



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Nukleosidoen bidezko
tratamenduak ondesteko minbizi
zelulen egonkortasun genomikoa
berreskuratzen du baina ez du
migratzeko gaitasuna ekiditen**

*Ainhoa Eriz, Gartzte Mentxaka,
Ekaitz Madariaga,
Liher Arrizabalaga,
Ainhoa Iglesias-Ara, Jone Mitxelena
eta Ana M^a Zubiaga*

153-160 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.18>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



LAGUNTZAILEAK



Nukleosidoen bidezko tratamenduak ondesteko minbizi zelulen egonkortasun genomikoa berreskuratzen du baina ez du migratzeko gaitasuna ekiditen

Ainhoa Eriz¹, Gartze Mentxaka¹, Ekaitz Madariaga¹, Liher Arrizabalaga¹,
Ainhoa Iglesias-Ara¹, Jone Mitxelena^{1,2}, Ana M. Zubiaga¹

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU; ²Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao
ainhoa.eriz@ehu.eus

Laburpena

Ezegonkortasun genomikoa minbizi zelulen bereizgarrietako bat da. Izan ere, genomaren osotasuna galtzeak hainbat hautespen abantaila ematen dizkie minbizi zelulei, tumoreen progresioa eta metastasia errazten dutenak. Lan honetan, E2F1 eta E2F2 transkripzio-faktoreen gabeziak, ondesteko minbizi zeluletan ezegonkortasun genomikoa eragiten duela erakutsi dugu. Gainera, E2F1/2ren gabeziak zelulen migratzeko gaitasuna emendatzen duela frogatu dugu. Gure erudian bi fenotipo hauek mekanistikoki erlazionatuta zeuden aztertzeko, nukleosidoen bidezko tratamendua erabili genuen, ezegonkortasun genomikoa erreskatatu zuela frogatuz. Aldiz, ez zuen eraginik izan E2F1/2k erregulatutako migrazio gaitasunean. Beraz, E2F1/2ren galerak eragiten dituen ezegonkortasun genomikoa eta migratzeko gaitasuna modu independentean erregulatzen direla proposatzen dugu.

Hitz gakoak: E2F1/2, ondesteko minbizia, ezegonkortasun genomikoa, migrazioa, nukleosidoak

Abstract

Genome instability is a hallmark of cancer. In fact, the loss of genome integrity grants cancer cells with several advantages that facilitate tumor progression and the ability to develop metastasis. In this work, we show that in colorectal cancer cells the absence of E2F1 and E2F2 transcription factors induces genomic instability. Importantly, the loss of E2F1/2 activity increases cell migration capacity and pro-metastatic traits. To test whether these two phenotypes were related in our model, we exogenously supplied cells with nucleosides to rescue genomic instability. However, increased migration capacity induced by E2F1/2 loss was not affected by nucleoside treatment. Therefore, the loss of E2F activity promotes genome instability and migration capacity through independent mechanisms.

Keywords: E2F1/2, colorectal cancer, genome instability, migration, nucleosides

1. Sarrera eta motibazioa

Ziklo zelularra deritzon zatiketa prozesuari esker zelula bakarra gai da bere materiala, DNA barne, bikoiztu eta bi zelula alaba sortzeko. Ezinbestekoa da bikoizketa prozesu hau estuki erregulatuta egotea, akatsak saihesteko edota pairatutako akatsak zelula alabetara hedatu ez daitezen (Rubin et. al. 2020). Minbizia gorputzeko zelulen hazkuntza modu desarautuan gertatzen denean azaltzen da. Honen erantzuleetako bat zelulen bikoizketa prozesuan parte hartzen duten geneetan sortutako mutazioak dira, hala nola mutazio puntualak, baita gene osoen kopia irabazi zein galera eragiten dutenak ere (Matthews et. al. 2021). Hala, oso ohikoa da minbizi bakar batean ehunka edota milaka mutazio zenbatzea. Izatez, tumore zelulek mutazioak pilatzeko joera dute, bai gene mailakoak bai eta kromosoma mailakoak ere. Izaera hori, ezegonkortasun genomiko deritzona, tumorigenisirantz bultzatzen duen indar nagusitzat hartzen da, eta 2000. urtean Hanahan eta Weinberg-ek minbiziaren bereizgarrien artean barneratu zuten “Minbiziaren bereizgarriak” (ingelesez *Hallmarks of Cancer*) izenburuko artikulu ospetsuan (Hanahan eta Weinberg, 2000; Hanahan eta Weinberg, 2011). Ezaguna da DNAREN erreplikazioa prozesu zaurgarria dela zeluletan. Izan ere, ugaztun zelula bat zatitzen den aldiro, bere material genetiko guztia bikoiztu egin behar da, hau da, milaka milioi nukleotido zehatz-mehatz kopiatu behar dira. Neurrigabeko hazkuntza zelularra sustatzeko, minbizi zeluletan gehiegizko DNA bikoizketa gertatzen da, eta horrek beharrezkoak diren nukleotidoen eta eskuragarri dauden nukleotido kantitateen artean desoreka bat sortzen duela proposatu izan da (Bester et. al. 2011, Diehl et. al. 2022). Nukleotido maila mugatu honen iturria nukleotidoen sintesi bidezidorretako entzimen adierazpen murrizta edota aktibitate eskasa izan daitezke. Desoreka honek, erreplikazio-estresa deritzon egoera eta ezegonkortasun genomikoa eragin ditzake (Diehl et. al. 2022). Nahiz eta gehiegizko ezegonkortasun genomikoa kaltegarria izan daitekeen, mutazioek minbizi zelulei hautespen abantailak eskain diezazkiekete. Izan ere, ezegonkortasun

