



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a  
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### OSASUN ZIENTZIAK

**SLUG** genearen erregulazioa eta  
epitelio-mesenkima trantsizioa  
E2F faktoreen eraginpean daude  
minbiziaren testuinguruan

*Ainhoa Eriz, Gartzte Mentxaka,  
Ainhoa Iglesias-Ara,  
Jone Mitxelena eta Ana M<sup>a</sup> Zubiaga*

85-92 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.10>



## ***SLUG* genearen erregulazioa eta epitelio-mesenkima trantsizioa E2F faktoreen eraginpean daude minbiziaren testuinguruan**

Eriz, Ainhoa<sup>1</sup>, Mentxaka, Gartzte<sup>1</sup>, Iglesias-Ara, Ainhoa<sup>1</sup>, Mitxelena, Jone<sup>1,2</sup>, Zubiaga, Ana M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU; <sup>2</sup>IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao  
[ainhoerizm@gmail.com](mailto:ainhoerizm@gmail.com)

### ***Laburpena***

Minbizia pairatzen duten gaixoen artean, heriotzaren arrazoi nagusia metastasia da. Metastasiaren prozesuan, epitelio-mesenkima trantsizioak (EMT) ahalbidetzen du minbizi-zelulak jatorrizko ehunik askatzea eta, ehun sekundarioetara migratuz, tumore berriak bertan sortzea. Lan honetan, ondesteko minbizian gertatzen den EMTan sakondu dugu. E2F1 eta E2F2 transkribapen faktoreek ondesteko minbiziko zeluletan EMTaren inhibizioa eta *SLUG* genearen errepresioa bultzatzen dutela aurkitu dugu. Errepresio hori, neurri batean, *SLUG*en promotorearen aktibitateari eraginez gauzatzen dela frogatu dugu. Badirudi *SLUG*en erregulazioa SMAD6ren bitartez gertatzen dela, izan ere, SMAD6ren galerak, E2F1/2ren ausentzian, *SLUG*en adierazpena eta bere promotorearen aktibitatea emendatzen ditu.

Hitz gakoak: *SLUG*, E2F1, E2F2, metastasia, epitelio-mesenkima trantsizioa (EMT), gene adierazpenaren erregulazioa

### ***Abstract***

*Metastasis is the main cause of death in cancer patients and during its development epithelial-mesenchymal transition (EMT) enables cells to migrate into secondary tissues and create new tumors there. In this work, we describe E2F1 and E2F2 transcription factors as EMT inhibitors in colorectal cancer cells. We present SLUG as a key regulator of this transition, which appears overexpressed upon E2F1/2 loss. E2F1/2 mediated SLUG gene expression regulation involves SLUG promoter activity modulation. Moreover, our results reveal that SMAD6 could play an essential role in SLUG regulation, whose expression is activated in the absence of SMAD6. In fact, downregulation of SMAD6, induced by E2F1/2 silencing, activates SLUG promoter and its expression.*

*Keywords: SLUG, E2F1, E2F2, metastasis, epithelial-mesenchymal transition (EMT), gene expression regulation*

### **1.Sarrera/Uneko egoera**

Tumore primarioaren hedapena gorputzeko leku distaletara, hots, metastasia, minbizia pairatzen duten gaixoen arteko heriotzen arrazoi nagusia da. Hortaz, metastasiaren prebentzioa oinarritzokoa da minbiziari aurre egiteko (Tharp, D. eta Nandana, S., 2019). Osotasun epitelialaren alterazioa ezinbesteko pausoa da kartzinoma primariotik metastasiranzko bidean. Eraldaketa honetan, Epitelio-Mesenkima Trantsizioa (EMT) deritzon transformazio zelularra gertatzen dela proposatu izan da, non zelulak epitelial izatetik mesenkimal izatera pasatzen diren. Zelula epitelialek bereizgarri anitz adierazten dituzte, hauen artean garrantzitsuenak zelula-zelula loturak, zelula-matrize extrazelular loturak eta polaritatea direlarik (Kalluri, R., eta Neilson, E. G., 2003). Prozesu honetan zehar, zelula epitelialek haien polaritatea eta atxikitze gaitasuna galdu eta migrazioa eta inbasio gaitasuna eskuratzen dute, mesenkimal bihurtuz (Nieto, M. A. *et. al.*, 2016). Epitelio-mesenkima trantsizioa ez da soilik minbizien gaiztotze prozesuarekin erlazionatzen. Izan ere, ebolutiboki kontserbatutako prozesu biologiko hau ezinbestekoa da garapen enbrionarioarako eta ehunen homeostiaren mantenturako, gastrulazioa, gandar neuralaren migrazioa eta zaurien sendaketa bultzatuz (Chen, T. *et. al.*, 2017). EMT patologikoan eta EMT fisiologikoan antzeko programa molekularrak aktibatzen dira, baina lehenengo kasuan modu desarautuan. Ondorioz, jatorri epiteliala duten minbizi-zelulek migratzeko ahalmena agertzen dute, zelula amen antzeko ezaugarriak eskuratzen dituzte eta tumoreen aurkako terapiekiko erresistentzia garatzen dute (Guan, X., 2015). EMTak minbizian, eta bereziki metastasian, duen garrantzia kontuan edukita, asko dira prozesu honen erregulazioaren azterketan zentratzen diren ikerkuntza taldeak.

