



Fundació
La Marató de TV3

19^è SIMPOSIUM
Càncer

ANÁLISIS MOLECULAR DE CAPICUA, UN NUEVO SUPRESOR TUMORAL INVOLUCRADO EN SEÑALIZACIÓN RTK Y REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL

Gerardo Jiménez Cañero

Institut Biologia Molecular de Barcelona CSIC

Mariano Barbacid Montalbán

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas CNIO





1. Resumen

La proteína HMG-box Capicua (CIC) es un represor transcripcional ampliamente conservado en la evolución que ejerce funciones esenciales en el desarrollo normal y en el cáncer. Descubierta originalmente en *Drosophila*, CIC actúa como sensor de vías de señalización del tipo receptor tirosina cinasa (RTK): en ausencia de la señal RTK, CIC reprime a los genes regulados por la vía, mientras que la activación de la vía inhibe la actividad de CIC, dando lugar a la inducción de sus genes diana. En los últimos años se han identificado mutaciones que supuestamente inactivan la función de CIC en diferentes tipos de cáncer, en especial en tumores cerebrales en adultos. Además, CIC está involucrado en sarcomas de células redondas de la familia de Ewing, pero aparentemente a través de un mecanismo totalmente distinto: en estos casos, CIC aparece fusionado a la región C-terminal de la proteína DUX4, de modo que la proteína quimera se convierte en un activador en vez de un represor transcripcional. Estas evidencias sugieren que CIC puede actuar como supresor de tumores o como oncógeno en distintos tipos de cáncer.

Sin embargo, no se ha demostrado formalmente que CIC sea un supresor tumoral, ni tampoco se conoce con detalle su mecanismo de acción a nivel molecular. En este proyecto hemos abordado estas cuestiones utilizando una combinación de análisis genéticos y moleculares, tanto en ratón como en *Drosophila*. El estudio ha revelado tres hallazgos principales. Primero, hemos demostrado que CIC es un supresor tumoral cuya inactivación induce leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T), y que estos tumores se originan principalmente por un mecanismo de desrepresión del protooncogén *ETV4*. Segundo, hemos descubierto que, a diferencia de lo que se creía hasta ahora, el dominio HMG-box de CIC no es suficiente para la unión al ADN y requiere un motivo separado, denominado C1, presente en la región C-terminal de la proteína; esto explica por qué C1 se encuentra frecuentemente mutado en gliomas y otros tumores, mientras que se mantiene presente en fusiones oncogénicas CIC-DUX4 asociadas a sarcomas de la familia de Ewing. Tercero, hemos mostrado que CIC, además de funcionar como sensor de vías RTK, también actúa como represor de genes regulados por la vía de Toll/Interleukin-1 en el embrión de *Drosophila*, sugiriendo así la posibilidad de que dicho mecanismo también opere en humanos. Así, nuestros resultados suponen un avance importante en el conocimiento de la función de CIC y podrían facilitar posibles terapias frente a tumores relacionados con este factor.

2. Resultados

1. CIC es un supresor tumoral cuya inactivación causa LLA-T. Para caracterizar las funciones de CIC durante el desarrollo normal y el cáncer, hemos establecido un modelo genético de inactivación de *CIC* en ratones. En concreto, hemos generado un alelo condicional de *CIC* portador de secuencias *loxP* flanqueando los exones 2-6 del gen, los cuales codifican el dominio conservado HMG-box necesario para la unión de CIC al ADN. Tras la recombinación mediada por la proteína Cre, dicho alelo produce formas de CIC incapaces de unirse al ADN y, por tanto, reprimir la expresión de sus genes diana. Nuestros resultados muestran que la inactivación de CIC durante la embriogénesis causa letalidad perinatal como consecuencia de diferentes defectos, en especial hernias en la pared abdominal así como alteraciones en la diferenciación del epitelio pulmonar. Por otra parte, una inactivación sistémica de CIC en ratones adultos dio lugar a linfomas LLA-T antes de un año de edad. Estos tumores mostraron una elevada proporción de células positivas para los marcadores CD4 y CD8 en el timo, y niveles variables de células positivas para solo uno de dichos marcadores, sugiriendo la presencia de células T inmaduras.

