de melanoma. En un contexto fisiológico, la localización de YAP se regula por la concentración de células, mecanotransducción y rigidez celular. En un medio proliferativo, donde las células están separadas, YAP se encuentra en el núcleo; cuando las células llegan a confluencia, YAP se transloca al citoplasma. En condiciones no fisiológicas, en cáncer, YAP se encuentra en el núcleo independientemente de la confluencia celular. Mediante una inmunofluorescencia de YAP en condiciones de alta y baja confluencia celular, se transfectaron con el mutante YAP^{S127A}, que no puede fosforilarse en el residuo S127 y se transportará al núcleo, aquellas que presentaban YAP en el citoplasma. Luego realicé experimentos de dependencia a YAP (ensayos de crecimiento e invasión) y comprobé si la inducción de YAP^{S127A} incrementaba la resistencia a vemurafenib mediante la activación de la ruta NRG1/HER2/HER3. Para ello, realicé estudios de crecimiento con concentraciones crecientes de vemurafenib (IC50) y qRT-PCRs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas

PXL4032, vemurafenib, inhibidor específico de BRAF. Verteporfina, inhibidor del complejo YAP-TEAD. Ambas drogas se disolvieron en DMSO.

Cultivos celulares

Líneas celulares humanas de melanoma (Sk-Mel-28), colorrectales (Colo-205, Lim-2405, RKO) infectadas de manera estable con lentivirus pLVX-YAP^{S127A} (sistema TetON) inducido por doxiciclina. Las células se seleccionaron y se mantuvieron en cultivo con puromicina (1ug/mL) y geneticina (300ug/uL). Las líneas celulares de cáncer se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂, se cultivaron en medio de crecimiento RPMI 1640 (Sk-Mel-28 S127A, Colo-205 S127A, Lim-2405 S127A), DMEM (RKO S127A) complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), l-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomicina.

Plásmidos lentivirales pLVX- YAP^{S127A}

Para la expresión del mutante YAP^{S127A}, se utilizó un sistema de dos vectores lentivirales. El primer plásmido presenta el sistema TetON inducible y tiene resistencia al antibiótico puromicina que permite seleccionar aquellas células que han incorporado dicho plásmido. Está formado por un promotor y el activador de la transcripción, rtTA (proteína reversa tet transactivadora) dependiente de doxiciclina. En presencia de doxiciclina, rtTA se expresa y se une a TRE (elemento de respuesta a tet) presente en el segundo plásmido que contiene la secuencia de YAP^{S127A}, situado anterior al promotor, lo activa y se produce la transcripción del gen. Esta mutación de YAP se basa en que la posición 127 sufre el cambio de una serina por una alanina, al no poder ser fosforilado en el citoplasma por las quinasas de la ruta HIPPO, se transloca al núcleo por la vía canónica. Este plásmido presenta resistencia a geneticina (Imagen 4).

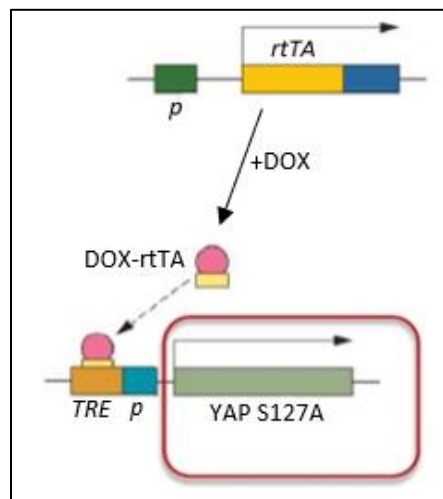


Imagen 4. Esquema representativo de plásmidos lentivirales pLVX-YAP^{S127A} (Sistema TetON).

Ensayos de crecimiento celular

Para los ensayos de crecimiento celular, las células se sembraron por triplicado en placas de 24 pocillos a 2×10^4 células/pocillo y se cultivaron en medio complementado con 1% FBS, y se trataron con y sin doxiciclina ($2\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 6 días con cambio de medio cada 3 días.

El ensayo de dosis respuesta, las células fueron tratadas con DMSO (vehículo) y con concentraciones crecientes de vemurafenib (0, 5, 500, 2000 nM). En el ensayo con tratamiento combinado se trataron con DMSO, vemurafenib (1000 nM), verteporfina (500 nM) y vemurafenib/verteporfina (1000nM/500nM respectivamente). Las células se recogieron mediante tripsinización y se contaron en cámara de Neubauer.

Ensayo de invasión: Cierre de herida

Las células se sembraron por triplicado en placas de 6 pocillos a 3×10^5 células/pocillo y se esperó a que llegaran a confluencia. Una vez en confluencia se abrió una herida con la punta de una pipeta, se lavó con PBS y se cambió el medio a medio 1% de FBS con y sin doxiciclina ($2\mu\text{g}/\text{mL}$). Se tomaron fotografías a las 0, 24 y 48 horas. El área abierta se calculó mediante el programa ImageJ.

Extracción y cuantificación de RNA

El RNA se extrajo utilizando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Inc) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su próximo uso.

La cuantificación de RNA extraído se realizó con el espectrofotómetro Nanodrop con el que se midió la concentración y la pureza en $1,8\ \mu\text{l}$ de las muestras extraídas. La pureza de la muestra se evaluó según los ratios 280/260, descartando aquellas muestras con baja concentración y/o ratios bajos.

RT-PCR y qRT-PCR

El RNA aislado congelado ($2\mu\text{g}$) se retrotranscribió a cDNA usando la transcriptasa inversa Multiscribe™ (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se realizó una qRT-PCR con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y con los primers correspondientes (Tabla 1). La expresión se analizó con Comparative CT y Melt Curve.

Primers

Gen	Fw: 5'-3'	Rw: 5'-3'
hACTINA	ATGATGATATCGCCGCGCTC	TCGATGGGGTACTTCAGGGT
hYAP	GCTCTTCAACGCCGTCAT	GAGAAACAGCTCCCAACTGC
hERBB2	ACACAGCGGTGTGAGAAGTG	AACACTTGGAGCTGCTCTGG
hERBB3	GATGGGGAACCTTGAGATTG	GGCAAACCTTCCCATCGTAGA
hNRG1	CGGTGTGAAACCAGTTCTGA	TCCAGAATCAGCCAGTGATG
h: humano		

Tabla 1. Secuencias de primers para qRT-PCR.

Extracción de proteínas e inmunotransferencia

Las proteínas se extrajeron con el buffer “Mg²⁺ Lysis Buffer” de Sigma. La concentración de proteínas se determinó utilizando BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para el western-blot se cargaron 20 µg de proteína, se separaron en geles Tris SDS-PAGE al 10%, y, se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon en leche desnatada al 5% en TBS-Tween durante 2 horas. La hibridación con los anticuerpos primarios se realizó durante 1 hora en 5% de leche a temperatura ambiente. Tras 4 lavados con TBS-Tween las membranas se hibridaron con los correspondientes anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 2). Se lavaron 4 veces con TBS-Tween. Todas la incubaciones y lavados se realizaron en agitación constante. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia con el sistema de detección ECL (Bio-Rad).

Anticuerpos primarios			
Proteína	Referencia	Concentración	
pHER3	#4561S. Cell Signaling	1:1000	Rabbit
pHER2	#2243L. Cell Signaling	1:1000	Rabbit
YAP1	#4912. Cell Signaling	1:1000	Rabbit
Actina	A2228. Sigma	1:3000	Mouse
Anticuerpos secundarios			
	Referencia	Concentración	
Anti-Rabbit	#7074. Cell Signaling	1:20000	
Anti-Mouse	#7076. Cell Signaling	1:40000	

Tabla 2. Relación de anticuerpos.

Inmunofluorescencia

Las células se sembraron por triplicado sobre cubreobjetos redondos colocados previamente en placas de 24 pocillos a 2×10^4 células/pocillo, se cultivaron en medio con 1% FBS. Se trataron con y sin doxiciclina (2µg/mL) durante 3 días. Las células se fijaron con metanol frío durante 10 minutos y después con 1,6% de paraformaldehído durante 20 minutos. Las células se permeabilizaron con 0,1% de triton (10 minutos) y se bloquearon con 5% de BSA. Se incubó a 4°C durante toda la noche con el primer anticuerpo YAP (1:100). Se lavaron varias veces con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo Alexa 594R (1:500) durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, los cubreobjetos con las células se colocaron con medio de montaje en los portas. Se observó y fotografió en un microscopio de fluorescencia.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba t-Student. Los gráficos representan el valor medio y las barras de error representan la desviación estándar (GraphPad Software). El p-valor se presenta en las leyendas de las figuras donde *p-valor≤0,05 se consideró estadísticamente significativo, seguido de **p-valor≤0,01; ***p-valor≤0,001.

RESULTADOS

YAP Y DEPENDENCIA

En cáncer de tiroides, YAP se encuentra frecuentemente en el núcleo de manera constitutiva.