genomikoak tumorearen eboluzioa bermatzen du, minbizi zelulen gaitasun inbaditzaileak eta metastasiaren garapena bultzatuz adibidez (Bakhoun et. al. 2018, Novikov et. al. 2021, Solé et. al. 2022). Beraz, ezegonkortasun genomikoa bera minbizi zelulen ezaugarri izateaz gain, minbiziaren beste bereizgarriengan ere eragina izan dezake.

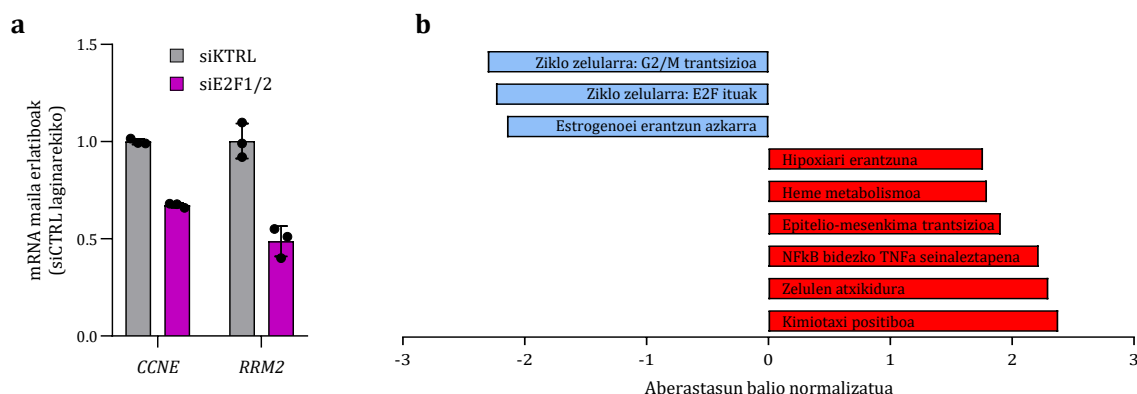
Egonkortasun genomikoaren erregulazioaren ardatzetako bat E2F transkripzio-faktoreen familia da (E2F1-8). Hauen funtzio nagusia zelulen hazkuntzan, DNAREN eta organuluen bikoizketan, eta DNAREN konponketan parte hartzen duten geneen adierazpena erregulatzea da (Iglesias-Ara et. al., 2004, Mitxelena et. al., 2018, Kent eta Leone 2019). E2F faktoreen aktibitate anormala minbizi gehienek ezaugarria da, batez ere E2Fen funtzioa arautzen duten bidezidorretan sortzen diren mutazioengatik (Chen et. al. 2009, Nakajima et. al. 2023). Hala, E2Fen aktibitate eraldatua, ziklo zelularren desarautzearekin eta ezegonkortasun genomikoarekin erlazionatu da (Kent eta Leone 2019). Are gehiago, E2Fak minbiziaren bereizgarri diren bestelako funtzio batzuekin erlazionatu izan dira, gaitasun inbaditzaileen erregulazioarekin esaterako (Andrusiak et. al. 2010, Hua et. al. 2024). Hala ere, oraindik ez dago argi E2Fek nola bideratzen dituzten minbizi zelulen ezaugarriak zelulen hazkuntzatik haratago.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

E2F transkripzio-faktoreen funtzio desarautua minbizi zelulen ezaugarrietako bat da. Izan ere, E2Fen aktibitatea ezinbestekoa da zelulen proliferazio eta minbiziaren garapenerako (Segeren et. al. 2020). Gure ikerketa taldean egindako lan desberdinek, E2Fak minbizi zelulen bereizgarri diren ezegonkortasun genomikoarekin eta erreplikazio-estresarekin erlazionatu dituzte. Bereiziki E2F1 eta E2F2 kideen gabeziak prostatako minbizi zeluletan erreplikazio-estresa eragiten duela frogatu genuen (Hamidi et. al. 2022). Gainera, E2F1/2k zelulen proliferaziorako beharrezkoak diren nukleotidoen biosintesisirako entzimen adierazpena erregulatzen dutela ikusi genuen; E2F1 eta E2F2ren aktibitatea genetikoki eragoztean, nukleotidoen sintesisirako entzimen adierazpena murrizten da, minbizi zelulen erreplikazio-estres maila areagotuz (Hamidi et. al. 2022).