EMT prozesua hainbat mailatan erregulatu daiteke eta bereziki ikertuak izan dira eraldaketa zelular hori transkribapen mailan erregulatu dituzten faktoreak (Dongre, A. eta Weinberg, R. A., 2018). Faktore hauen artean, ikertuenetako bat *SLUG* izan da, zeina biomarkatzaile mesenkimal gisa ezagutzen den.

Izan ere, SLUGen adierazpena emendatu egiten da EMT prozesua gertatzen den heinean. SLUGen adierazpenaren eraginez, zelulak alboko zeluletatik askatzen dira eta migratzeko eta inbaditzeko gaitasuna eskuratzen dute (Lund, K. *et. al.*, 2015; Ganesh, K. *et. al.* 2020). Gainera, SLUGen adierazpena hainbat minbiziren pronostiko txarrarekin eta metastasiaren garapenarekin erlazionatu izan da, minbizi horien artean dago ondesteko minbizia (Toiyama, Y. *et. al.* 2013). Honek, minbiziaren pronostiko txarrarekin erlazionatutako metastasiaren garapenean SLUGen adierazpenaren erregulazio mekanismoak ulertzearen garrantzia azpimarratzen du.

EMTaren erregulazioan parte hartzen duten transkribapen faktore ezagunez gain, azken urteetan EMTaren erregulazailer berri gehiago deskribatu dira. Faktore horien artean, E2F familiako kideak aurkitzen dira, ziklo zelularren erregulazioaz arduratzeagatik ezagutzen direnak, batik bat. Hala ere, ziklo zelularretik haratago beste funtzio zelular batzuetan ere parte hartu dezaketela ikusi da, horien artean EMTan, eta E2Fak derregulatuta agertzen direnean ehunen homeostiaren galera edota minbizia eragin dezaketela erakutsi dute lan ugari (Kent, L. N. eta Leone, G., 2019; Jusino, S. eta Saavedra, H. I., 2019). Izan ere, gure ikerketa taldeak deskribatu izan du E2F1 eta E2F2 transkribapen faktoreak beharrezkoak direla saguen areako zeluletako fenotipo epitelialaren mantenurako eta ezaugarri mesenkimalen inhibizioarako, eta faktore hauek epitelio-mesenkima egoeren arteko orekan zeregin garrantzitsua betetzen dutela (Iglesias-Ara, A. *et. al.*, 2004, 2015). Hala ere, E2F1/2ren galeraren ondorioz EMT trantsizio honen aktibazioa baimentzen duten mekanismo molekularrak ez dira oraindik ezagunak.

## 2. Ikerketaren helburuak

Lan honen helburu nagusia metastasiaren garapenerako funtsezkoa den EMT prozesuan sakontzea da, eta bereziki, E2F faktoreek EMTaren erregulaziorako dituzten mekanismo molekularrak aztertzea.