Previamente en el laboratorio realizaron un cribado de 52 líneas celulares de cáncer de tiroides para estudiar la localización constitutiva de YAP (células crecidas a alta densidad celular). La localización de YAP se regula por densidad celular, en medio proliferante y en baja densidad celular YAP se encuentra en el núcleo, cuando las células llegan a confluencia, en condiciones fisiológicas YAP se transloca al citoplasma, sin embargo, en condiciones no fisiológicas (cáncer) YAP se mantiene en el núcleo de manera aberrante. Observaron que 27/52 (52%) líneas celulares tenían localización de YAP nuclear. Todas las líneas celulares que albergaban mutaciones en la vía HIPPO mostraron YAP constitutivamente nuclear. Las líneas celulares derivadas de tumores diferenciados tenían localización de YAP citoplasmático: FTC 100%, PTC 61,5%. Por otro lado, el 65% de líneas celulares derivadas de ATC-PDTC tenían YAP nuclear, la mayoría de las cuales no presentaban alteraciones en la vía HIPPO (Figura 1A). Este resultado sugería a YAP como posible marcador de prognosis.

Realizaron una tinción de YAP en muestras de tejido humano de PTC, PDTC y ATC. Encontraron que el 65% de pacientes tenían localización nuclear de YAP, sin embargo, no encontraron diferencias en el porcentaje nuclear de YAP entre los diferentes fenotipos (Figura 1B).

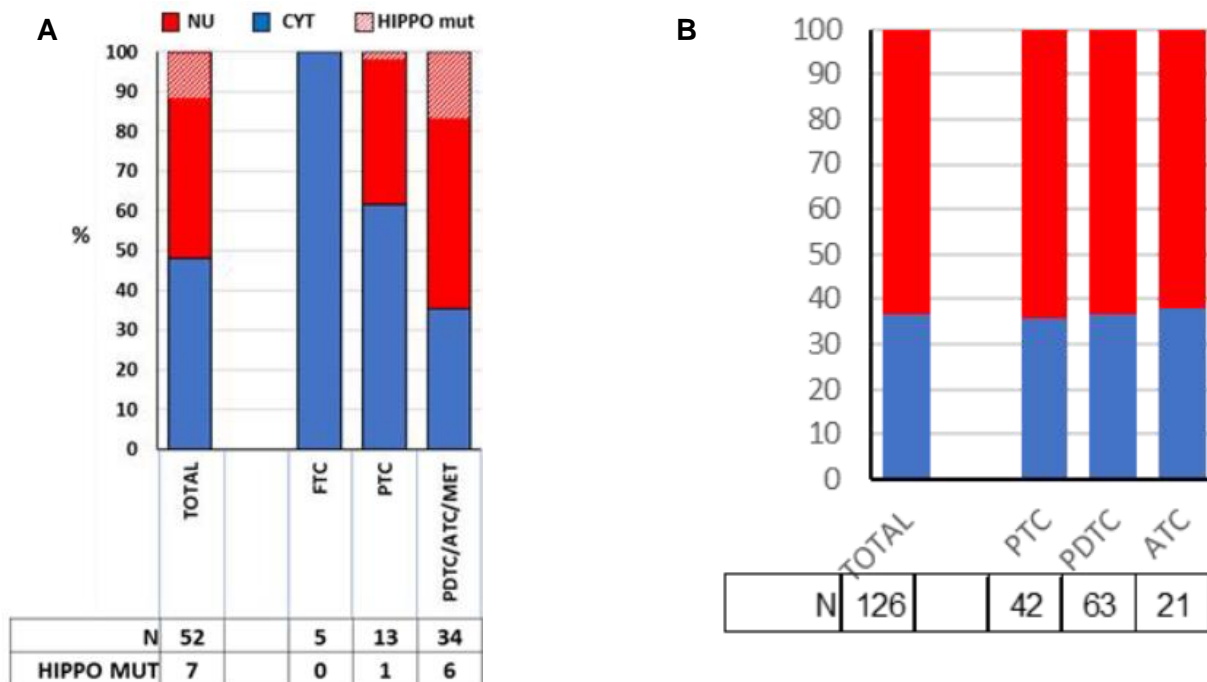


Figura 1. YAP se localiza frecuentemente en el núcleo de manera constitutiva en cáncer de tiroides.

A. Se muestra el porcentaje de líneas celulares humanas derivadas de los subtipos histológicos de cáncer de tiroides indicados con YAP constitutivamente nuclear. **B.** Se indica la positividad nuclear de YAP en microarrays de tejido de muestras quirúrgicas de cáncer de tiroides.

Enriquecimiento de YAP nuclear en la variante celular tall cell en todos los tipos tumorales.

Debido a este inesperado resultado, buscamos otro tipo de correlaciones, para ver si existía un enriquecimiento de YAP nuclear dependiendo de la mutación tumoral en los diferentes subtipos tumorales, en tumores metastásicos, etc.

Para ello utilicé dos clasificaciones: Hscore ($=0*\text{neg}+1*\text{weak}+2*\text{moderate}+3*\text{strong}$), un indicador en el que se tiene en cuenta la intensidad de la tinción de YAP nuclear, y otra en la que consideré como resultado positivo cuando más del 80% de las células presentaban tinción de YAP nuclear.

De la misma manera que en líneas celulares, no encontré diferencias significativas en enriquecimiento de YAP nuclear por genotipo (Figura 2), parece que existe una tendencia a que los tumores con BRAF presentaban mayor YAP nuclear.

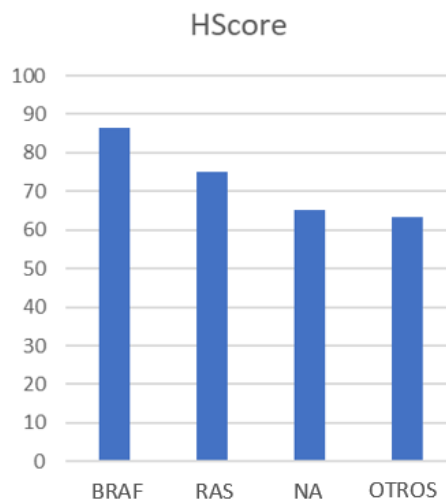


Figura 2. Se muestra la media de los valores de Hscore de YAP nuclear por genotipo.

Los PTCs se separaron según los subtipos papilar, tall cells, columnar y folicular y se relacionó con la mutación BRAF^{V600E}. El subtipo folicular o columnar sólo estaba representado por una muestra por lo que no se puede sacar ninguna conclusión. Observé que el subtipo tall cell presentaba un mayor Hscore que el subtipo papilar, lo que indicaba que la variante tall cells (más agresiva que la papilar) tenía un mayor enriquecimiento de YAP nuclear en comparación con el fenotipo papilar.

Todas las muestras tall cells presentan la mutación BRAF^{V600E}, con un alto Hscore. La mitad de los tumores de la variante papilar presentaban la mutación BRAF^{V600E}, éstos tenían un mayor valor Hscore comparado con los no mutados. La muestra folicular no presenta mutación en BRAF^{V600E}, la muestra de variante columnar presenta mutación BRAF^{V600E} con un valor relativamente bajo de Hscore. (Figura 3).

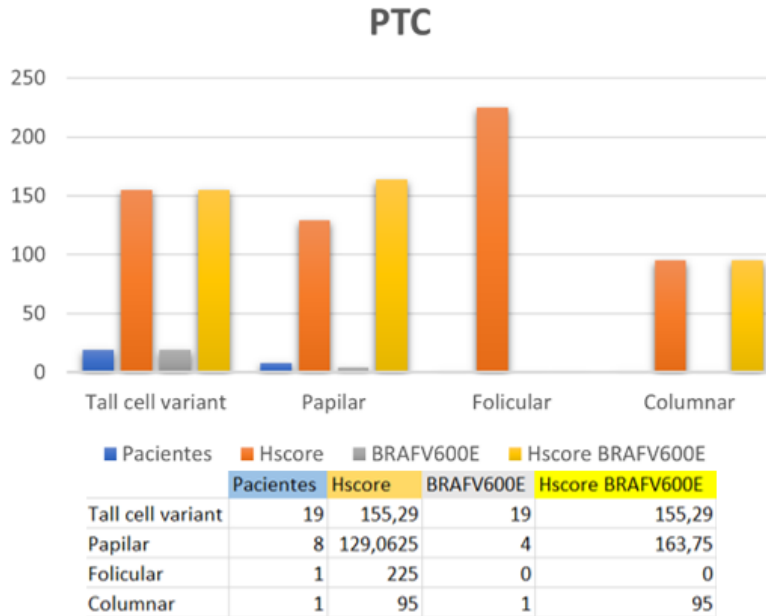


Figura 3. Se indica el Hscore de YAP nuclear por variante y por mutación BRAF^{V600E} en tumores PTC.

En PDTC, las células con fenotipo papilar presentan unos niveles de Hscore mayores que los niveles de las células foliculares y Hurtle, esto indica un enriquecimiento de YAP nuclear en las células papilares. La única variante que presentaba mutaciones en BRAF^{V600E} en este tipo de cáncer era papilar y sus niveles de Hscore eran elevados. Estos resultados podrían indicar una relación entre YAP-BRAF. A pesar de esto, es importante destacar que el número de muestras que presenta dicha mutación es bajo y sería necesario investigar en un mayor número para obtener unos resultados más significativos (Figura 4).

