



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



Universidad de Oviedo
Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

PAPEL DE ASAP1 EN CARCINOMAS EPIDERMOIDES DE CABEZA Y CUELLO

Alejandra Alonso Santirso

Curso 2021 – 2022

Trabajo Fin de Máster



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Carcinomas escamosos de cabeza y cuello.....	5
1.2 Campo de cancerización y modelo de progresión tumoral.....	6
1.4 ASAP1: estructura y función.....	9
1.5 Papel de ASAP1 en cáncer.....	10
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	15
3.2 Silenciamiento de ASAP1 mediante edición genética con la tecnología CRISPR/Cas9.....	15
3.2.1 Diseño de ARN guías (sgRNAs).....	15
3.2.2 Subclonación, transformación de bacterias competentes y aislamiento de ADN plasmídico.....	16
3.2.3 Transfección de células HEK293T y producción de lentivirus.....	17
3.2.4 Infección de líneas tumorales y selección de células deficientes (KO) para ASAP1.....	17
3.3.1 Ensayos de viabilidad.....	18
3.3.2 Ensayos de proliferación.....	18
3.3.3 Ensayos de invasión.....	18
3.4 Extracción y cuantificación de proteína.....	19
3.5 Análisis Western Blot.....	19
3.6 Extracción de ARN.....	20
3.7 RT-qPCR.....	20
3.8 Análisis estadístico.....	21
4. RESULTADOS	21
4.1 Generación de líneas celulares derivadas de CECC deficientes (KO) para ASAP1.....	21
4.2 Efecto del silenciamiento/bloqueo de ASAP1 en la viabilidad y proliferación celular.....	24
4.1 Efecto del bloqueo de ASAP1 en la capacidad invasiva.....	26
5. DISCUSIÓN	27
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

El gen *ASAP1* mapea en 8q24, una región frecuentemente amplificada en carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC), lo que se ha asociado con peor pronóstico. Codifica la proteína AMAP1 o ASAP1, la cual participa activamente en la remodelación del citoesqueleto de actina y, por lo tanto, en procesos de motilidad celular, invasión y metástasis. Resultados previos de nuestro grupo revelaron mediante análisis inmunohistoquímico que la expresión elevada de ASAP1 en biopsias de pacientes con CECC es un predictor de mal pronóstico en carcinomas de laringe. A pesar de la implicación de esta proteína en varias cascadas de señalización relacionadas con la transformación maligna, su papel específico y su modo de acción en CECC siguen sin estar bien caracterizados. Por ello, el objetivo global de este trabajo fue investigar el papel patobiológico de ASAP1 en el desarrollo y la progresión de los CECC. Para ello, se silenció la expresión de ASAP1 en líneas celulares derivadas de CECC utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 y se llevaron a cabo ensayos funcionales *in vitro* para estudiar el impacto del silenciamiento de ASAP1 en la viabilidad, proliferación e invasión de las líneas tumorales UT-SCC38 y FaDu. Los resultados mostraron que el silenciamiento de ASAP1 no tiene ningún efecto sobre la viabilidad y proliferación de las líneas de CECC testadas. Además, mediante ensayos de invasión en matrices tridimensionales de colágeno comprobamos que el silenciamiento de ASAP1 no inhibe la invasión de las líneas de CECC. En conjunto, en base a los datos previos de nuestro laboratorio y los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que, si bien la expresión de ASAP1 podría representar un biomarcador con utilidad pronóstica, no muestra un papel biológico relevante como *driver* en proliferación e invasión que sustente su posible utilidad como diana terapéutica en CECC.