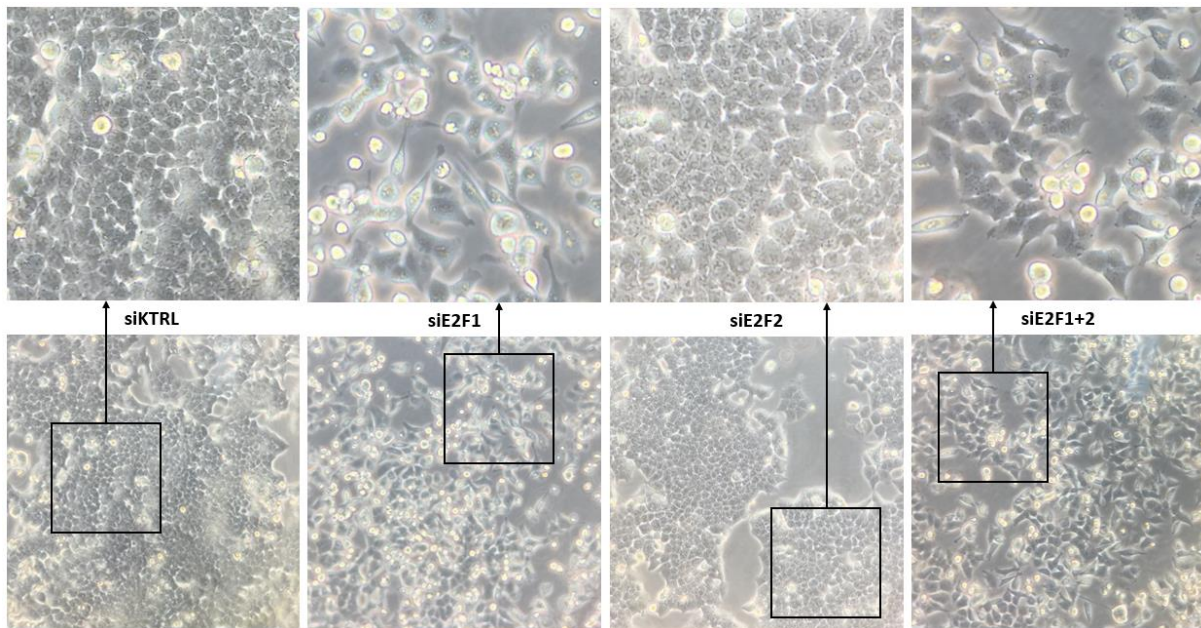
## 3. Ikerketaren muina

### 3.1. E2F1 eta E2F2 faktoreen galerak EMTaren fenotipoa eta SLUGen adierazpena induitzen ditu

E2F1 eta E2F2 faktoreek EMT prozesuan betetzen duten funtzioa definitzeko, ondesteko kartzinoma jatorria duen HCT116 zelula-lerroa erabili zen, zeinak ezaugarri epitelialak dituen eta EMT prozesua aztertzeko oso erabilia izan den (Rajput, A., *et. al.*, 2008). Ondeste-kartzinomako lerro zelular hau erabilita, *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpena burutu zen interferentziazko RNA txikiak erabiliz (siRNA). Saiakerak gene bakoitza modu indibidualean eta bateratuan isilaraziz burutu ziren, bi faktore hauen funtzio amankomunak eta espezifikoak aztertu nahian.

EMT prozesuaren adierazle den ezaugarrietako bat zelula epitelialek duten polaritate apikal-basalaren galera eta zelula mesenkimalek duten forma fusiformearen eskuratzea da. Horrekin batera, zelulek beraien arteko loturak galtzen dituzte, eta sortzen dituzten epitelio geruzak desegiten dira (Kalluri, R., eta Neilson, E. G. 2003). Espero moduan, kontrol negatiboarekin (siKTRL) transfektatutako HCT116 zelulek geruza bat osatzen zutela ikusi zen, eta modu konpaktuan lotuta zeudela behatu zen (1. irudia). *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpen bateratua jasandako zelulek (siE2F1+2) ezaugarri mesenkimalak erakutsi zituzten: zelulak haien artean askeago eta forma fusiformearekin agertu ziren, EMT prozesua jaso dutela iradokiz. Geneen bakarkako isilarazpenari dagokionez, *E2F1* isilarazitako laginetan (siE2F1) zelulek fenotipo mesenkimala erakusten zutela ikusi zen, isilarazpen bikoitzaren antzekoa. *E2F2* isilarazpenaren kasuan (siE2F2), zelulek kontrolarekiko antzekotasuna erakusten zuten (1. irudia).

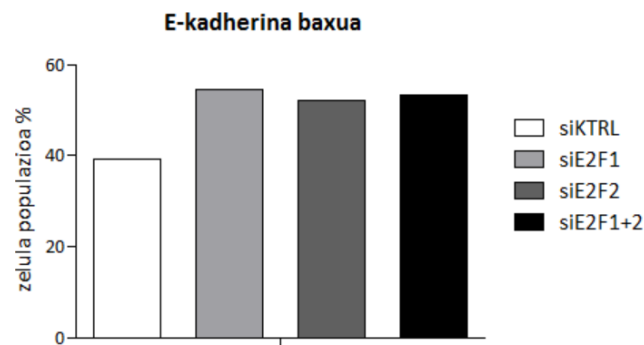
**1. irudia. HCT116 ondeste-kartzinoma zelula lerroan *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpenak eragiten du zelulek morfologia mesenkimala eskuratzea.** Baldintza bakoitzean HCT116 zelulak siKTRL, siE2F1 edo/eta siE2F2 interferentziazko RNAekin transfektatu ziren 72 orduz eta zelulen irudiak eskuratu ziren mikroskopio optikoa erabiliz.



Zelula epitelialek erakusten duten beste bereizgarrietako bat zelulen arteko loturak dira. Horientzat beharrezkoa den E-kadherinaren adierazpena eta honen mintz plasmatikoko lokalizazioa dira zelula epitelialen markatzailetzat erabili ohi diren ezaugarriak, beste batzuen artean. Hau honela, E2Fen eragina EMT prozesuan aztertzeko, fluxu-zitometria bidez (FACS bidez, ingelesezko *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) zelulen mintz plasmatikoko E-kadherinaren adierazpena aztertu zen *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpen sinplea edo bikoitza burutu ostean (2. irudia). E-kadherinaren maila baxua adierazten duen zelulen populazioan zentratu ginen, zeina EMTa ematekotan emendatu egin beharko litzatekeen, zelulen arteko loturen galeraren adierazle. Isilarazi gabeko laginean (siKTRL) E-kadherinaren maila baxua adierazten zuten zelulen atalasea %39-an ezarri zen, zelula populazioak aurkezten duen E-kadherina tindaketaren erpin maximotik behera ezarriz. *E2F1* isilarazitako laginean (siE2F1), *E2F2* isilarazitakoan (siE2F2) eta bi faktore hauen isilarazpen bikoitzaren kasuan (siE2F1+2) zelula-populazio horren portzentajearen igoera ikusi zen, %54, %52 eta %53-ra, hurrenez hurren. Honek, *E2F1* eta *E2F2* geneen banakako zein isilarazpen bateratuaren ondorioz mintz plasmatikoko E-kadherinaren adierazpena murriztu egiten dela adierazten du (2.irudia).