Taldeko azken emaitzen arabera, ondesteko minbizi zeluletan E2F1 eta E2F2ren galerak ziklo zelularrekin (adib. *CCNE*) eta nukleotidoen biosintesiarekin (adib. *RRM2*) erlazionatutako geneen adierazpena murrizten du (1a irudia). Bestalde, inbasioarekin erlazionatutako geneen adierazpena emendatuta ikusten da E2F1/2ren gabezian, eta epitelio-mesenkima trantsizioa, zelulen atxikidura eta kimiotaxi positiboa bezalako terminoak aberastuta agertzen dira (1b irudia). Emaita hauek iradokitzen dute E2F1/2ren aktibitate desagokiak ezegonkortasun genomiko emendatua eta ahalmen inbaditzaile areagotua eragin lezaketela ondesteko minbizi zeluletan. Are gehiago, kontuan edukita ezegonkortasun genomikoak metastasia bultzatu dezakeela zenbait testuingurutan (Bakhoun et. al. 2018, Novikov et. al. 2021), posible litzateke E2F1/2ren galerak eragindako ezegonkortasun genomikoa eta zelulen fenotipo inbaditzaile emendatua mekanistikoki loturik gotea.

1. irudia. E2F1 eta E2F2ren galeraren eragina ondesteko minbizitik eratorritako HCT116 zelulen adierazpen genikoan. HCT116 zelulak E2F1 eta E2F2ren aurkako siRNAkin tratatu ziren 72 orduz. **a)** *CCNE* eta *RRM2* geneen adierazpena aztertu zen mRNA mailan RT-qPCR bidez. Datu hauek gutxienez hiru erreplikazio biologiko ezberdinetan ikusitako emaitzen adierazgarri dira. **b)** RNA-Seq esperimenduak burutu ziren E2F1/2ren ausentziak eragiten dituen aldaketa transkripzionalak aztertuz eta desregulatuta agertu ziren geneak funtzio biologikoaren arabera sailkatu ziren, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) erreminta erabiliz.



Hau horrela, lan honen lehen helburua honako hau izan zen: ondesteko minbizi zeluletan E2F1en eta E2F2ren galerak ezegonkortasun genomikoa bultzatzen duen aztertzea. Kontuan edukita E2F faktoreek nukleotidoen biosintesian parte hartzen duten entzimen adierazpena erregulatzen dutela, nukleosidoen (hau da, nukleotidoen aitzindarien) hornikuntzak E2F1/2ren galerak eragindako ezegonkortasun genomikoa erreskatatzen duen aztertu nahi genuen.

Gainera, E2F1/2ren galerak inbasioarekin erlazionatutako geneen adierazpena emendatzen duela jakinik, bigarren helburua honako hau izan zen: E2F1/2ren ausentziak zelulen migratzeko gaitasunean eraginik duen aztertzea.

Amaitzeko, eta jakinik ezegonkortasun genomikoa zelulen migratzeko gaitasunarekin erlazionatu dela, hirugarren helburua honako hau izan zen: E2F1en eta E2F2ren ausentzia nukleosidoak gehitzeak ondesteko minbiziko zelulen migratzeko gaitasuna ekidin dezakeen ikertzea.

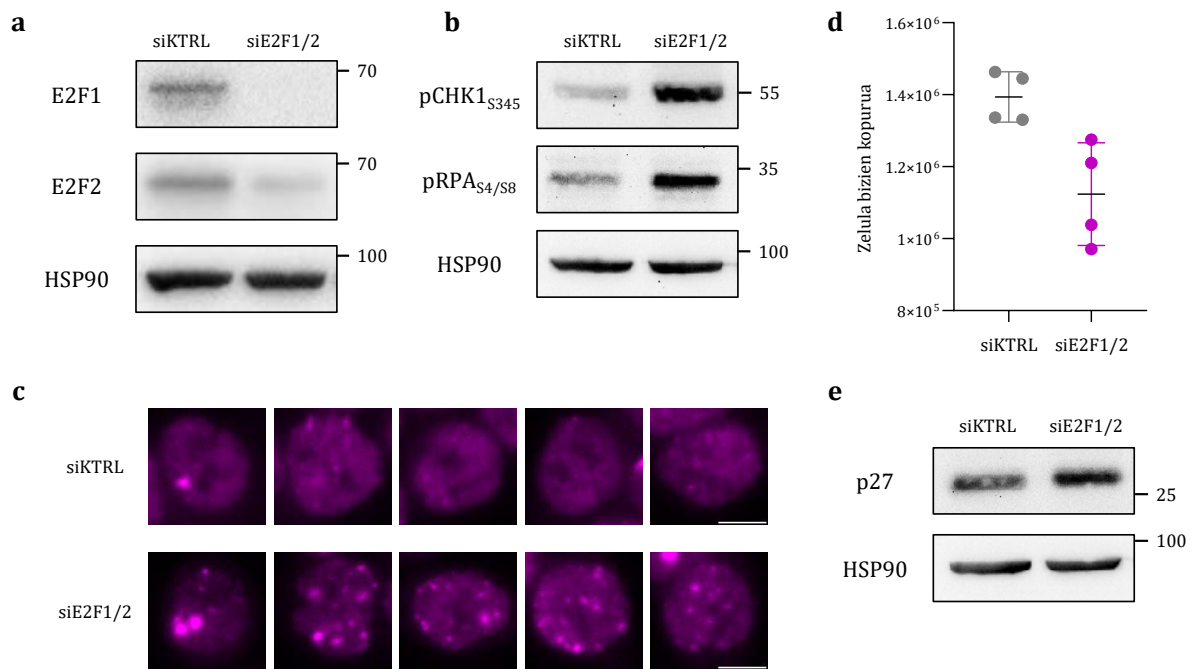
3. Ikerketaren muina

3.1. E2F1 eta E2F2ren galerak ondesteko minbizi zeluletan ezegonkortasun genomikoa sustatu eta zelulen hazkuntza oztopatzen ditu