A nivel molecular, la caracterización de estos tumores mediante secuenciación de ARN (RNA-seq) mostró la presencia de genes cuya expresión estaba o bien aumentada o reducida respecto a muestras control. Este patrón transcripcional se comparó con los inducidos por oncogenes *RAS* o por mutaciones de pérdida de función en *p53*, revelando una similitud significativa con el primer grupo. Además, el perfil de los tumores carentes de CIC funcional también se parece al de muestras de LLA-T humanas que contienen mutaciones en *CIC* u otras alteraciones que aumentan la actividad de la vía RAS-ERK. Estos resultados sugieren que CIC actúa por debajo de la vía RAS-ERK en LLA-T, y que la inactivación de CIC (ya sea por mutación o por sobreactivación de dicha vía) desempeña un papel importante en un número significativo de casos de LLA-T en humanos (Simón-Carrasco *et al.*, 2017).

Además, hemos estudiado si los tumores producidos por la inactivación de CIC pueden crecer independientemente de la vía RAS-ERK. Los tumores inducidos por oncogenes *RAS* normalmente requieren la continua actividad de la vía para su proliferación, de modo que el tratamiento con inhibidores de la señalización RAS-ERK (por ejemplo, trametinib) suprime dicha proliferación. Por el contrario, hemos observado que tales inhibidores no afectan a la proliferación de células tumorales de ratón inducidas por la

inactivación de CIC, ni tampoco el crecimiento de células humanas en las que CIC ha sido inactivado mediante CRISPR-Cas9 (Simón-Carrasco *et al.*, 2017). Estos resultados apoyan nuestro modelo de función de CIC por debajo de la señalización RAS-ERK en LLA-T, de modo que la falta de función de CIC mimetiza los efectos de la hiperactivación de RAS. Por tanto, hemos concluido que la inactivación de CIC puede ser un importante mecanismo de resistencia a inhibidores de la vía RAS-ERK, un problema frecuente en tratamientos del cáncer basados en dichos inhibidores.

Finalmente, hemos observado que los tumores inducidos por la inactivación de CIC muestran una expresión elevada de dos genes de la familia *PEA3*, *ETV4* y, en menor medida, *ETV5*, los cuales son dianas conocidas de CIC. Para comprobar si esta sobreexpresión podría ser responsable del origen de los tumores, hemos introducido alelos de falta de función de *ETV4* en ratones *CIC^{lox/lox}*. Sorprendentemente, la completa eliminación de *ETV4* evitó casi totalmente la formación de tumores de LLA-T en respuesta a la inactivación de CIC (Simón-Carrasco *et al.*, 2017). Así pues, la desrepresión de *ETV4* resulta clave en el desarrollo de dichos tumores.

2. CIC utiliza un nuevo modo de unión al ADN. Además del dominio HMG-box, las proteínas CIC de todos los animales contienen en su región C-terminal un dominio conservado que hemos denominado C1, pero cuya función ha permanecido desconocida. El dominio C1 está relacionado con la función de CIC en cáncer: en primer lugar, C1 se encuentra frecuentemente mutado en gliomas y otros tumores, indicando que este dominio es necesario para la actividad supresora tumoral de CIC; en segundo lugar, a pesar de hallarse localizado en el extremo C-terminal de CIC, el dominio C1 se encuentra a menudo incorporado en las quimeras CIC-DUX4, lo que sugiere que también es necesario para la función activadora de dichas quimeras en sarcomas de la familia de Ewing. En nuestro proyecto hemos llevado a cabo experimentos genéticos y bioquímicos que muestran que el dominio C1 es esencial para las funciones de CIC en el desarrollo de *Drosophila* y que actúa junto al dominio HMG-box para mediar la unión de CIC a secuencias específicas en el ADN (Forés *et al.*, 2017). Los dominios HMG-box y C1 no funcionan mediante dimerización y son activos en ausencia de cofactores, lo que sugiere que forman una estructura bipartita para la unión al ADN. Además, y es de especial relevancia, hemos confirmado que este mecanismo también es propio de la proteína humana, y que mutaciones en tumores humanos que afectan a este dominio reducen marcadamente la unión al ADN.