Emaitza hauen arabera, E2F1 eta E2F2 faktoreen galerak EMTarekin erlacionatutako ezaugarrien eskuratzea eragiten du ondesteko minbiziko zeluletan. Datu hauek aurretik ikerketa taldean eskuratutako emaitzak indartzen dituzte. Izan ere, E2F1/2ren galerak EMTari lotutako migrazio gaitasunaren eskuratzea eragiten duela frogatu da (Mentxaka, G., argitaratu gabeko datuak).

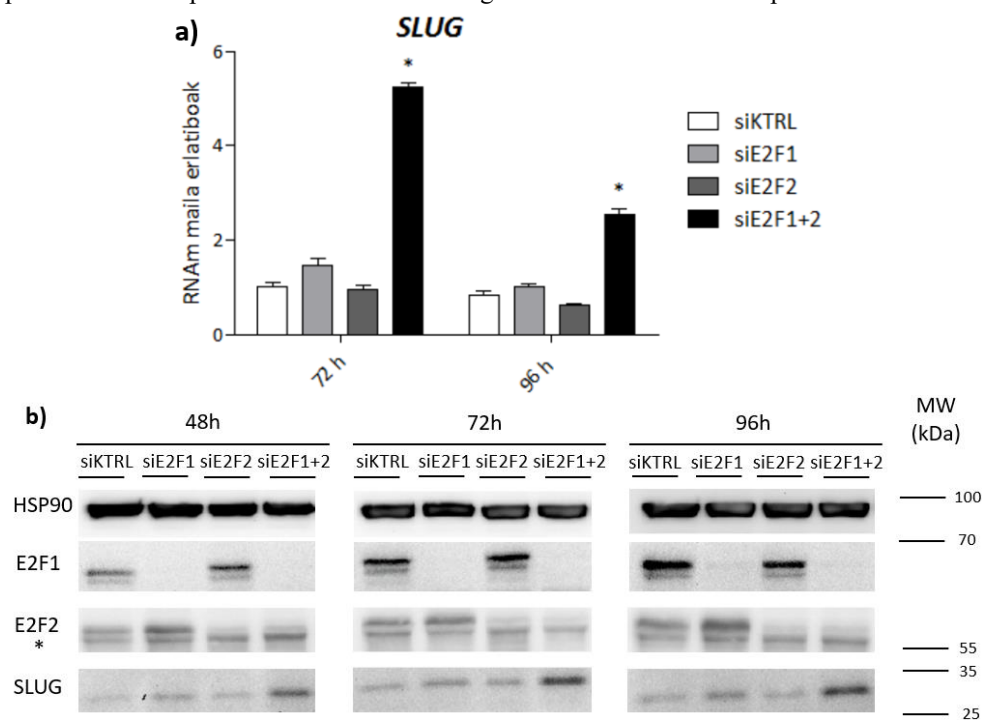
**2. irudia. *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpenak E-kadherinaren maila baxua adierazten duten HCT116 zelulen populazioaren emendioa eragiten du.** HCT116 zelulak siKTRL, siE2F1 edo/eta siE2F2rekin transfektatu ziren eta mintzeko E-kadherina markatzailearen adierazpena aztertu zen FACS bidez 120 orduren buruan, E-kadherinarekiko espezifikoa den antigorputza erabiliz. Bi errepliken batzbestekoak adierazten dira.



*E2f1/E2f2*-knockout saguetan egin ditugun analisi transkriptomikoek erakutsi digutenaren arabera, *E2f1/E2f2* geneen gabeziaren ondorioz EMTarekin erlazioatutako hainbat generen adierazpena emendatuta agertzen da, *Slug* genearena barne (Iglesias-Ara, A. *et al.*, 2004). Emaidza hau kontutan harturik, lan honetan *SLUG* genearen erregulazioaren ikerketan zentratu gara, *E2F1/E2F2* faktoreek minbizi-zelulekiko EMTan duten eragina aztertzeko asmoz.

SLUGen erregulazioa aztertzeko ondesteko minbiziko lerro zelularrean, honen adierazpena aztertu genuen RNA mezulari mailan RT-qPCR bidez eta proteina mailan *western* plapaketa bidez, *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpen bakuna eta bikoitza eragindako egoeretan. Saguetan eginiko analisi transkriptomikoan eskuratutako emaitzak baieztatuz, *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpen bikoitza eragiterakoan SLUGen adierazpena emendatuta agertzen zela ikusi genuen RNA mezulari zein proteina mailan. Modu xumeago batean, *E2F1*en isilarazpen bakunak ere SLUGen adierazpenaren igoera eragiten duela ikusi genuen (3.irudia).