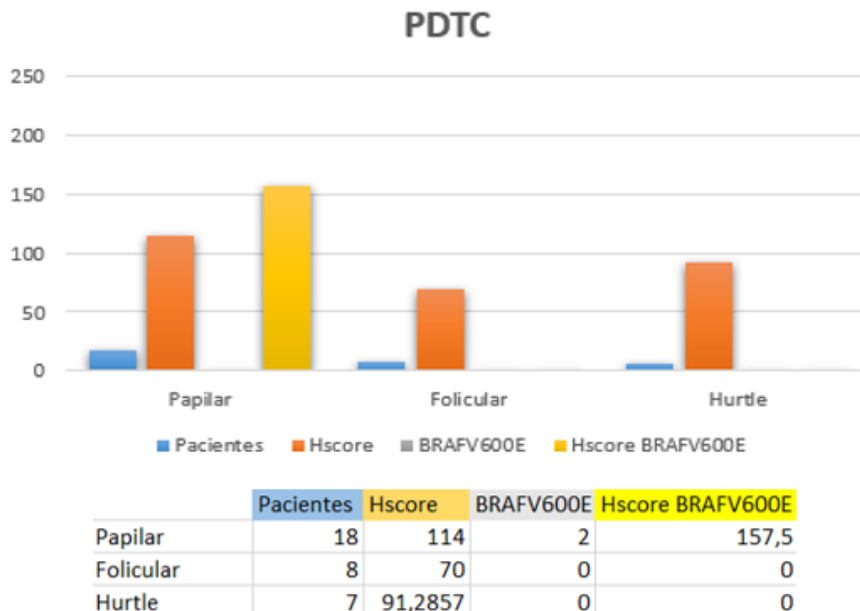


Figura 4. Se indica el Hscore de YAP nuclear por variante y por mutación BRAF^{V600E} en tumores PDTC.

En ATC no hay presencia de variante folicular, pero sí papilar, tall cells, células de fenotipo desconocido y una variante mixta.

A nivel fenotípico, los niveles de Hscore en la variante papilar eran menores en comparación con tall cells, por lo que éstas presentaban mayor enriquecimiento de YAP nuclear. Por mutación BRAF, todos los tumores de la variante tall cell presentaban BRAF^{V600E}, 3/4 de la variante papilar tenían BRAF^{V600E}. Los tumores de la variante papilar con mutación BRAF presentaban un menor Hscore que las no mutadas. La muestra de fenotipo mixto también presentaba la mutación. Sólo una muestra de las células de fenotipo desconocido tenía mutación BRAF, con un bajo Hscore. Habría que aumentar el número de pacientes con esta variante para poder sacar alguna conclusión (Figura 5).

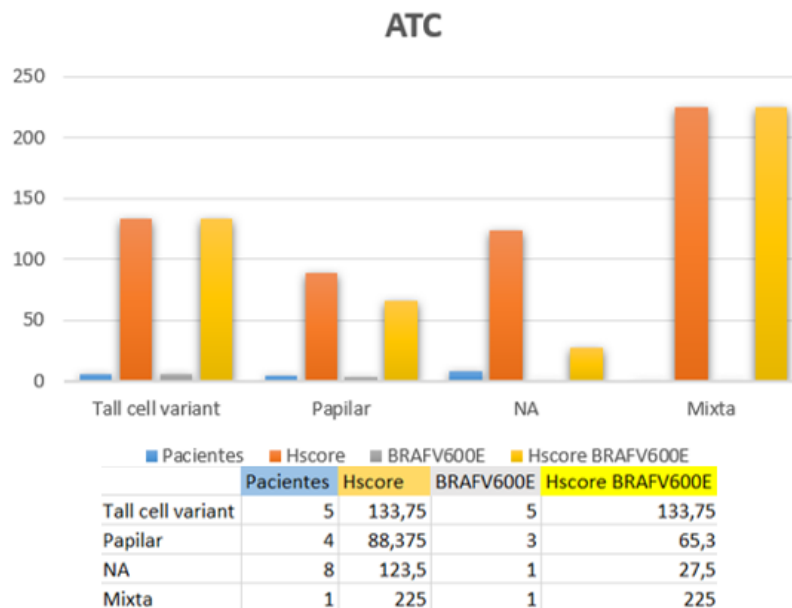


Figura 5. Se indica el Hscore de YAP nuclear por variante y por mutación BRAF^{V600E} en tumores ATC.

Utilizando la segunda clasificación: resultado positivo cuando más del 80% de las células presentaban tinción de YAP nuclear, descubrí que YAP nuclear se encontraba más frecuentemente en tumores con mutaciones en RAS o BRAF, sin diferencias entre ellas (Figura 6). De manera más clara que con la clasificación Hscore, se observó que la variante tall cell es la que presentaba un mayor enriquecimiento de YAP nuclear en todos los tipos tumorales (PTC, PDTC y ATC) en comparación con la variante papilar (Figura 7A y 7B). 20 de los 24 tumores con la variante tall cell (83,33%) presentaban YAP nuclear, mientras que sólo el 50% (6/12) de los tumores con la variante papilar o el 63% en las demás variantes lo presentaban (Figura 8).

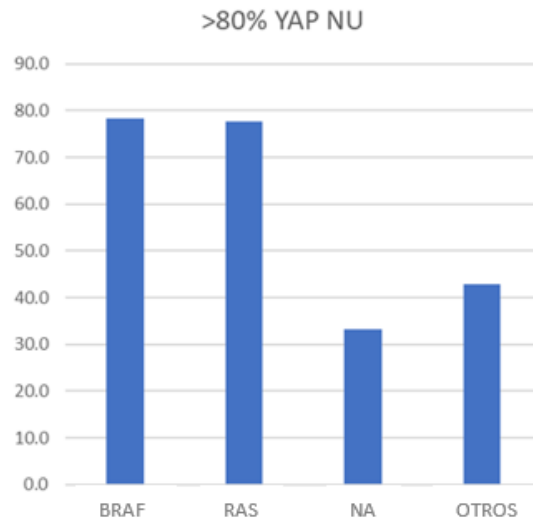
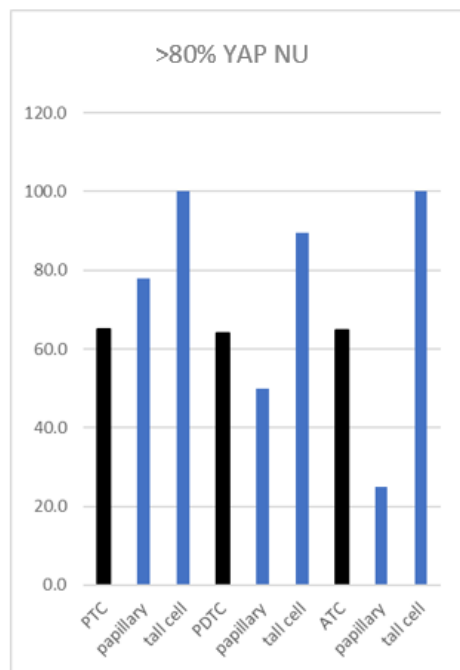


Figura 6. Porcentaje de tinción YAP nuclear (positiva >80%) en diferentes mutaciones.

A



B

	N total	N pos	%
PTC	40	26	65.0
papillary	9	7	77.8
tall cell	1	1	100.0
PDTC	64	41	64.1
papillary	26	13	50.0
tall cell	19	17	89.5
ATC	17	11	64.7
papillary	4	1	25.0
tall cell	4	4	100.0

Figura 7. Porcentaje de tinción YAP nuclear (positiva >80%) en PTC, PDTC y ATC.

A. Representación del porcentaje de tinción YAP nuclear (positivo >80%) por tumores PTC, PDTC y ATC y sus correspondientes variantes. **B.** Tabla indicando el número total, número positivo y porcentaje de muestras con >80% de las células con tinción de YAP nuclear. La tabla corresponde con la gráfica A.

En conclusión, la presencia de YAP nuclear es frecuente en tumores de tiroides humanos, sin embargo, no encontré diferencias por genotipo o fenotipo a excepción de un claro enriquecimiento de YAP nuclear en la variante tall cell. El significado clínico de este hallazgo se desconoce.

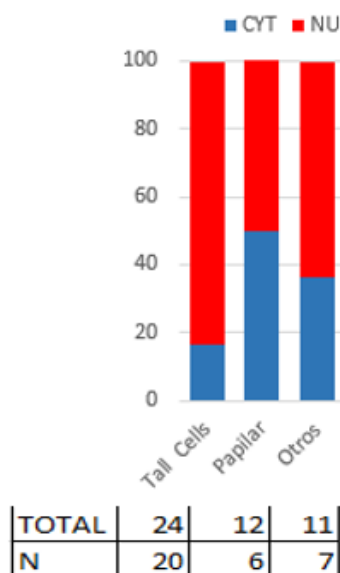
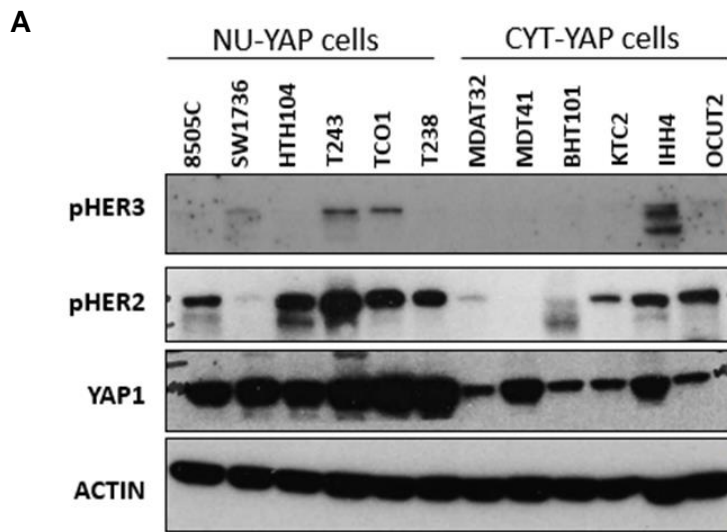


Figura 8. Niveles de YAP nuclear en variantes celulares.