Asimismo, hemos estudiado los requerimientos de secuencia que median la unión de CIC al ADN. En concreto, hemos mostrado que CIC reconoce sitios octaméricos TGAATGAA o similares independientemente de las secuencias adyacentes. Esto indica que C1 no funciona como el dominio "C-clamp" presente en proteínas HMG-box de la familia TCF, el cual facilita la unión de la HMG-box al ADN reconociendo secuencias denominadas *helper sites* localizadas junto a los sitios reconocidos por la HMG-box. En lugar de ello, hemos concluido que las proteínas CIC representan una subfamilia de proteínas HMG-box que utilizan un nuevo mecanismo para seleccionar sus sitios de unión en el genoma (Forés *et al.*, 2017).

También en relación con esta parte del proyecto, hemos estudiado cómo afecta el dominio C1 a la actividad de las fusiones oncogénicas CIC-DUX4. Considerando la función esencial del dominio C1 en la unión al ADN, nuestra hipótesis ha sido que este dominio es necesario para que CIC-DUX4 reconozca y active sus genes diana. Para probar esta idea, hemos expresado una quimera CIC-DUX4 en el ala de *Drosophila* y hemos observado efectos fenotípicos y de expresión consistentes con una función de CIC-DUX4 como activador (en vez de represor) transcripcional. Es más, mutaciones en el dominio C1 de CIC-DUX4 causan una fuerte supresión de dichos efectos (Forés *et al.*, 2017). Por tanto, el dominio C1 es necesario para las funciones opuestas de CIC (represión) y CIC-DUX4 (activación), lo cual es consistente con la idea de que C1 interviene en la unión al ADN y no en la actividad represora de CIC.

3. Actividades reguladoras de CIC independientes de la señalización RTK. CIC es un efector conservado de la vía RTK-RAS-ERK, pero se desconocía si este era su único mecanismo regulador. Durante el proyecto, hemos caracterizado una nueva función de CIC como regulador de la expresión de genes controlados por la vía de Toll/Interleukin-1 en el embrión de *Drosophila* (Papagianni *et al.*, 2018). Hemos descubierto que CIC reprime dichos genes reconociendo sitios subóptimos en el ADN de menor afinidad que sus sitios conocidos mencionados anteriormente. Esta unión depende de Dorsal, un factor relacionado con las proteínas NF- κ B de mamíferos, que se trasloca al núcleo en respuesta a la activación del receptor Toll y se une al lado de los sitios de CIC. De este modo, CIC reconoce y reprime sus dianas únicamente en regiones donde Toll está activo. Estos resultados revelan un nuevo modelo de acción de CIC y tienen amplia relevancia respecto a la regulación transcripcional durante el desarrollo normal y en condiciones patológicas. En particular, si los sitios reconocidos

por factores de transcripción pueden ser de baja afinidad, puede resultar difícil identificarlos a pesar de ejercer una función biológica crucial. Por ejemplo, estudios de transcriptómica utilizando líneas celulares y muestras de tumores han revelado un gran número de genes candidatos a ser regulados por CIC, cuyas regiones reguladoras se analizan para determinar si contienen sitios de unión a CIC. A la luz de nuestros resultados, hemos propuesto que sitios subóptimos (por tanto, crípticos) ligados a sitios de unión de cofactores podrían también controlar la expresión de genes diana de CIC en humanos (Papagianni *et al.*, 2018).

3. Relevancia e implicaciones futuras

CIC es un gen directamente involucrado en el cáncer cuya actividad puede verse afectada por mutaciones tanto de ganancia como de pérdida de función. Su importancia radica no solo en su implicación en diferentes tipos de cáncer y en metástasis, sino también en su relación directa con la vía de RAS-ERK –la ruta de señalización más frecuentemente alterada en cáncer. Por lo tanto, definir las propiedades funcionales de CIC y los mecanismos moleculares responsables de su actividad es de vital importancia para comprender el origen, progresión y tratamiento de los tumores en los que CIC está afectado.