**3.irudia. HCT116 zeluletan *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpenak SLUGen adierazpenaren emendioa eragiten du.** HCT116 zelulak siKTRL, siE2F1, siE2F2 edo bi geneen (siE2F1+2) aurkako siRNAekin transfektatu ziren eta SLUGen adierazpena aztertu zen a) RNAm mailan RT-qPCR bidez eta b) proteina mailan *western* plapaketa bidez. RNAm mailan *SLUG*en adierazpena *VPS29*, *OXAIL* eta *EIF2C2* gene endogenoekiko normalizatu zen. Hiru esperimendu independenteren esperimendu adierazgarria aurkezten da, hiru erreplika teknikoren batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak adieraziz. Esangarritasuna siKTRL-rekiko (\*) *p* balioa  $\leq 0,05$  bezala ezarri zen. Proteina mailan, isilarazpena modu egokian eman zen aztertzeko *E2F1* eta *E2F2* proteinen adierazpena ere aztertu zen eta karga kontrol moduan HSP90 proteina erabili zen.



\* Inespezifiktasuna

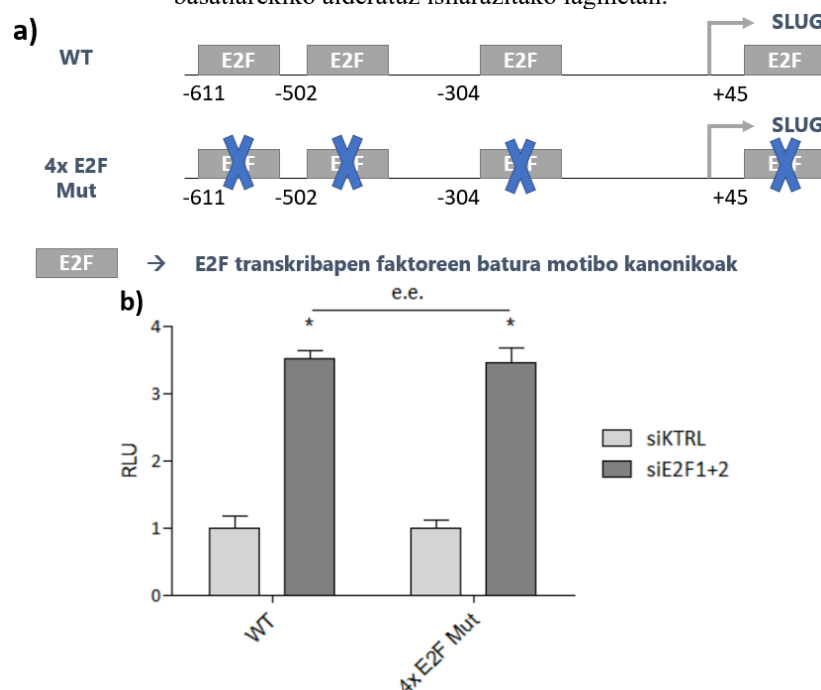
Beraz, gure datuek E2F1 eta E2F2ren ausentzian SLUG markatzaile mesenkimalaren adierazpena emendatu egiten dela erakusten dute, eta iradokitzen dute SLUG izan daitekeela E2F faktoreen gabezia gertatzen den EMTa bultzatu dezakeen aktibatzaile molekularretako bat.

### 3.2. E2F1 eta E2F2 faktoreen galerak SLUGen promotorearen aktibitatea emendatzen du, E2F leku kanonikoekiko modu independentean

E2F1 eta E2F2ren galerak dakarren SLUGen adierazpenaren emendapenak, E2F faktore hauek SLUGen adierazpenaren errepresore gisa dihardutela iradokitzen eraman gintuen. E2F1 eta E2F2k SLUGen adierazpenaren inhibizioa bere promotoreari eraginez bideratzen duten aztertu nahian, luziferasa entseguak burutu ziren SLUGen promotorea daraman luziferasa bektore erreportari bat erabilia. Erreportari horrek daraman promotorean 4 E2F motibo kanoniko agertzen dira (4a. irudia). Zelulak SLUGen bektore erreportariarekin transfektatu ziren, E2F1 eta E2F2 isilarazita edo ez. E2F1 eta E2F2ren isilarazpenak (siE2F1+2) SLUGen promotorearen aktibitatearen emendioa eragin zuen kontrolarekin alderatuta (siKTRL).

Behatutako transkribapen mailako errepresioa SLUGen promotorean dauden lau E2F motibo kanonikoen bitartez (4a. irudia) ematen den aztertzeko, motibo horiek mutatuak dituen bektore erreportari bat erabili zen (4x E2F Mut). Promotore basatiaren antzera, mutatuaren kasuan (4x E2F Mut) ere, E2F1 eta E2F2ren isilarazpenak SLUGen promotorearen aktibitatearen igoera eragin zuen, eta mutatuak ez zuen promotore basatiarekiko aldaketa esangarririk aurkeztu (4b.irudia). Datu hauek, E2F1 eta E2F2 faktoreek SLUG genearen adierazpenaren inhibitzaile moduan jokatzeko dutela erakusten dute, eta neurri batean behintzat, erregulazio hau transkribapen mailan gertatzen dela ondorioztatu daiteke, SLUGen promotorearengan eraginez. Hala ere, badirudi E2F1 eta E2F2k bideratutako SLUG promotorearen errepresioa ez dagoela aztertutako E2F motibo kanonikoen bidez bideratuta. Baliteke, beraz, SLUGen adierazpenaren erregulazioa beste motibo batzuen bitartez ematea edo E2F1 eta E2F2k beste transkribapen faktore batzuen elkarlana behar izatea erregulazio hori bideratzeko.