Las líneas tiroideas con YAP nuclear presentan mayor expresión de pHER2 y pHER3.

Resultados previos en el laboratorio mostraban que el silenciamiento de YAP (shYAP) inducido por doxíciclin, reducía la expresión de HER2, HER3 y NRG1 a nivel de RNA y de proteína. Así mismo, se observó una reducción en los niveles de pHER2 y pHER3. Por el contrario, la inducción por doxíciclin de la expresión del mutante de YAP^{S127A} en células de cáncer tiroideo humanas con YAP en el citoplasma, inducía la activación de la ruta de NRG1/HER2/HER3.

Lo siguiente fue comprobar en un sistema no isogénico la expresión de pHER2 y pHER3 comparando líneas celulares de cáncer tiroideo con YAP constitutivamente en el núcleo con líneas con YAP en el citoplasma. Para ello realicé un western blot (Figura 9A) y observé que 3/6 líneas celulares con YAP nuclear tienen una elevada expresión de pHER3 comparado con 1/6 líneas con YAP en el citoplasma (IHH4, el aumento en la expresión de pHER3 podría deberse a rutas no relacionadas con YAP). En el caso de pHER2, 5/6 líneas con YAP en el núcleo presentan una elevada expresión de pHER2 comparado con 2/6 líneas con YAP en el citoplasma. La expresión de YAP es claramente mayor en las células con YAP nuclear. YAP, aunque está presente en las líneas con YAP en el citoplasma, puede estar sujeto a la degradación por proteosomas. Realicé la cuantificación del western blot (Figura 9B) y la expresión de pHER2 y YAP es significativamente mayor en las líneas cancerosas de tiroides humanas con YAP nuclear.



B

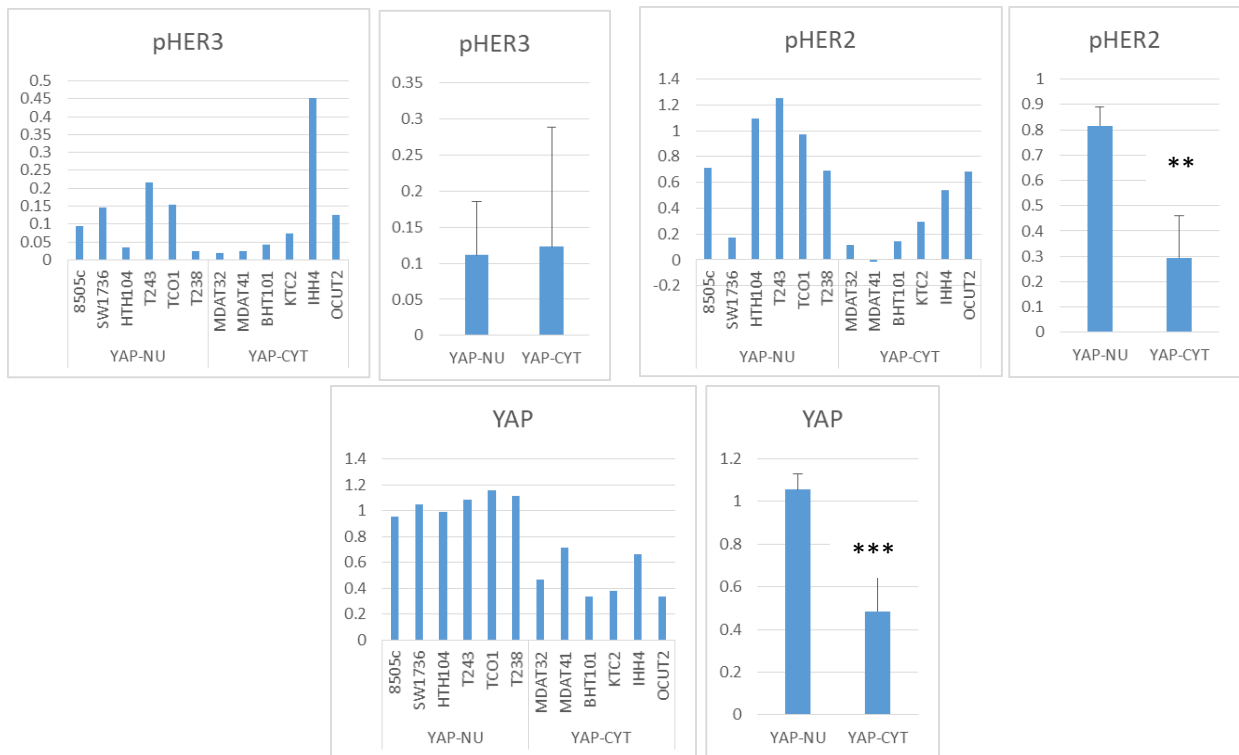


Figura 9. Las líneas tiroideas con YAP nuclear presentan mayor expresión de pHER2 y pHER3.

A. Expresión de las proteínas indicadas mediante western blot: lisados proteicos de líneas celulares de cáncer tiroideo humano comparando aquellas con localización constitutiva de YAP en el núcleo con aquellas con expresión de YAP en el citoplasma. **B.** Cuantificación de los niveles de proteína normalizada por la actina por líneas celulares y por localización celular. Por cada proteína se observan dos gráficas, la de la izquierda corresponde a la cuantificación por línea celular, la de la derecha se representa la media de los niveles de proteína por localización de YAP. Obsérvese que IHH4 (YAP citoplasmático) es la única línea celular con valores elevados de pHER3, si se considera un "outlier" la diferencia en expresión de pHER3 entre YAP-NU y YAP-CYT sería muy significativa. (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Localización celular de YAP en líneas de melanoma y cáncer colorrectal.

Después de lo observado con las líneas celulares de tiroides, quisimos comprobar si esos resultados se aplicaban a otro tipo de cánceres BRAF mutados como melanoma o colorrectal.

Realicé una inmunofluorescencia de YAP en condiciones de alta y baja confluencia celular, y observé la localización constitutiva de YAP en células de cáncer de melanoma (Sk-Mel-28) y colorrectales (Lim-2405, RKO). A baja confluencia, YAP se encontraba en el núcleo mientras que cuando las células alcanzaron alta confluencia YAP se translocó al citoplasma, indicando la regulación fisiológica de YAP (Figura 10).

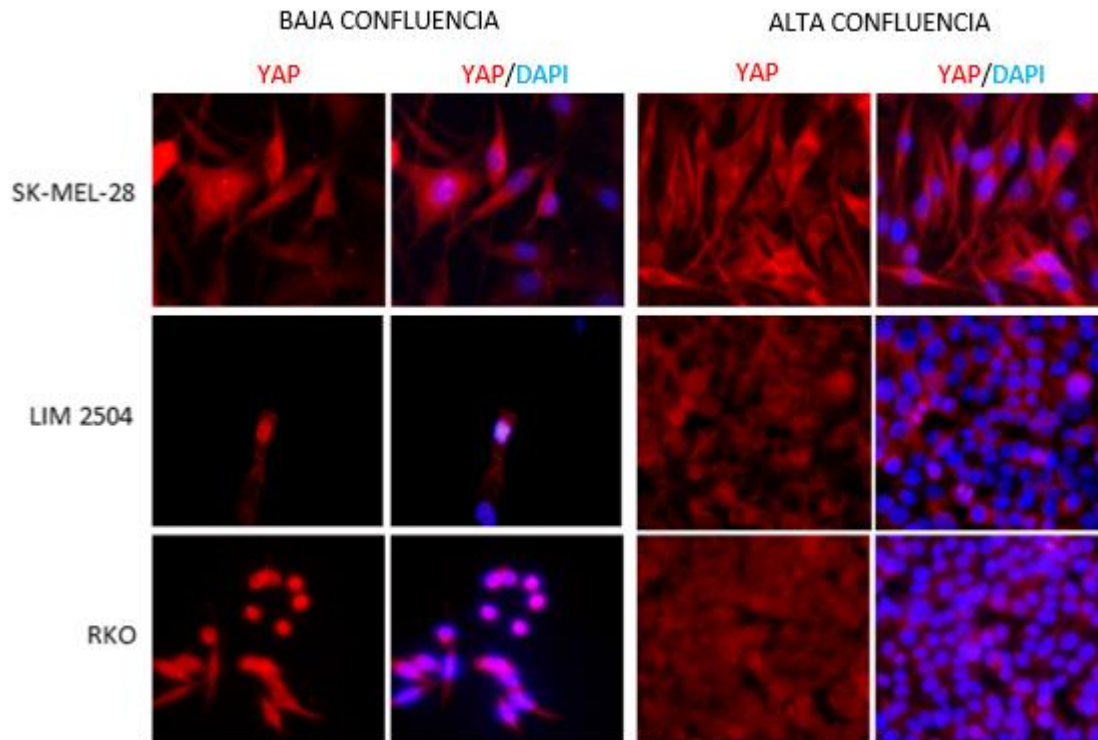


Figura 10. Inmunofluorescencia de YAP en líneas celulares de melanoma y colorrectales a baja y alta densidad celular en medio proliferante.

La expresión de YAP^{S127A} mutante constitutivamente activo, induce aumento en la viabilidad celular.