En este proyecto hemos contribuido muy significativamente a lograr este objetivo. Hemos demostrado, por primera vez, que CIC es un supresor tumoral *in vivo*, y también hemos descubierto una relación previamente desconocida de este factor con tumores hematopoyéticos. También hemos identificado el mecanismo de unión de CIC al ADN, que es distinto del utilizado por otras proteínas HMG-box, y que explica los efectos de mutaciones que alteran la función de CIC en el cáncer. Además, hemos identificado un nuevo principio de acción de CIC que es diferente de su función conocida como sensor de la vía RAS-ERK, sugiriendo la posibilidad de que CIC también actúe independientemente de esta vía en el control del crecimiento celular y el cáncer. Estos últimos resultados también ilustran un nuevo paradigma de regulación transcripcional en el que la unión subóptima de un represor al ADN restringe su actividad *in vivo*.

Nuestra investigación es fundamentalmente básica, ya que el principal objetivo ha sido comprender la función de CIC en procesos reguladores normales y en el cáncer. No obstante, podemos destacar diferentes posibles aplicaciones del trabajo en la investigación o en la práctica clínica. En primer lugar, nuestro modelo de inactivación de CIC en ratón puede proporcionar una herramienta útil para desarrollar y ensayar nuevas terapias contra la LLA-T. Además, la función clave del factor ETV4 en tumores inducidos por la inactivación de CIC sugiere la posibilidad, en un futuro, de tratar dichos tumores con fármacos que interfieran en la actividad transcripcional de ETV4 o en la función de sus genes diana. Por otra parte, nuestros resultados acerca del mecanismo de unión de CIC al ADN facilitará en el futuro la interpretación de mutaciones en CIC presentes en pacientes, ya que será posible determinar si dichas mutaciones inactivan o alteran la unión de CIC al ADN. Además, nuestros resultados podrían guiar el desarrollo de terapias dirigidas a inactivar dicha unión en tumores causados por fusiones CIC-DUX4 oncogénicas.

4. Bibliografía científica

Durante el proyecto, se han generado las siguientes publicaciones:

Forés M, Ajuria L, Samper N, Astigarraga S, Nieva C, Grossman R, González-Crespo S, Paroush Z, Jiménez G (2015)

Origins of context-dependent gene repression by Capicua.

PLOS Genetics **11**, e1004902.

Jin Y, Ha N, Forés M, Xiang J, Glaßer C, Maldera J, Jiménez G, Edgar BA (2015)

EGFR/Ras signaling controls Drosophila intestinal stem cell proliferation via Capicua-regulated genes.

PLOS Genetics **11**, e1005634.

Yang L, Paul S, Trieu KG, Dent LG, Frolidi F, Forés M, Webster K, Siegfried KR, Kondo S, Harvey K, Cheng L, Jiménez G, Shvartsman SY, Veraksa A (2016)

Minibrain and Wings apart control organ growth and tissue patterning through down-regulation of Capicua. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **113**, 10583-10588.

Forés M, Papagianni A, Rodríguez-Muñoz L, Jiménez G (2017)

Using CRISPR-Cas9 to study ERK signaling in Drosophila.

Methods Mol. Biol. **1487**, 353-365.

Forés M, Simón-Carrasco L, Ajuria L, Samper N, González-Crespo S, Drosten M, Barbacid M, Jiménez G (2017)

A new mode of DNA binding distinguishes Capicua from other HMG-box factors and explains its mutation patterns in cancer.

PLOS Genetics **13**, e1006622.

Simón-Carrasco L, Graña O, Salmón M, Jacob HKC, Gutierrez A, Jiménez G, Drosten M, Barbacid M (2017)

Inactivation of Capicua in adult mice causes T-cell lymphoblastic lymphoma.

Genes Dev. **31**, 1456-1468.

Papagianni A, Forés M, Shao W, He S, Koenecke N, Andreu MJ, Samper N, Paroush Z, González-Crespo S, Zeitlinger J, Jiménez G (2018)

Capicua controls Toll/IL-1 signaling targets independently of RTK regulation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **115**, 1807-1812.

Simón-Carrasco L, Jiménez G, Barbacid M, Drosten M (2018)

The Capicua tumor suppressor: a gatekeeper of Ras signaling in development and cancer.

Cell Cycle (en prensa).