Palabras clave: ASAP1, AMAP1, CECC, biomarcador

ABSTRACT

The ASAP1 gene maps to 8q24, a region frequently amplified in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), which has been associated with worse prognosis. It encodes the AMAP1 or ASAP1 protein, which actively participates in actin cytoskeleton remodeling and, therefore, in cell motility, invasion and metastasis processes. Previous results from our group revealed by immunohistochemical analysis that elevated ASAP1 expression in biopsies from patients with HNSCC is a predictor of poor prognosis in laryngeal carcinomas. Despite the involvement of this protein in several signaling cascades related to malignant transformation, its specific role and mode of action in HNSCC remains poorly characterized. Therefore, the overall aim of this work was to investigate the pathobiological role of ASAP1 in the development and progression of HNSCCs. To this end, ASAP1 expression was silenced in CECC-derived cell lines using CRISPR/Cas9 technology and in vitro functional assays were performed to study the impact of ASAP1 silencing on the viability, proliferation and invasion of UT-SCC38 and FaDu tumor lines. The results showed that ASAP1 silencing has no effect on the viability and proliferation of the tested HNSCC lines. Furthermore, by invasion assays in three-dimensional collagen matrices we verified that ASAP1 silencing does not inhibit the invasion of CECC lines. Overall, based on previous data from our laboratory, and the results obtained in this work, we can conclude that although ASAP1 expression could represent a biomarker with prognostic utility, it does not show a relevant biological role as a driver in proliferation and invasion that would support its possible utility as a therapeutic target in HNSCC.

Keywords: ASAP1, AMAP1, HNSCC, biomarker

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Carcinomas escamosos de cabeza y cuello

Los tumores de cabeza y cuello constituyen un grupo de enfermedades muy heterogéneo con una incidencia del 5%, representando la séptima neoplasia a nivel mundial, con 850.000 nuevos casos diagnosticados al año y causando alrededor de 450.000 muertes anuales (Hemmi *et al.*, 2022). Más del 95% de estos tumores son carcinomas que derivan del epitelio de la mucosa, denominados carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC). Los CECC se localizan en las vías aerodigestivas superiores, afectando a diferentes localizaciones anatómicas, como la cavidad oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe y laringe (Marur *et al.*, 2008) (**Figura 1**).

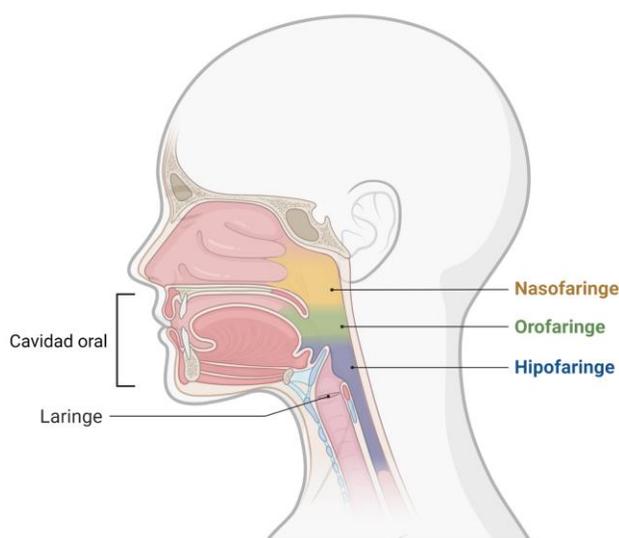


Figura 1. Principales localizaciones anatómicas del cáncer de cabeza y cuello. Imagen creada con Biorender.

Los factores de riesgo clásicos son el tabaquismo y el consumo de alcohol, y en los últimos años ha aumentado la incidencia de los CECC derivados de la infección por determinados tipos del Virus del Papiloma Humano, especialmente en los tumores orofaríngeos (Leemans *et al.*, 2018). De la totalidad de pacientes con esta enfermedad, sólo un tercio se diagnostican en etapas tempranas, mientras que la mayoría se detectan en estadios avanzados de la enfermedad, y en muchos casos con metástasis ganglionares, un factor con un profundo impacto en el pronóstico y la esperanza de vida de estos pacientes. El tratamiento de los

CECC sigue siendo un reto que requiere un enfoque multimodal. En las últimas décadas se ha ampliado el conocimiento y tecnología de la radioterapia y quimioterapia, han aparecido nuevas herramientas quirúrgicas dirigidas a mejorar la preservación de los órganos, mejorando la calidad de vida de los pacientes, y con el avance de las tecnologías ómicas y de secuenciación masiva se ha incrementado el conocimiento sobre la biología tumoral de este tipo de tumores (Wise-Draper *et al.*, 2022). Sin embargo, hasta el momento existen muy pocas terapias dirigidas a dianas moleculares aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de los CECC, únicamente Cetuximab (anti-EGFR) o Nivolumab y Pembrolizumab (anti-PD-1/PD-L1) (Lacas *et al.*, 2017; Krishnamurthy *et al.*, 2022).