Las células de cáncer colorrectal y de melanoma que presentaban YAP citoplasmático a alta densidad celular, se infectaron de manera estable con el vector pLVX-YAP^{S127A}. Un vector lentiviral cuya expresión se induce por doxiciclina (ver materiales y métodos para la descripción del vector). El mutante YAP^{S127A} se basa en la sustitución de serina por alanina en la posición 127, esta mutación impide la fosforilación de YAP en el citoplasma permitiendo la translocación constitutiva de YAP al núcleo. La viabilidad celular de las líneas colorrectales

y de melanoma aumentó de manera significativa con la expresión del mutante de YAP tras 6 días con doxiciclina (Figura 11).

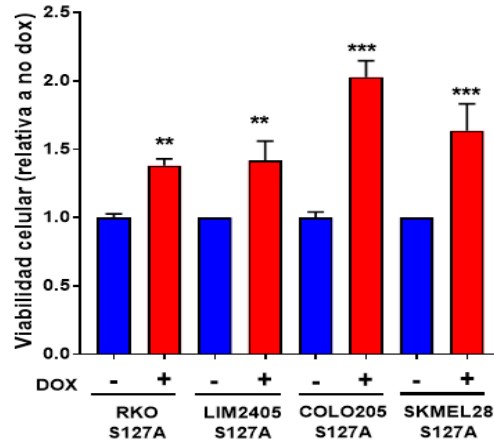


Figura 11. Viabilidad celular tras la inducción por doxiciclina de YAP^{S127A} en líneas celulares de cáncer colorrectal y melanoma con YAP citoplasmático. (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

La inducción de YAP^{S127A} provoca invasión celular en líneas celulares de melanoma y colorrectales.

En líneas celulares con YAP citoplasmático, la expresión de YAP^{S127A} mediante la inducción con doxiciclina provocó un cierre de herida más rápido que aquellas células no inducidas (Figura 12A y 12B).

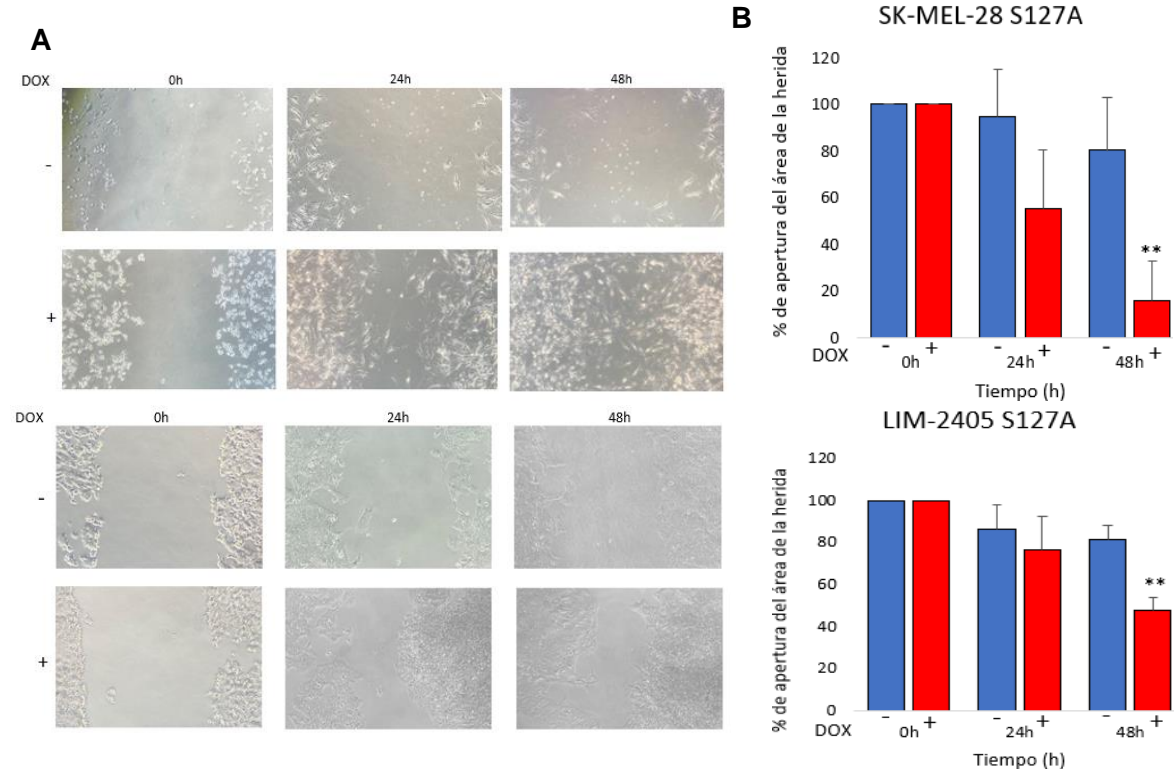


Figura 12. YAP^{S127A} provoca invasión celular en líneas celulares de melanoma y colorrectales. **A.** Fotografías representativas de la herida a las 0, 24 y 48 horas tras la inducción por doxiciclina de YAP^{S127A}. **B.** Cuantificación de los resultados del ensayo de invasión: cierre de herida en las líneas celulares Sk-Mel-28 S127A y Lim-2405 S127A, tratadas con y sin doxiciclina a las 0, 24 y 48 horas. (** $p \leq 0,01$).

YAP Y RESISTENCIA

La expresión del mutante de YAP^{S127A} aumenta la resistencia a vemurafenib en la línea de melanoma.

En el cáncer de tiroides, se descubrió que la expresión de YAP inducía resistencia a vemurafenib cuando tratábamos las células con dosis crecientes, y esta resistencia se debía a un aumento en la ruta NRG1/HER2/HER3 con la consiguiente activación de la ruta de las MAPK. Por ello, quisimos estudiar si esa resistencia ocurría en el cáncer de melanoma y colorrectal.

Dosis crecientes de vemurafenib disminuían la viabilidad celular en las líneas con YAP citoplasmático. La expresión por doxiciclina de YAP^{S127A} inducía resistencia únicamente en la línea de melanoma (Sk-Mel-28 S127A), pero no en las líneas de cáncer colorrectal (Colo-205 S127A y Lim-2405 S127A). En la línea de melanoma observé que la viabilidad celular se mantenía con YAP^{S127A}, incluso aumentando la concentración del tratamiento (Figura 13).

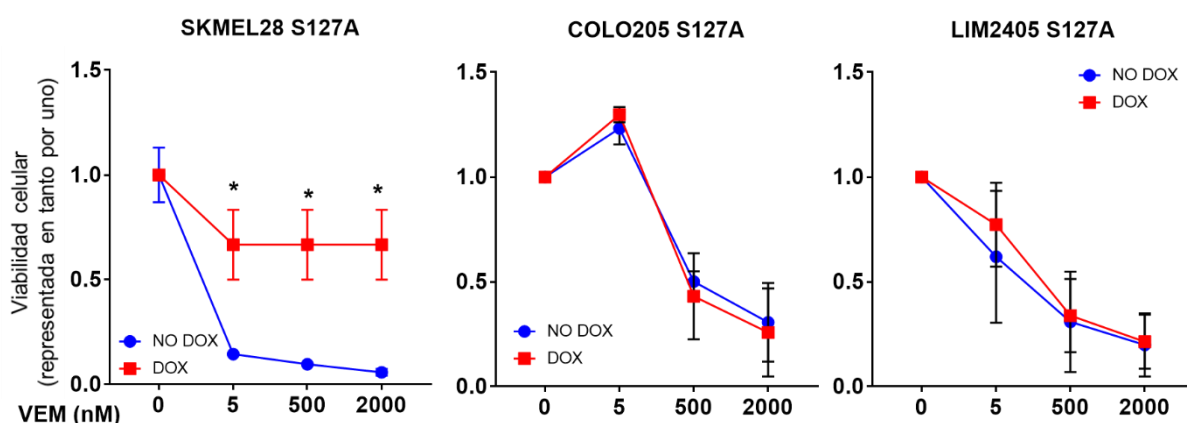


Figura 13. Ensayo de crecimiento en las líneas celulares Sk-Mel28 S127A, Colo-205 S127A y Lim-2405 S127A, se trataron con vemurafenib a concentraciones crecientes (5, 500, 2000 nM), con y sin doxiciclina durante 6 días. (* $p \leq 0,05$).

Sin embargo, no observé diferencias significativas en las líneas celulares de cáncer colorrectal Colo-205 S127A y Lim-2405 S127A. Esto nos indica que YAP no es el inductor de la resistencia a vemurafenib en el cáncer colorrectal, puesto que al tratar con vemurafenib no se apreciaban diferencias entre inducir o no YAP. (Figura 13). Este resultado junto con el encontrado en el cáncer de tiroides sugiere que YAP induciría resistencia a vemurafenib de una manera línea-dependiente.

El tratamiento combinado, vemurafenib-verteporfina, disminuye la viabilidad celular en la línea de melanoma tras la expresión de YAP^{S127A}.

Verteporfina es un inhibidor que rompe el complejo YAP-TEAD bloqueando la activación transcripcional. En la línea de melanoma, cuando el mutante no es inducido, con YAP en el citoplasma, el tratamiento con verteporfina induce una modesta reducción en la viabilidad celular. Sin embargo, verteporfina inhibía por completo la proliferación celular tras la expresión de YAP^{S127A} en el núcleo. Como era esperado, la expresión de YAP^{S127A} inducía resistencia a vemurafenib. La combinación de ambos tratamientos redujo la viabilidad celular de manera

más efectiva que de forma individual, ya que verteporfina sensibilizaba a la línea celular de melanoma a vemurafenib tras la expresión de YAP^{S127A} (Figura 14A).