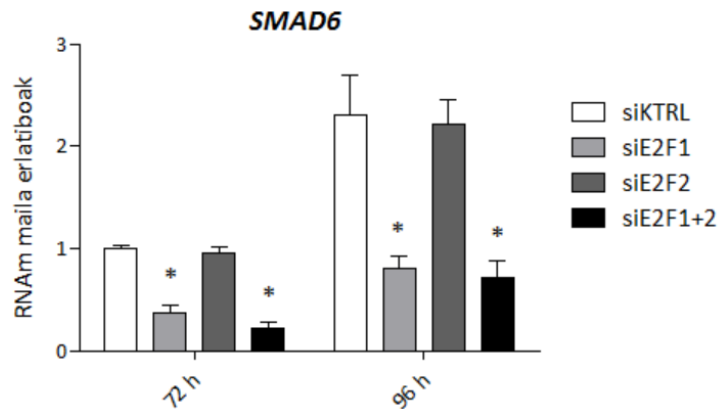
**4. irudia. E2F1 eta E2F2 geneen isilarazpenak HCT116 zeluletan SLUGen promotorearen aktibitatearen emendioa eragiten du. a)** SLUG genearen promotoreak 4 E2F batura gune kanoniko aurkezten ditu, *ConSite* eta *MoLoTool* erreminta bioinformatikoen bidez identifikatutakoak. Promotore basatiak (WT) motibo kanoniko hauek mantentzen ditu eta 4x E2F Mut promotore mutanteak lau motiboetan mutazioak ditu. **b)** HCT116 zelulak kontrolerako siRNA (siKTRL) edo E2F1 eta E2F2 geneen isilarazpena eragiteko siRNAekin (siE2F1+2) transfektatu ziren 24 orduz. Baldintza bakoitzean, zelulak SLUG promotore basatiarekin (WT) edo 4 E2F leku kanonikoak mutatuak dituen promotorearekin (4x E2F Mut) transfektatu ziren. Datuen normalizaziorako lagin guztiak *Renilla* luziferasa adierazten duen plasmidoarekin transfektatu ziren. Lagin bakoitzetik eskuratutako ipurtargi luziferasa balioak *Renilla* balioekiko normalizatu ziren, emaitzak RLU (ingelesezko *Relative Luciferase Units*) bezala adierazi dira. Hiru esperimentu independenteren esperimentu adierazgarria aurkezten da, hiru erreplika teknikoren batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak adieraziz. Esangarritasuna siKTRL-rekiko (\*)  $p$  balioa  $\leq 0,05$  bezala ezarri zen. Aldaketa ez-esangarriak (e.e.) adierazten dira promotore mutatuak basatiarekiko alderatuz isilarazitako laginetan.



### 3.3. SMAD6k SLUGen promotorearen aktibitatea eta bere adierazpena inhibitzen ditu

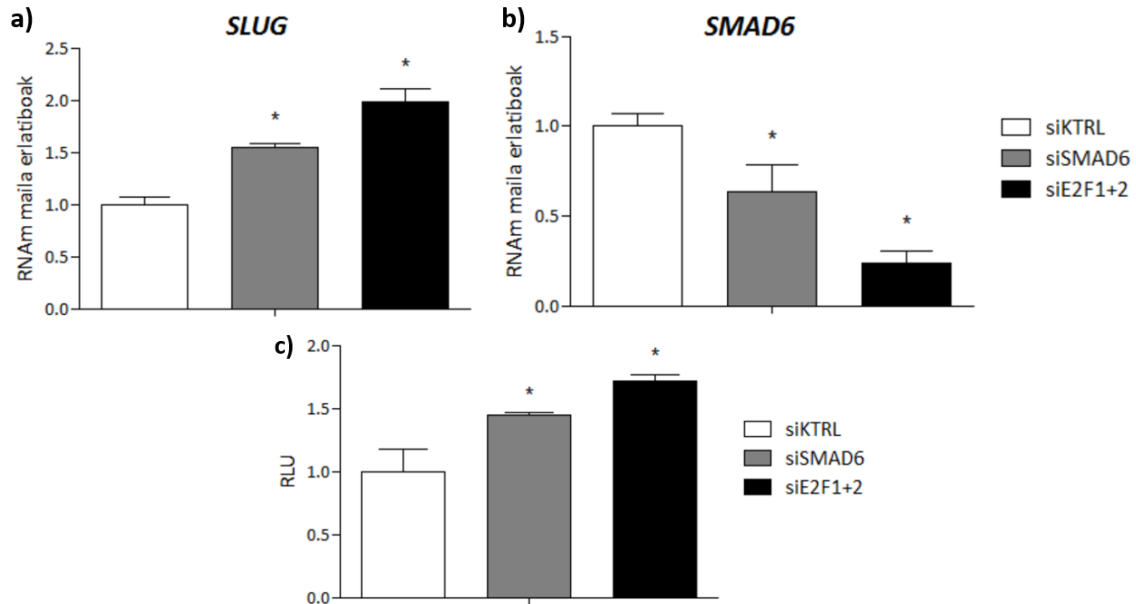
Baliteke E2F1/2k beste transkribapen faktore batzuen kooperazio funtzionala behar izatea SLUGen adierazpena erregulatzeko. Izan ere, E2F familiako kideak sarritan beste transkribapen faktore batzuekin elkar lanean aritzen dira gene ituen adierazpena erregulatzeko, esaterako, SMAD faktoreekin. Hain zuzen ere, SMAD faktoreek EMT prozesuaren erregulazioan parte hartzen dutela deskribatu izan da (Dongre, A., eta Weinberg, R. A. 2018), eta horien artean SMAD6 aurkitu da (Desgrosellier, J. S. *et al.*, 2005; Wang, H., eta Ji, X., 2020). Aurrekari hauek kontutan harturik, lehendabizi aztertu zen *E2F1* edo/eta *E2F2*ren isilarazpenaren eragina *SMAD6* genearen adierazpenean (5 irudia). HCT116 zeluletan *E2F1*en isilarazpen bakunak (siE2F1), zein faktore honen eta *E2F2*ren isilarazpen bateratuak (siE2F1+2), *SMAD6* genearen adierazpenaren murrizpena eragiten duela ikusi zen.