Lehenik, E2F1 eta E2F2ren galerak ondesteko minbizi zeluletan ezegonkortasun genomikoa eragiten duen aztertu nahi izan genuen. Bi geneen eragina batera aztertu nahi izan genuen, gure ikerketa taldean aurretiaz egindako lan desberdinetan ikusi dugulako modu independentean azterturik ez dela fenotipo sendorik ikusten, seguruenik bi geneek haien artean izaten dituzten konpentsazio mekanismoengatik. Beraz, bi gene hauen funtzioa aztertzeko, *E2F1* eta *E2F2* geneen aurkako interferentziazko RNA txikiak (*small interfering RNA* ingelesez, siRNA) erabili ziren, gene hauen mRNA espezifikoari ezagutu eta proteinaren adierazpena oztopatzen dutenak, genearen isilarazpena eraginez. Eredu zelular gisa, HCT116 zelulak erabili ziren, ondesteko tumore batetik eratorritakoak direnak. Isilarazpenaren kontrol negatibo gisa, inongo generik ezagutzen ez duen siRNA molekula bat erabili zen (siCTRL). Proteina mailan E2F1 zein E2F2ren isilarazpen egokia baieztatu zen siRNAen tratamenduaren ondoren (2a irudia).

Isilarazpenak ezegonkortasun genomikoan duen efektua aztertzeko, markatzaile ezberdinak aztertu genituen eta ikusi genuen pRPA eta pCHK1 markatzaileen adierazpen mailak altuagoak zirela E2F1 eta E2F2ren ausentzian (2b irudia). Gainera, *E2F1* eta *E2F2* isilarazitako zelulen nukleoan, 53BP1 proteina fokuen metaketa ikusi zen (2c irudia), DNA kaltearen seinale. Emaita hauek iradokitzen dute E2F1/2ren galerak erreplikazio-estresa eta honen ondoriozko DNA kaltea eragin dezakeela. Gainera, zelulen hazkuntzan E2F1 eta E2F2ren efektua aztertzerakoan, isilarazpenak bizirik zeuden zelulen kantitatea murrizten zuela ikusi genuen (2d irudia), baita ziklo zelularren inhibitzaile den p27 proteinaren adierazpena emendatuta zegoela ere (2e irudia). Honek, E2F1/2ren galerak ezegonkortasun genomikoaren agerpena bultzatu eta zelulen hazkuntza eragozten duela iradokitzen du.

2. irudia. E2F1 eta E2F2ren isilarazpenaren eragina ondesteko minbizitik eratorritako HCT116 zelulen egonkortasun genomikoan eta hazkuntzan. HCT116 zelulak *E2F1* eta *E2F2*ren aurkako siRNA molekularekin tratatu ziren 72 orduz eta hurrengoak aztertu ziren: **a)** E2F1 eta E2F2ren adierazpena proteina mailan western plaketa bidez, **b)** ezegonkortasun genomikoaren adierazle diren CHK1 eta RPA fosforilatuen adierazpena, **c)** immunofluoreszentzia bidez 53BP1ren fokuak (eskala barra 5µm), **d)** isilarazitako eta kontrol baldintzetako zelula kantitatea eta **e)** p27 ziklo zelularren inhibitzailearen adierazpena. Proteina adierazpen esperimenduetan HSP90aren adierazpena erabili zen karga kontrol moduan, lagin guztietan proteina totalaren kantitatea bera zegoela ziurtatzeko. Datu hauek gutxienez hiru erreplika biologiko ezberdinetan ikusitako emaitzen adierazgarri dira.