Sorprendentemente, la viabilidad de las células de cáncer colorrectal disminuyó al tratar con verteporfina tanto con la inducción de YAP como sin ella, es decir, fueron sensibles a verteporfina independientemente de la localización celular de YAP. Buscando en la literatura encontramos un trabajo en el que describían este mismo resultado (28) (Figura 14B).

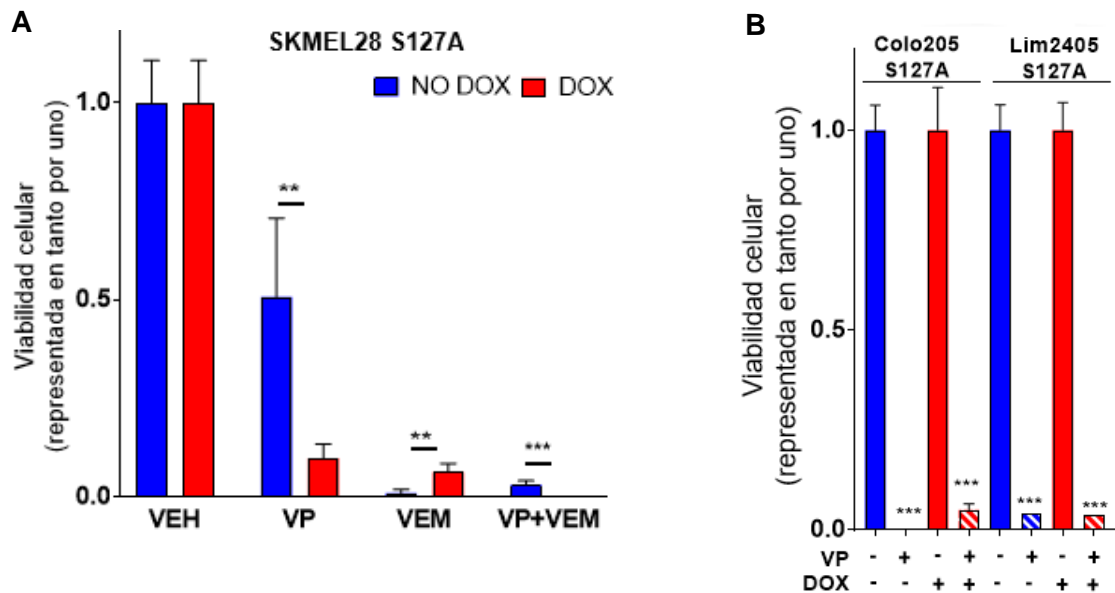


Figura 14. El tratamiento combinado vemurafenib y verteporfina, disminuye la viabilidad celular en melanoma tras la expresión de YAP^{S127A}.

A. Crecimiento de la línea celular de melanoma Sk-Mel-28 S127A con inducción por doxyciclina y tratamiento combinado. **B.** Crecimiento de las líneas celulares colorrectales tratadas con verteporfina, con y sin doxyciclina. (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Los niveles de expresión de *ERBB2* aumentan en las líneas celulares colorrectales y de melanoma al inducir YAP^{S127A}.

En las líneas celulares de cáncer tiroideo la inducción de YAP regulaba la expresión génica de *ERBB2*, *ERBB3* y *NRG1*. Por esta razón decidimos comprobar la expresión de estos genes en las líneas celulares colorrectales y de melanoma.

Primero realicé una qRT-PCR para comprobar que la inducción con doxyciclina de YAP^{S127A} aumentaba la expresión de YAP. Al tratar las líneas celulares con doxyciclina se producía un aumento en los niveles de mRNA de YAP en comparación a cuando no eran tratadas (Figura 15).

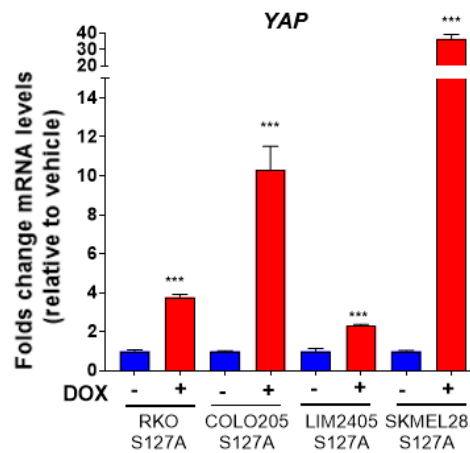


Figura 15. Niveles de expresión de YAP en líneas celulares de melanoma y cáncer colorrectal mediante qRT-PCR. ($p \leq 0,001$).**

En la línea de melanoma, la expresión del mutante producía un incremento en los niveles de mRNA de HER2 (*ERBB2*). Sin embargo, en las líneas de cáncer colorrectal, a excepción de la línea Lim-2405 S127A, la inducción de YAP^{S127A} no incrementaba la expresión de *ERBB2* (Figura 16).

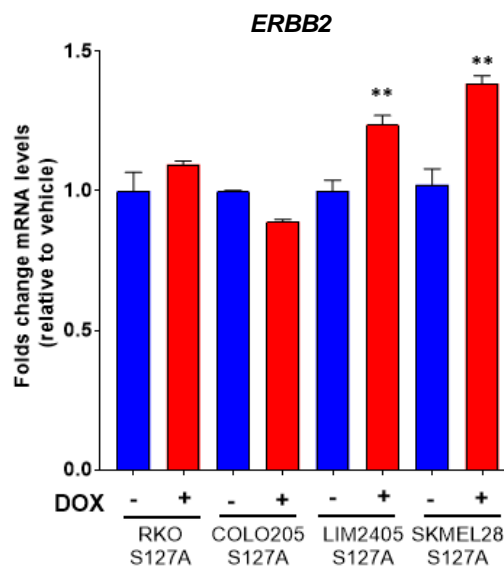


Figura 16. Niveles de expresión de ERBB2 en líneas celulares de melanoma y cáncer colorrectal mediante qRT-PCR. ($p \leq 0,01$).**

También se cuantificaron los niveles de mRNA de HER3 (*ERBB3*) en las líneas celulares colorrectales. En este caso, los niveles de expresión de YAP^{S127A} aumentaban los niveles de *ERBB3* (Figura 17). Actualmente estoy replicando y completando los experimentos con las demás líneas celulares.

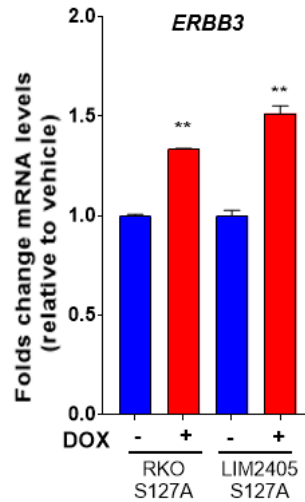


Figura 17. Niveles de expresión de *ERBB3* en líneas celulares de melanoma y cáncer colorrectal mediante qRT-PCR. ($p \leq 0,01$).**

Cuantifiqué el nivel de expresión del ligando de HER2/HER3, *NRG1*, en la línea celular de melanoma. Al inducir el mutante de YAP^{S127A} se producía un incremento significativo del nivel de expresión en comparación a la no inducción (Figura 18). Al igual que con *ERBB3*, actualmente me encuentro completando el experimento con el resto de líneas celulares.

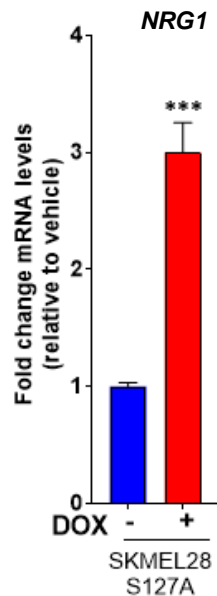


Figura 18. Niveles de expresión de *NRG1* en la línea celular de melanoma mediante qRT-PCR. (*) $p \leq 0,001$.**

YAP^{S127A} aumenta la inducción por vemurafenib de la expresión de *ERBB2* en melanoma.

Luego quisimos ver si la expresión de *ERBB2/ERBB3/NRG1* inducida por YAP^{S127A} era la causa de la resistencia inducida por vemurafenib en la línea de melanoma. El tratamiento con vemurafenib produjo un aumento en la expresión de *ERBB2* en todas las líneas celulares. Sin embargo, la expresión de YAP^{S127A} indujo un mayor aumento de *ERBB2* tras el tratamiento con vemurafenib únicamente en la línea de melanoma. Esto no ocurrió en el caso de las líneas de cáncer colorrectal, en las cuales no se apreciaba ningún cambio o incluso una disminución en los niveles de *ERBB2* (Figura 19).