**5. irudia. *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpenak *SMAD6*ren adierazpena murrizten du RNAm mailan.** HCT116 zelulak kontrol siRNAekin, *E2F1* edo/eta *E2F2* geneen aurkako siRNAekin transfektatu ziren eta hauen eragina aztertu zen *SMAD6* genearen adierazpenean RT-qPCR bidez. Hiru erreplika teknikoren batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak adieraziz, (\*)  $p$  balioa  $\leq 0,05$  bezala ezarri zen.



Ondoren, SMAD6k SLUG markatzaile mesenkimalaren adierazpenaren erregulazioan parte hartu dezakeen aztertu zen. Horretarako, HCT116 zeluletan *SMAD6* genea isilarazi zen siRNA bidez, eta honen eragina aztertu zen *SLUG*en adierazpenean RNAm mailan (6a. irudia). Modu berean *E2F1* eta *E2F2* faktoreen isilarazpen bateratua erabili zen, kontrol positibo moduan. *SMAD6* genearen RNAm maila erlatiboak ere aztertu ziren isilarazpenaren eraginkortasuna aztertzeko (6b. irudia). *SMAD6* genearen isilarazpenak (siSMAD6) *SLUG*en adierazpenaren emendapena eragin zuela ikusi zen, siE2F1+2 egoeran bezala, nahiz eta SMAD6rekin alderatuz E2F1/2ren efektua handiagoa izan (6a.irudia). 3.irudian erakutsitako efektuarekin alderatuz, kasu honetan *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpenaren eragina xumeago da *SLUG*en adierazpenarengan. Baliteke hau siRNAREN esperimendu arteko eraginkortasun aldaketagatik izatea. Jarraian, SMAD6ren efektua *SLUG*en promotorearengan aztertzeko luziferasa entseguak burutu ziren *SLUG*en promotorearen aktibitatea SMAD6ren presentzian zein ausentzian neurtuz (6c.irudia). Nabarmenki, *SMAD6* genearen isilarazpenak *SLUG*en promotorearen aktibitatearen emendioa eragiten zuela ikusi genuen (6c.irudia). Datu hauek iradokitzen dute *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpeneko testuinguruan gertatzen den *SLUG*en mailaren emendioa neurri batean SMAD6ren bitartekoa izan daitekela. Izan ere, *E2F1* eta *E2F2* geneen deplezioak, *SMAD6*ren adierazpenaren murrizpena eragiten du, *SLUG*en adierazpena emendatzen den bitartean.

**6. irudia. SMAD6 faktorearen isilarazpenak SLUGen adierazpenaren eta honen promotorearen aktibitatearen emendioa eragiten du.** HCT116 zelulak kontrol negatiborako (siKTRL), SMAD6 genearen isilarazpenerako (siSMAD6) eta E2F1 eta E2F2 faktoreen isilarazpenerako (siE2F1+2) siRNAekin transfektatu ziren 72 orduz. RT-qPCR bidez a) SLUG eta b) SMAD6 geneen RNAm maila erlatiboak aztertu ziren. c) Luziferasa entsegu bidez SLUGen promotorearen aktibitatea neurtu zen aipatutako isilarazpen baldintzetan. Grafikoan hiru erreplika teknikoren batezbestekoak eta desbideraketa estandarrek aurkezten dira. (\*) *p* balioa  $\leq 0,05$  bezala ezarri zen.