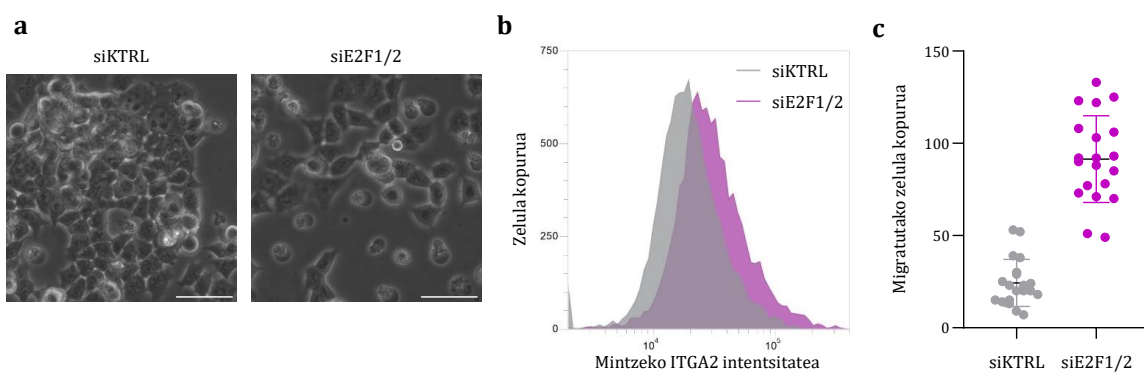


3.2. E2F1 eta E2F2ren galerak zelulen fenotipo inbaditzailea bultzatzen du

E2F1 eta E2F2 faktoreek proliferazioaz haratago minbizi zelulen beste bereizgarri batzuetan eragiten duten aztertu nahi izan genuen. Zehazki ezaugarri inbaditzaileetan zentratu ginen, gure transkriptomika datuen arabera E2F1 eta E2F2ren galerak inbasioarekin erlazionatutako geneen adierazpena emendatzen baitu (1b irudia). Horretarako, lehenik eta behin E2F1/2ren isilarazpenak zelulen morfologian zuen eragina aztertu nahi izan genuen, sarritan zelulek forma aldaketak jasaten baitituzte migratu ahal izateko. E2F1 eta E2F2ren isilarazpenak zelulak haien artean bananduago haztea eragin zuen, baita hauek fusiformeagoak izatea ere (3a irudia), ahalmen inbaditzailea duten zelulen ezaugarri. Hortaz gain, zelulen mintzeko ITGA2 mailak aztertu genituen, migratzeko gaitasuna duten zelulen ezaugarrietako bat baita. E2F1 eta E2F2ren ausentzian, zelulek ITGA2 maila altuagoak erakusten zituztela ikusi genuen (3b irudia). Hain zuzen ere, zelulen migratzeko gaitasuna aztertu genuenean, E2F1/2 isilarazita zuten zelulek gehiago migratzen zutela ikusi genuen, kontrol zelulekin alderatuta (3c irudia). Guzti hau kontuan edukita, ondoriozta genezake E2F1 eta E2F2ren ausentzian zelulek fenotipo inbaditzailea eskuratzen dutela.

3. irudia. E2F1 eta E2F2ren galeraren efektua ondesteko minbiziko zelulen fenotipo inbaditzailean.

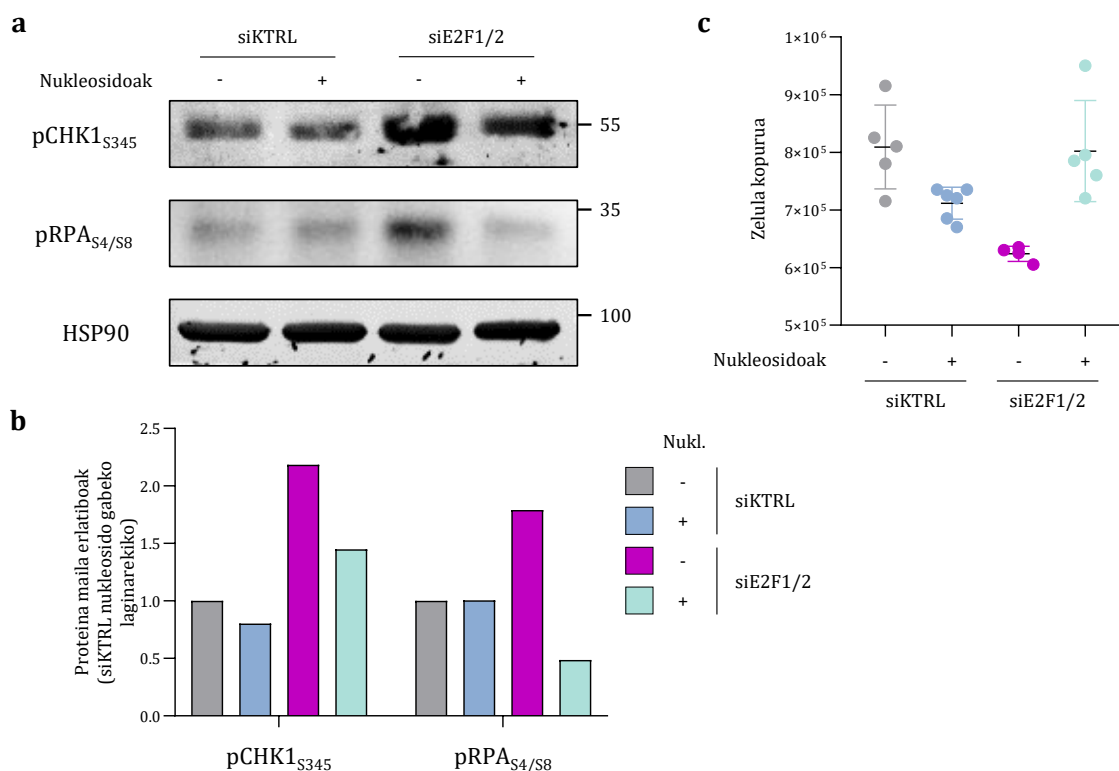
HCT116 zelulak kontrol siRNA batekin edo E2F1 eta E2F2ren aurkako siRNAkin tratatu ziren 72 orduz eta **a)** zelulen morfologia aztertu zen mikroskopio optikoaren bidez (eskala barra 100 μm); **b)** ITGA2ren mintzeko adierazpen mailak aztertu ziren fluxu zitometria bidez; **c)** zelulen migratzeko gaitasuna ebaluatu zen *transwell* migrazio ganberetan zelulak haziz 24 orduz. Datu hauek gutxienez hiru erreplika biologiko ezberdinetan ikusi dira; erreplika adierazgarri bat erakusten da.