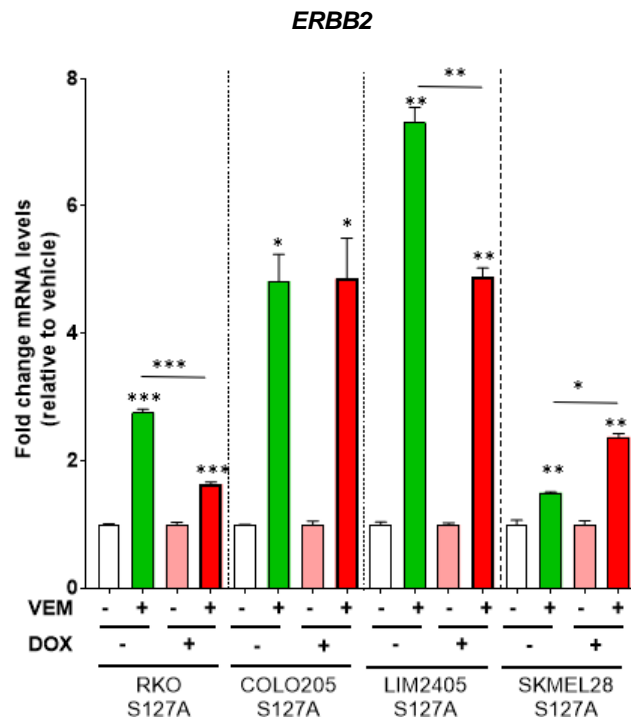


Figura 19. Niveles de expresión de *ERBB2* en líneas celulares de melanoma y cáncer colorrectal mediante qRT-PCR, tratadas con vemurafenib, con y sin doxiciclina. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$).**

El tratamiento con vemurafenib también provocó un aumento en la expresión de *ERBB3* en todas las líneas celulares estudiadas hasta el momento. La expresión de YAP^{S127A} no produjo un incremento de *ERBB3* tras el tratamiento con vemurafenib en las líneas de cáncer colorrectal. Actualmente estoy repitiendo y completando estos experimentos (Figura 20).

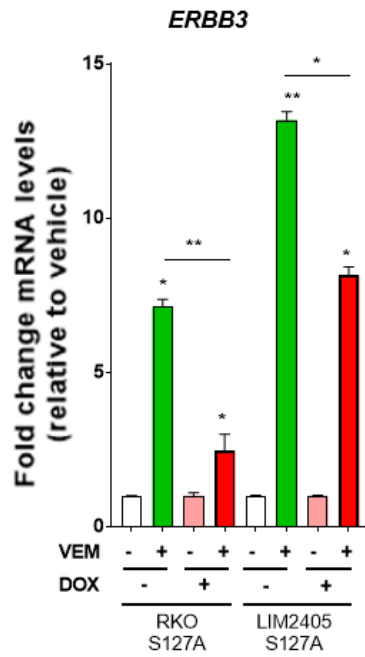


Figura 20. Niveles de expresión de ERBB3 en líneas celulares de melanoma y cáncer colorrectal mediante qRT-PCR, tratadas con vemurafenib, con y sin doxiciclina. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estudio de los mecanismos implicados en la resistencia terapéutica es de gran importancia. Hemos descubierto que el oncogén YAP podría tener un papel relevante en la resistencia a inhibidores de RAF en cáncer tiroideo y de melanoma, algo que no se manifiesta en cáncer colorrectal.

En condiciones fisiológicas, la ruta HIPPO se activa por diferentes señales: respuesta a mecanotransducción, cambios estructurales, comunicación con células adyacentes o cambios en el medio, esto conlleva la activación de las quinasas (MST1/2 y LATS1/2) encargadas de fosforilar a YAP. Esta fosforilación retiene a YAP en el citoplasma y queda marcado por ubiquitinación para su degradación en el proteosoma. Cuando la regulación de YAP en el transporte entre núcleo-citoplasma falla o la ruta HIPPO se inactiva, YAP se acumula constitutivamente en el núcleo y se activa, induciendo tumorigénesis. Se ha descrito YAP nuclear en diversos cánceres como páncreas, gástrico; por ello, nosotros deducimos que la localización aberrante de YAP en las líneas cancerosas de tiroides cultivadas en confluencia señalaría una disfunción en su mecanismo de control.

Se estudiaron 52 líneas celulares de tiroides y se encontró que 27 presentaban YAP nuclear de manera aberrante. Todas aquellas con mutaciones en la vía HIPPO presentaban YAP nuclear. Las líneas celulares con origen más agresivo presentaban un mayor enriquecimiento de YAP nuclear lo que podría señalar a YAP como marcador de prognosis. En muestras de tejidos de tumores humanos tiroideos encontraron que el 65% tenían localización de YAP nuclear. No encontré diferencias en el porcentaje nuclear de YAP por fenotipo o genotipo, sin embargo, encontré que dentro de cada categoría la variante tall cell presentaba un alto enriquecimiento de YAP nuclear (20/24). Esta variante es la más agresiva dentro de cada fenotipo, sin embargo desconocemos la implicación clínica de este descubrimiento. Con estos resultados no se podría utilizar la localización nuclear de YAP como marcador de diagnóstico. Sería interesante comprobar si YAP podría ser utilizado como marcador de respuesta terapéutica.

En resultados previos en el laboratorio se descubrió que en las líneas de cáncer de tiroides con YAP citoplasmático, la expresión del mutante de YAP^{S127A} produce un incremento en la proliferación, invasión y resistencia a vemurafenib. YAP nuclear aumentaba la expresión de *ERBB2*, *ERBB3* y *NRG1*, aumentando la actividad de la ruta y la consecuente re-expresión de pERK. Todos esos experimentos se realizaron mediante un sistema isogénico, así que nos preguntamos si en líneas parentales aquellas con YAP nuclear tendrían unos mayores niveles de pHER2 o pHER3. En líneas generales podemos observar que en tiroides las líneas con YAP nuclear presentaban una mayor expresión de pHER2 y pHER3.

Los tumores colorrectales y de melanoma presentan frecuentemente mutaciones en BRAF^{V600E}. Este cambio, sustitución de valina por ácido glutámico en el codón 600, produce un aumento de la actividad de BRAF y de los efectores de MAPK incrementando la transcripción de genes implicados en proliferación y apoptosis celular. En melanoma, la mutación BRAF^{V600E} está presente aproximadamente en el 50% de los casos (12) y en un menor porcentaje, 5-15%, aparece en cáncer colorrectal (13). Estos tumores, al igual que el cáncer de tiroides, tras una respuesta a los inhibidores de RAF (vemurafenib) desarrollan resistencia al tratamiento con el tiempo. Se ha visto que la resistencia se debe a un incremento

en la actividad de RAS que induce a una reactivación de ERK. Los mecanismos implicados en el aumento de la actividad de RAS son variados y no se conocen completamente. Nos preguntamos si YAP podría estar involucrado en la resistencia a vemurafenib en estos tumores y si se daba a través de la activación de la ruta HER2/HER3/NRG1 encontrada en cáncer de tiroides.

Primero realicé una inmunofluorescencia de YAP para conocer su localización celular en líneas celulares de cáncer colorrectal y de melanoma con mutaciones en BRAF^{V600E}. Está descrito que la localización de YAP se regula por densidad celular. En condiciones fisiológicas, YAP se encuentra en el núcleo en un medio proliferativo, cuando las células alcanzan la confluencia celular, YAP se transporta al citoplasma. Todas las líneas estudiadas presentaban YAP citoplasmático a alta concentración celular. Se infectaron de manera estable con un mutante de YAP (YAP^{S127A}), cuya expresión era inducida con doxiciclina. Al ser una expresión inducida para cada experimento, evitábamos que las rutas moleculares se “adaptaran” a unos niveles altos y constantes de YAP mutante. Al igual que lo observado en las líneas de cáncer de tiroides, en las líneas celulares de cáncer de melanoma y colorrectales, al inducir YAP^{S127A} se apreció un aumento en proliferación e invasión, en comparación a aquellas no inducidas, lo que indica que son dependientes de YAP para su viabilidad.

En la línea celular de melanoma, la inducción de YAP^{S127A} producía resistencia a vemurafenib. Como era de esperar, el tratamiento con el inhibidor del complejo YAP-TEAD (verteporfina) en la línea de melanoma con YAP citoplasmático era poco efectivo. Sin embargo, cuando se inducía la expresión de YAP^{S127A} (YAP nuclear) se volvía completamente sensible. El hecho de tener cierta reducción en la viabilidad celular cuando YAP es citoplasmático tras el tratamiento con verteporfina se puede deber a un efecto tóxico, a una concentración del inhibidor demasiado elevada o a los efectos independientes de YAP (off target) descritos en la literatura (29-31). Si YAP nuclear era el mediador de la resistencia a vemurafenib en la línea de melanoma, bloqueando su actividad se desarrollaría sensibilidad a vemurafenib. En efecto, el tratamiento combinado disminuía la viabilidad celular de manera más significativa que cuando los tratamientos se administraban de forma individual; verteporfina sensibilizada la línea de melanoma a vemurafenib. Para ver si la resistencia se realizaba a través de HER2/HER3, estudié los niveles de *ERBB2*, *ERBB3* y *NRG1* tras la inducción de YAP^{S127A}. Observé un aumento en la expresión de estos genes tras la inducción con doxiciclina, sugiriendo que la resistencia a vemurafenib por YAP podría realizarse a través de esta ruta. Más aún, mediante qRT-PCR observé que vemurafenib producía un aumento en la expresión de *ERBB2*, este aumento se incrementaba aún más, tras la inducción de YAP^{S127A}.