#### 4. Ondorioak

Lan honetan bildutako emaitzetan oinarrituta, E2F1 eta E2F2 beharrezkoak lirateke egoera epitelialaren mantenurako eta ezaugarri mesenkimalen inhibiziorako ondosteko minbiziko zeluletan. Hori, neurri batean, SLUG markatzailearen adierazpena inhibituz burutzen dutela dirudi, zehazki bere promotorearen aktibitatea inhibituz. Erregulazio hori E2F leku kanonikoekiko modu independentean gertatzen da. Are gehiago, E2F1/E2F2ren bitartez induzitzen den SMAD6 faktoreak SLUGen adierazpena inhibitzen du bere promotorearen aktibitatearengan eraginez. Horrek iradokitzen du SMAD6-SLUGen arteko elkarlana E2F1 eta E2F2 faktoreen galera testuinguruan EMT eraldaketa bultzatzeko gako garrantzitsua dela.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honek erakusten du E2F1ek eta E2F2k SLUGen adierazpenean ezinbesteko eginkizuna jokatzeko dutela. Hau ikusita, eta kontutan hartuta SLUGek minbiziaren gaiztotze prozesuan eta metastasiaren garapenean duen garrantzia, etorkizunean ikertzeko zenbait erronka aurkezten ditu.

Alde batetik, E2F1 eta E2F2k bideratutako SLUGen adierazpenaren erregulazioan sakontzeko, garrantzitsua litzateke aztertzea zeintzuk diren erregulazio hau gertatzeko beharrezkoak diren SLUGen promotorearen eskualdeak eta E2F1/2 faktoreek sekuentzia erregulatzaile ez-kanoniko hauei zuzenean lotzen diren ebaztea.

Bestetik, gure datuen arabera E2F1/2ren ausentzian ikusitako SLUGen emendapena neurri batean SMAD6k erregulatu dezakeela ikusita, interesgarria litzateke SMAD6k EMTaren modulazioan daukan zereginean sakontzea, bereziki SLUG markatzaile mesenkimalaren adierazpenaren erregulazioan.

Honela, SLUGen erregulazioari buruz dagoen ezagutzan sakontzea espero da, etorkizunean mekanismo hauek minbiziaren prebentzio edo tratamendurako erabiltzeko ikuspegiarekin.



## 6. Erreferentziak

- Chen, T., You, Y., Jiang, H., & Wang, Z. Z. (2017). Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, 232(12), 3261–3272.
- Desgrosellier, J. S., Mundell, N. A., McDonnell, M. A., Moses, H. L., & Barnett, J. V. (2005). Activin receptor-like kinase 2 and Smad6 regulate epithelial–mesenchymal transformation during cardiac valve formation. *Developmental Biology*, 280(1), 201–210.
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2018). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 20(2):69-84.
- Ganesh, K., Basnet, H., Kaygusuz, Y., Laughney, A. M., He, L., Sharma, R., ... Massagué, J. (2020). LICAM defines the regenerative origin of metastasis-initiating cells in colorectal cancer. *Nature Cancer*, 1(1), 28–45.
- Guan X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta pharmaceutica Sinica*. B,5(5),402–418.
- Iglesias, A., Murga, M., Laresgoiti, U., Skoudy, A., Bernales, I., Fullaondo, A., Moreno, B., Lloreta, J., Field, S. J., Real, F. X., & Zubiaga, A. M. (2004). Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice. *The Journal of clinical investigation*, 113(10), 1398–1407.
- Iglesias-Ara, A., Zenarruzabeitia, O., Buelta, L., Merino, J., & Zubiaga, A. M. (2015). E2F1 and E2F2 prevent replicative stress and subsequent p53-dependent organ involution. *Cell death and differentiation*, 22(10), 1577–1589.
- Jusino, S., & Saavedra, H. I. (2019). Role of E2Fs and mitotic regulators controlled by E2Fs in the epithelial to mesenchymal transition. *Experimental Biology and Medicine*, 153537021988136.
- Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1776–1784.
- Kent, L. N., & Leone, G. (2019). The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 19(6):326-338.
- Lund, K., Dembinski, J. L., Solberg, N., Urbanucci, A., Mills, I. G., & Krauss, S. (2015). Slug-dependent upregulation of LICAM is responsible for the increased invasion potential of pancreatic cancer cells following long-term 5-FU treatment. *PLoS one*, 10(4), e0123684.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.
- Rajput, A., Dominguez San Martin, I., Rose, R., Beko, A., LeVea, C., Sharratt, E., ... Wang, J. (2008). Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. *Journal of Surgical Research*, 147(2), 276–281.
- Tharp, D., & Nandana, S. (2019). How Prostate Cancer Cells Use Strategy Instead of Brute Force to Achieve Metastasis. *Cancers*, 11(12), 1928.
- Toiyama, Y., Yasuda, H., Saigusa, S., Tanaka, K., Inoue, Y., Goel, A., & Kusunoki, M. (2013). Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 34(11), 2548–2557.
- Wang, H., & Ji, X. (2020). SMAD6, positively regulated by the DNMT3OS-miR-134-5p axis, confers promoting effects to cell proliferation, migration and EMT process in retinoblastoma. *Cancer cell international*, 20, 23.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honen emaitzak Ainhoa Eriz Micieces-en Master Amaierako Lanaren eta Gartzte Mentxakaren doktoretza tesiaren ondorio dira. Gartzte Mentxakak Hezkuntza, Kultura eta Kirol Ministerioaren doktoretza aurreko laguntza jaso du (FPU13/04388). Ana Maria Zubiagak Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación RTI2018-097497-B-I00), Eusko Jaurlaritzako (Hezkuntza Saila. Erref.:IT1257-19) eta UPV/EHU-ko (UFI11/20) diru laguntzak jaso ditu.