3.3. Nukleosidoen hornikuntzak E2F1 eta E2F2ren ausentziaz eragindako ezegonkortasun genomikoa eta proliferazio murrizketa arindu ditzake

Zelulen bikoizketa prozesuan zehar, DNAREN bikoizketan zehazki, nukleotidoak beharrezkoak dira DNA harizpi berriak barneratu ditzan. Minbizian, non zelulen ez-ohiko hazkuntza gertatzen den, maiz nukleosido eskasia egoten da, eta honek erreplikazio-estresa ekarri dezake. Ikusi da gainera, exogenoki nukleosidoak gehitzeak erreplikazio-estresa arindu dezakeela egoera batzuetan (Bester et. al. 2011). Kontuan edukita E2F1 eta E2F2ren ausentzian nukleotidoen biosintesisirako beharrezkoak diren entzimen adierazpena murriztuta dagoela (1a irudia eta Hamidi et. al. 2022) eta erreplikazio-estresa indutzen dela, nukleosidoen gehikuntzak egoera hau berreskuratu lezakeen aztertu nahi izan genuen. Horretarako, kontrol zelulak eta E2F1/2 isilarazita zituzten zelulak nukleosidoen koktel batekin tratatu genituen eta ezegonkortasun genomikoaren markatzaileen (pCHK1 eta pRPA) adierazpena eta zelula kantitatea aztertu genituen. Aurretik aztertutako ezegonkortasun genomikoko markatzaileen adierazpen mailak, zeintzuek emendatuta agertzen diren E2F1 eta E2F2 isilarazterakoan, murriztu egiten dira nukleosidoen tratamendua gehitzerakoan (4a,b irudia). Are gehiago, E2F1 eta E2F2ren ausentziak eragindako zelula kantitateen murrizpena, ia kontrolaren baliora arte erreskatatzen zela ikusi genuen nukleosidoak gehitzerakoan (4c irudia). Beraz, exogenoki nukleosidoak gehitzean, E2F1/2ren galerak eragiten duen ezegonkortasun genomikoa eta honen ondoriozko proliferazio murrizketa erreskatatzen dela ondoriozta daiteke.

4. irudia. Nukleosidoak exogenoki gehitzearen efektuaren azterketa, E2F1 eta E2F2ren ausentzian, ezegonkortasun genomikoan eta zelulen hazkuntzan. HCT116 zeluletan *E2F1* eta *E2F2* isilarazi ziren 48 orduz eta exogenoki nukleosido koktel bat (Embryomax®) gehitu zitzaizen zelulei azken 44 orduetan **a)** CHK1 eta RPA fosforilatuen mailak aztertuz. **b)** pCHK1 eta pRPA maila erlatiboak adierazten dira, lagin bakoitza bere karga kontrola den HSP90aren adierazpenarekiko normalizatuta eta siKTRL nukleosido gabeko laginarekiko erlatibizatuta. Nukl. laburdurak nukleosidori egiten dio erreferentzia. **c)** Zelula kantitatea aztertu zen deskribatutako baldintzetan. Datu hauek gutxienez hiru erreplika independentetan ikusitako emaitza berdinen adierazgarri dira.



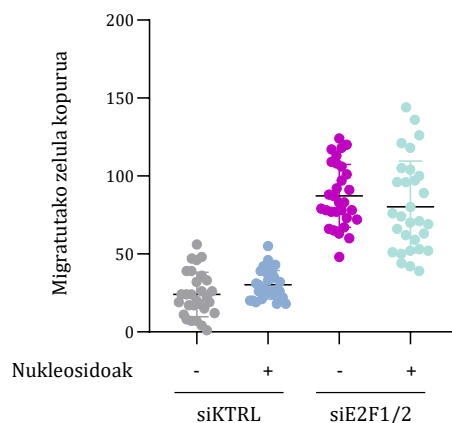
3.4. Nukleosidoen bidezko tratamenduak ez dauka eraginik E2F1 eta E2F2ren galerak eragindako ahalmen migratzailean

Zenbait lanek erakutsi dute ezegonkortasun genomikoak gaitasun inbaditzaileak eta metastasia bultzatu ditzakeela (Bakhoun et. al. 2018, Novikov et. al. 2021). Gure emaitzen arabera, E2F1/2ren galerak alde batetik ezegonkortasun genomikoa eragiten du eta bestetik zelulen migratzeko gaitasuna bultzatzen du.