En las líneas celulares de cáncer colorrectal no ocurría lo mismo que en la línea de melanoma. La inducción de YAP^{S127A} no aumenta la resistencia a vemurafenib en ninguna de las líneas estudiadas. Sorprendentemente cuando bloqueábamos el complejo YAP-TEAD con verteporfina se veía una profunda disminución en la viabilidad incluso cuando YAP se encontraba en el citoplasma. De la misma manera que en melanoma, podría deberse a un efecto tóxico o a un efecto off target del inhibidor. H. Zhang et al, describieron que verteporfina reducía la viabilidad celular en líneas de cáncer colorrectal independientemente de la localización de YAP (28). Tampoco observé un aumento de la expresión de *ERBB2* tras la inducción de YAP^{S127A} (a excepción de la línea Lim-2405 S127A cuyo significado desconocemos). Más aún, aunque el tratamiento con vemurafenib aumentaba la expresión de

ERBB2, la inducción de YAP^{S127A} no aumentaba esa expresión, es más no variaba o incluso disminuía en alguna de las líneas celulares. En el caso de *ERBB3*, vemurafenib aumentaba sus niveles en las dos líneas de cáncer colorrectal estudiadas. Sin embargo, la inducción de *ERBB3* por vemurafenib disminuía al expresar YAP^{S127A}. Esto indicaba que aunque YAP induzca la expresión de *ERBB3*, éste no tendría un papel en la resistencia a vemurafenib. Todos estos resultados muestran que la resistencia a vemurafenib en las líneas de cáncer colorrectal no se debe a YAP nuclear. En la literatura está descrito que una de las posibles causas es un aumento de la expresión del receptor EGFR (32).

Los resultados indican que la resistencia a vemurafenib a través de la activación de la ruta HER2/HER3 observada en cáncer de tiroides, parece que ocurre en melanoma pero no en cáncer colorrectal. Para poder confirmar este hallazgo se necesitaría aumentar el número de líneas celulares de melanoma en el que se observaría si la expresión de YAP^{S127A} induce resistencia a vemurafenib en más de una línea. También serían necesarios otros experimentos como western-blot con dosis crecientes de vemurafenib para observar el aumento con YAP^{S127A} de pHER2/pHER3, lo que indicaría activación de los receptores y no sólo un aumento de su expresión. Para demostrar que realmente la resistencia ocurre a través de estos receptores, las líneas de melanoma tendrían que ser tratadas con un inhibidor de HER2/HER3 o con siRNA en combinación con vemurafenib, de esta manera esperaríamos observar la sensibilidad de estas células al tratamiento. Y finalmente sería imprescindible la experimentación con ratones para comprobar si ocurre *in vivo*.

En resumen, YAP induce un aumento de proliferación e invasión en líneas celulares de tiroides, melanoma y colorrectales, esto indica que son dependientes de esta ruta para su viabilidad. La resistencia a vemurafenib es inducida por YAP a través de la activación de la ruta HER2/HER3 en las líneas de melanoma y tiroides, pero no en colorrectales, lo que indicaría un papel de YAP línea-dependiente. Estos resultados muestran a YAP como una posible nueva diana terapéutica para el tratamiento de melanoma y tiroides en combinación con el inhibidor de BRAF, vemurafenib.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mondragón-Terán P, López-Hernández LB, Gutiérrez-Salinas J, Suárez-Cuenca JA, Luna-Ceballos RI, Erazo Valle-Solís A. Mecanismos de señalización intracelular en cáncer de tiroides. *Cirugía y Cirujanos*. 2016; 84(5), 434-43, doi:10.1016/j.circir.2016.05.017.
2. Tasas de supervivencia del cáncer de tiroides por tipo y etapa. Accedido 16 de mayo de 2021, <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-tiroides/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/tasas-de-supervivencia.html>
3. Medina-Ornelas S., García-Pérez F., Granados-García M. Impacto de la medicina nuclear en el diagnóstico y tratamiento del cáncer diferenciado de tiroides. *Gaceta Médica de México*. 2018; 154(4), 509-519, doi:10.24875/GMM.18003206.
4. Guerra Mesa JL. Carcinoma anaplásico de tiroides: Consideraciones de actualidad. *Revista Cubana de Cirugía*. 2001; (Vol.40, n.2, pp.99-105).
5. Gallegos Hernández J.F., Nieweg O.E. Melanoma cutáneo (MC): diagnóstico y tratamiento actuales. *Gaceta Médica de México*. 2014; (Vol.150, n.2, pp.175-82).
6. Cáncer de Colon: Supervivencia y Esperanza de Vida | AECC. Accedido 16 de mayo de 2021, <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-colon/evolucion-cancer-colon>.
7. Tratamiento del cáncer de colon según la etapa. Accedido 16 de mayo de 2021, <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/por-etapas-colon.html>
8. Palmieri G., et al. Molecular Pathways in Melanogenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Current Oncology Reports*. 2018; (Vol.20, n.11), doi:10.1007/s11912-018-0733-7.
9. Roa I., Sánchez T., Majlis A., et al. Mutación del gen KRAS en cáncer colorrectal. *Revista Médica de Chile*. 2013; (Vol.141, n.9), doi:10.4067/S0034-98872013000900009.
10. Liu, Yuxin, M. Saeed Sheikh. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 2014; 6(3), 31-44, doi: 10.4255/mcpharmacol.14.03.
11. Domínguez Ayala M., Expósito Rodríguez A., Bilbao González A., Mínguez Gabiña P., Gutiérrez Rodríguez T., Rodeño Ortiz de Zarate E., et al. BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer and its effect on postoperative radioiodine (¹³¹I) therapy: Should we modify our therapeutic strategy? *Cir Esp*. 2018; 96(5), 276-282, doi:10.1016/j.ciresp.2018.02.018.
12. García A., Lorente C., Elsner B., Avagnina A., Denninghoff V. Estado Mutacional de BRAF y Parámetros Histopatológicos en Melanoma Maligno Cutáneo. *Medicina Buenos Aires*. 2019; (Vol.79, n.4).
13. Roa I., Anakaren G., Carolina B., Kurt S. Mutación del gen BRAF en pacientes con cánceres de colon y recto con KRAS no mutado. *Revista Médica de Chile*. 2014; 142(1), 55-60, doi:10.4067/S0034-98872014000100009.
14. Zanconato F., Cordenonsi M., Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*. 2016; (Vol.29, Issue6, pp.783–803), doi:10.1016/j.ccell.2016.05.005.
15. Zheng Y., Pan D. (2019). The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. *Developmental Cell*, 50(3), 264–282, doi: 10.1016/j.devcel.2019.06.003

16. Garcia-Rendueles M. E. R., Ricarte-Filho J. C., Untch B. R., Landa I., Knauf J. A., Voza F., et al. NF2 loss promotes oncogenic RAS-induced thyroid cancers via YAP-dependent transactivation of RAS proteins and sensitizes them to MEK inhibition. *Cancer Discovery*. 2015; 5(11), 1178–1193, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0330.
17. Zeng R., Dong J. The hippo signaling pathway in drug resistance in cancer. *Cancers*. 2021; 13(2), 1–23, doi:10.3390/cancers13020318
18. Montero-Conde C., Ruiz-Llorente S., Dominguez J. M., Knauf J. A., Viale A., Sherman E. J., et al. Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF -mutant thyroid carcinomas. *Cancer Discovery*. 2013; 3(5), 520–533, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0531.
19. Shalem O., et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014; 343, 84-87, doi:10.1126/science.1247005.
20. Lin L, et al. The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat Genet*. 2015; 47, 250-256, doi:10.1038/ng.3218.
21. Kim M. H., et al. Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J*. 2016; 35, 462-478, doi:10.15252/embj.201592081.
22. Yu F. X., et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*. 2012; 150, 780-791, doi:10.1016/j.cell.2012.06.037.
23. Kapoor A., et al. Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell*. 2014; 158, 185-197, doi:10.1016/j.cell.2014.06.003.
24. Shao D. D., et al. KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival. *Cell*. 2014; 158, 171-184, doi:10.1016/j.cell.2014.06.004.
25. Kitajima S., et al. Overcoming Resistance to Dual Innate Immune and MEK Inhibition Downstream of KRAS. *Cancer cell*. 2018; 34, 439-452 e 436, doi:10.1016/j.ccell.2018.08.009.
26. Ghiso E., et al. YAP-Dependent AXL Overexpression Mediates Resistance to EGFR Inhibitors in NSCLC. *Neoplasia*. 2017; 19, 1012-1021, doi:10.1016/j.neo.2017.10.003.
27. Lee T. F., et al. Enhanced YAP expression leads to EGFR TKI resistance in lung adenocarcinomas. *Sci Rep*. 2018; 8, 271, doi:10.1038/s41598-017-18527-z.
28. Zhang H., Ramakrishnan S. K., Triner D., Centofanti B., Maitra D., Györfy B., et al. Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1. *Sci Signal*. 2015; 8 (397): ra98, doi: 10.1126/scisignal.aac5418.
29. Liu-Chittenden Y., et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEADYAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev*. 2012; 26, 1300-1305, doi:10.1101/gad.192856.112.
30. Dasari V. R., et al. Verteporfin exhibits YAP-independent anti-proliferative and cytotoxic effects in endometrial cancer cells. *Oncotarget*. 2017; 8, 28628-28640, doi:10.18632/oncotarget.15614.
31. Donohue E., et al. Inhibition of autophagosome formation by the benzoporphyrin derivative verteporfin. *Biol Chem*. 2011; 286, 7290-7300, doi:10.1074/jbc.M110.139915.
32. Prahallad A., Sun C., Huang S., Di Nicolantonio F., Salazar R., Zecchin D., et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback

activation of EGFR. *Nature*. 2012; 483(7387):100-3. doi:10.1038/nature10868. PMID:
22281684