

Evaluación de la ausencia de SOX9 sobre el fenotipo troncal en la línea HCT116 de CCR

Mariana Avendaño-Félix^a, César López-Camarillo^b, Mercedes Bermudez^a, Maribel Aguilar-Medina^a, Geovanni Romero-Quintana^a, Rosalío Ramos-Payán^{a*}

^aFacultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. CP 80010, Culiacán, Sinaloa, México.

^bLaboratorio de Oncogenómica y Proteómica del cáncer. Universidad Autónoma de la Ciudad de México. CP 03100, Ciudad de México, México.

*rosaliorp@uas.edu.mx

Palabras clave: CSCs, SOX9, CCR

Introducción

El cáncer colorectal (CCR) es la segunda causa de muerte a nivel mundial [1]. SOX9 es expresado en células troncales intestinales y células de Paneth, promoviendo la carcinogénesis [2]. Los tumores sólidos presentan subpoblaciones de células troncales cancerosas (CSCs) las cuales se asocian a la recaída del paciente, resistencia a la quimioterapia y metástasis [3, 4]. Actualmente la participación de SOX9 en el mantenimiento del fenotipo troncal no ha sido dilucidada, por lo que en este trabajo proponemos evaluar el efecto del abatimiento de SOX9 en el fenotipo troncal.

Metodología

Los marcadores de superficie CD133, CD44 y CD24 fueron evaluados por citometría de flujo, así como la expresión de los genes de pluripotencia NANOG, OCT4, KLF4 y SOX2 por RT-qPCR en las líneas celulares de CCR Caco-2, HT-29, HCT116 y SW-480. Posteriormente se realizó aislamiento de CSCs a partir de la línea HCT116 por formación de esferas en condiciones de ultra baja adherencia y dichas CSCs generadas fueron evaluadas por inmunofenotipificación y RT-qPCR de los marcadores y genes anteriormente mencionados. Se prosiguió con la generación de un knock out de SOX9 usando el sistema CRISPR-Cas9 y una vez generada la línea SOX9 KO, se prosiguió a realizar una caracterización morfológica con tinción de Giemsa e inmunofluorescencia usando DAPI, faloidina y anti-SOX9, así como evaluación de los marcadores de superficie CD133, CD44, CD24, CD90, CD105 y CD73 y RT-qPCR de los genes de pluripotencia NANOG, OCT4, KLF4 y SOX2 y los genes relacionados a EMT: CTNBN1, CDH1, CDH2 y VIM.

Resultados y discusión

HCT116 es la línea con mayor expresión de CD133⁺/CD44⁺/CD24⁺, así como de NANOG, OCT4 y KL4, lo cual ya ha sido previamente reportado [5]. La HCT116 tuvo capacidad de formar esferas, presentado la población enriquecida una mayor expresión de los genes de troncalidad, sin embargo, no hubo un cambio significativo entre la HCT116 (89.7%) y las HCT116-CSCs (92.2%) en el marcador CD133, el cual es el marcador más importante en el aislamiento de las CSCs en colón [6]. Se logró obtener una clona con una eliminación de ~2100 pb en el gen de SOX9, con nula expresión de SOX9 a nivel RNA y proteína. La línea SOX9 KO generada, presentó un cambio en la morfología con una pérdida de citoplasma en comparación a la línea parental, lo cual podría estar relacionado con cambios en la

expresión de proteínas de adhesión [7]. Además se encontró una mayor expresión de SOX2, OCT4 y KLF4, posiblemente debido a un bucle de retroalimentación reguladora positiva entre estos factores de transcripción [8]. Sin embargo, no hubo un cambio en el marcador CD133, pero si una disminución de CD73, el cual es regulado directamente por SOX9 [9]. Se ha descrito que SOX9 regula el proceso de EMT con la disminución de la expresión de CDH1 y un aumento de CDH2 [10], sin embargo, nuestros resultados no coinciden con esos hallazgos.

Conclusiones

HCT116 es un modelo adecuado para evaluar el papel de SOX9 en el fenotipo troncal, sin ser necesario realizar enriquecimiento de CSCs. Se logró realizar un KO de SOX9 exitoso en la línea HCT116, observándose cambios morfológicos, así como cambios en la expresión de genes involucrados en el fenotipo troncal.

Participación de los autores: Autor1: trabajo experimental, Autor2: director de tesis, Autor3: análisis de datos, Autor4: análisis de datos, Autor5: análisis estadístico, Autor6: director de tesis

Referencias

1. WHO. Cancer Fact sheet. World Health Organization 2018; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (consultado el día 15 de octubre del 2019).
2. Bastide, P., et al., Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*, 2007. 178(4): p. 635-48.
3. Ayob, A.Z. and T.S. Ramasamy, Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of Biomedical Science*, 2018. 25(1): p. 1-18.
4. Huang, R. and E.K. Rofstad, Cancer stem cells (CSCs), cervical CSCs and targeted therapies. *Oncotarget*, 2017. 8(21): p. 35351-35367.
5. Chen, K.L., et al., Highly enriched CD133(+)/CD44(+) stem-like cells with CD133(+)/CD44(high) metastatic subset in HCT116 colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 2011. 28(8): p. 751-63.
6. Ma, L., et al., ABCG2 is required for self-renewal and chemoresistance of CD133-positive human colorectal cancer cells. *2016*. 37(9): p. 12889-12896.
7. Francis, J.C., et al., SOX9 is a driver of aggressive prostate cancer by promoting invasion, cell fate and cytoskeleton alterations and epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*, 2018. 9(7): p. 7604-7615.
8. Domenici, G., et al., A Sox2-Sox9 signalling axis maintains human breast luminal progenitor and breast cancer stem cells. *Oncogene*, 2019. 38(17): p. 3151-3169.