Hau honela, bi prozesu hauek erlazionatuta egon daitezkeen aztertu nahi izan genuen, hots, E2F1 eta E2F2ren ausentziak eragindako ezegonkortasun genomikoa zelulen migratzeko gaitasunaren emendioaren erantzule den edo ez aztertzea. Helburu hau ikertzeko, HCT116 zeluletan *E2F1* eta *E2F2* geneak isilarazi, nukleosidoekin tratatu eta zelulen migratzeko gaitasuna aztertu genuen. Aurretik ikusi bezala, E2F1/2ren ausentzian zelulek migratzeko ahalmena emendatuta dute. Hala ere, nukleosidoen gehikuntzak ez zuen eraginik izan E2F1/2 gabeko zelulen migratzeko gaitasunean, tratatu gabeko zelulekin alderatuta (5. irudia), nahiz eta interbentzio honek ezegonkortasun genomikoa arintzen duen eredu honetan (4. irudia). Honen arabera, beraz, E2F1 eta E2F2ren bitartez erregulatzen den migrazio fenotipoa ez dirudi faktore hauen galerak eragindako ezegonkortasun genomikoaren menpekkoa denik.

5. irudia. E2F1 eta E2F2ren ausentzian nukleosidoak gehitzearen eragina zelulen migratzeko gaitasunean.

E2F1 eta *E2F2* geneak isilarazi ziren HCT116 zeluletan 48 orduz, azken 44 orduetan nukleosidoak gehituz, eta zelulen migratzeko gaitasuna aztertu zen *transwell* migrazio entseguen bitartez. Datu hauek gutxienez hiru esperimentu independentetan ikusitako emaitza berdinen adierazgarri dira.



4. Ondorioak

E2F1 eta E2F2 transkripzio-faktoreak ezinbestekoak dira zelulen hazkuntzarako, ziklo zelularren erregulazailer nagusienetakoak baitira. Minbiziko zeluletan bereziki, non gehiegizko hazkuntza zelularra gertatzen den, E2F faktoreek eta hauek arautzen dituzten bidezidorrek gehiegizko aktibitatea izaten dute. Hala, lan honetan erakutsi dugu ondesteko minbizian E2F1 eta E2F2ren adierazpena beharrezkoa dela zelulen proliferaziorako, hauen isilarazpenak zelula kantitatea murrizten baitu. Gainera, ikusi dugu ezegonkortasun genomikoa emendatuta agertzen dela E2F1/2ren ausentzian, iradokiz hau izan daitekeela proliferazioaren murrizketaren erantzuleetako bat. Izan ere, exogenoki nukleosidoak gehitzeak, ezegonkortasun genomikoa eta proliferazioa berreskuratzen dituela ikusi dugu. Bestalde, E2F1 eta E2F2ren galerak zelulen migratzeko gaitasuna emendatzen duela ikusi dugu. Zenbait ikerketek ezegonkortasun genomikoa metastasiarekin erlazionatuta egon daitekeela iradoki dutenez, aztertu nahi izan genuen gure testuinguruan ere bi fenotipo hauek erlazionatuta zeuden. Hala ere, kasu honetan nukleosidoen gehikuntzak ez zuen eraginik izan E2F1/2ren ausentziaz induzitutako zelulen migratzeko gaitasunean. Hots, badirudi E2F1 eta E2F2ren galerak eragiten duen migratzeko gaitasunaren emendioa ezegonkortasun genomikoarekiko independentea dela gure testuinguruan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan, E2F1 eta E2F2 ondesteko minbizi zelulen hazkuntzarako beharrezkoak direla ikusi dugu. Hauen galerak zelulen hazkuntza murrizten du, ziurrenik E2F1/2ren ausentziak eragiten duen ezegonkortasun genomikoagatik. Bestalde, ikusi dugu E2F1 eta E2F2 presente ez daudenean, zelulek fenotipo inbaditzailea erakusten dutela. Hala ere, gure testuinguruan, ez dirudi ezegonkortasun genomikoa denik migratzeko gaitasuna eragiten duen faktorea. Hala, etorkizunerako E2F1ek eta E2F2k zelulen migratzeko gaitasuna nola erregulatzen duten aztertzea proposatzen dugu, E2F1/2k inbasioarekin erlazionatutako geneen adierazpen erregulazio mekanismoak ikertuz. Bestalde, eta kontuan edukita *in vitro* egindako esperimentuek eduki ditzaketan mugak, E2F1/2ren galerak *in vivo* zelulen migratzeko gaitasuna emendatzen duen aztertuko genuke, saguen metastasi ereduak erabiliz. Honela, orain arte deskribatua izan ez den E2F1 eta E2F2ren zelulen inbaditzeko gaitasunaren erregulazioaren gaineko ezagutza mekanistikoa handitzea espero dugu.

6. Erreferentziak

- Andrusiak MG, McClellan KA, Dugal-Tessier D, Julian LM, Rodrigues SP, Park DS, Kennedy TE, Slack RS (2011). Rb/E2F regulates expression of neogenin during neuronal migration. *Mol Cell Biol*;31(2):238-47. doi: 10.1128/MCB.00378-10.
- Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, Shah P, Sriram RK, Watkins TBK, Taunk NK, Duran M, Pauli C, Shaw C, Chadalavada K, Rajasekhar VK, Genovese G, Venkatesan S, Birkbak NJ, McGranahan N, Lundquist M, LaPlant Q, Healey JH, Elemento O, Chung CH, Lee NY, Imielenski M, Nanjangud G, Pe'er D, Cleveland DW, Powell SN, Lammerding J, Swanton C, Cantley LC (2018). Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*;553(7689):467-472. doi: 10.1038/nature25432.
- Bakhoun SF, Cantley LC (2018). The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell*;174(6):1347-1360. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.027.
- Bester AC, Roniger M, Oren YS, Im MM, Sarni D, Chaoat M, Bensimon A, Zamir G, Shewach DS, Kerem B (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell*;145(3):435-46. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.044.
- Chen HZ, Tsai SY, Leone G (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*; 9(11):785-97. doi: 10.1038/nrc2696.
- Diehl FF, Miettinen TP, Elbashir R, Nabel CS, Darnell AM, Do BT, Manalis SR, Lewis CA, Vander Heiden MG. (2022) Nucleotide imbalance decouples cell growth from cell proliferation. *Nat Cell Biol*. 2022 Aug;24(8):1252-1264. doi: 10.1038/s41556-022-00965-1
- Hamidi M, Eriz A, Mitxelena J, Fernandez-Ares L, Aurrekoetxea I, Aspichueta P, Iglesias-Ara A, Zubiaga AM (2022). Targeting E2F Sensitizes Prostate Cancer Cells to Drug-Induced Replication Stress by Promoting Unscheduled CDK1 Activity. *Cancers (Basel)*;14(19):4952. doi: 10.3390/cancers14194952.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer (2000). *Cell*; 100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation (2011). *Cell*; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hua K, Wu CT, Lin CH, Chen CF (2024). E2F1 promotes cell migration in hepatocellular carcinoma via FNDC3B. *FEBS Open Bio*;14(4):687-694. doi: 10.1002/2211-5463.13783.
- 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.
- Kent, L. N., & Leone, G. (2019). The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*; 19(6):326-338 doi:10.1038/s41568-019-0143-7
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2021). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038/s41580-021-00404-3
- Mitxelena, J., Apraiz, A., Vallejo-Rodríguez, J., García-Santisteban, I., Fullaondo, A., Alvarez-Fernández, M., Malumbres, M., & Zubiaga, A. M. (2018). An E2F7-dependent transcriptional program modulates DNA damage repair and genomic stability. *Nucleic Acids research*, 46(9), 4546–4559. doi: 10.1093/nar/gkz587
- Nakajima R, Zhao L, Zhou Y, Shirasawa M, Uchida A, Murakawa H, Fikriyanti M, Iwanaga R, Bradford AP, Araki K, Warita T, Ohtani K (2023). Deregulated E2F Activity as a Cancer-Cell Specific Therapeutic Tool. *Genes (Basel)*, 14(2):393. doi: 10.3390/genes14020393.
- Novikov NM, Zolotaryova SY, Gautreau AM, Denisov EV (2021). Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*;124(1):102-114. doi: 10.1038/s41416-020-01149-0.
- Rubin SM, Sage J, Skotheim JM. (2020) Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. *Mol Cell*;80(2):183-192. doi: 10.1016/j.molcel.2020.08.020.

- Segeren HA, van Rijnberk LM, Moreno E, Riemers FM, van Liere EA, Yuan R, Wubbolts R, de Bruin A, Westendorp B (2020). Excessive E2F Transcription in Single Cancer Cells Precludes Transient Cell-Cycle Exit after DNA Damage. *Cell Rep*; 33(9):108449. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108449.
- Solé L, Lobo-Jarne T, Álvarez-Villanueva D, Alonso-Marañón J, Guillén Y, Guix M, Sangrador I, Rozalén C, Vert A, Barbachano A, Lop J, Salido M, Bellosillo B, García-Romero R, Garrido M, González J, Martínez-Iniesta M, López-Arribillaga E, Salazar R, Montagut C, Torres F, Iglesias M, Celià-Terrassa T, Muñoz A, Villanueva A, Bigas A, Espinosa L (2022). p53 wild-type colorectal cancer cells that express a fetal gene signature are associated with metastasis and poor prognosis. *Nat Commun*; 13(1):2866. doi: 10.1038/s41467-022-30382-9.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau EHUKo Minbiziaren Biologia Molekularreko taldean (<https://www.ehu.eus/eu/web/molbiolcancer/>) garatu da lan talde osoaren laguntzarekin. Hemen aurkeztzen diren emaitzak Ainhoa Erizen doktorego tesiaren parte dira, Eusko Jaurlaritzako doktoretza aurreko diru-laguntzari esker gauzatzen ari dena, Jone Mitxelena eta Ana M^a Zubiagaren zuzendaritzapean. Jone Mitxelenak Ikerbasque Research Associate Professor (2025) kontratua dauka. Ana M^a Zubiagak MCIU/AEI/FEDER UE-ko (RTI2018-097497-100, PID2021-122922OB-I00 eta RED2022-134792-T) eta Eusko Jaurlaritzako (IT1547-2) diru laguntzak jaso ditu.