A pesar del continuo avance en las distintas modalidades de tratamiento (cirugía, radioterapia y quimioterapia), la esperanza de vida de pacientes que padecen CECC no ha tenido mejoras notables en los últimos años, siendo el fracaso del control loco-regional de la enfermedad (sobre todo metástasis en ganglios regionales y recidivas locales) una de las principales causas de muerte por este tipo tumoral (Leemans *et al.*, 2011). Por ello, reviste un especial interés identificar marcadores moleculares que aumenten la sensibilidad de las actuales técnicas diagnósticas para la detección de metástasis ocultas, mejoren el poder predictivo de los actuales marcadores clínico-patológicos, permitan una mejor estratificación de los pacientes y una selección más adecuada e individualizada de los tratamientos. Además, estos marcadores también podrían servir como nuevas dianas moleculares para el desarrollo de terapias personalizadas. Por este motivo, es de vital importancia que el desarrollo de nuevos fármacos incorpore todo el conocimiento actual sobre la biología molecular y celular de este tipo tumoral, permitiendo desarrollar terapias dirigidas a las alteraciones moleculares específicas de la célula tumoral. De esta manera, el desarrollo de nuevos fármacos o tratamientos ya sea de manera individual o en combinación con los tratamientos actuales (quimioterapia y radioterapia), estaría dirigido a dianas específicas de cada tumor, siendo más selectivas, eficaces y con menor toxicidad que las estrategias terapéuticas tradicionales.

1.2 Campo de cancerización y modelo de progresión tumoral

Los CECC representan un variado espectro de subtipos morfológicos y clínicos que suele dar lugar a dificultades en su diagnóstico y selección de tratamiento de los pacientes. La

evolución de las diferencias fenotípicas y clínicas en este tipo de tumores es, entre otras cosas, consecuencia de acontecimientos moleculares que ocurren en diferentes etapas de la evolución tumoral (Choi Hong *et al.*, 2004).

El término “campo de cancerización” fue propuesto por primera vez por Slaughter en 1953 (Slaughter *et al.*, 1953) para tratar de explicar la alta tendencia a desarrollar recidivas locales y múltiples tumores independientes tras un tratamiento en CECC. Hace referencia a la presencia de alteraciones genéticas o epigenéticas preneoplásicas en células epiteliales de diversas áreas de la mucosa. Un campo tiene un origen monoclonal y crecimiento expansivo, pero sin capacidades invasivas o metastásicas propias de un tumor. Son necesarios cambios genéticos adicionales que proporcionen esas capacidades y transformen el campo de cancerización en un carcinoma.

El desarrollo de los CECC, como otros carcinomas, se ha definido como un proceso multietapa que transcurre a través de una serie de alteraciones estructurales de la mucosa epitelial con diferente grado histopatológico, desde hiperplasia a carcinoma invasivo (Leemans *et al.*, 2011). La exposición continuada a los carcinógenos del tabaco provoca la acumulación de alteraciones genéticas y moleculares que conferiría a las células de una ventaja proliferativa y la adquisición de fenotipo invasivo, lo que contribuiría a la progresión tumoral. Algunos de esos eventos son muy recurrentes en los CECC.

1.3 Frecuentes alteraciones genéticas y moleculares en los CECC

Estudios moleculares han demostrado que deleciones en los brazos cromosómicos 3p, 4p, 8p y 9p representan cambios genéticos tempranos y tanto las pérdidas en 18q, 17p como las ganancias en 3q, 8q24 (que alberga el gen *ASAP1*) y 11q13 se asocian con la progresión neoplásica (Califano *et al.*, 1996; Carey *et al.*, 1997; El-Naggar *et al.*, 1998). Dado que estas regiones cromosómicas albergan importantes genes reguladores del ciclo celular, este tipo de alteraciones hacen que la célula afectada tenga ventajas proliferativas frente a las células sanas.

Como ya se ha mencionado, el CECC es una enfermedad altamente invasiva que a menudo cursa con infiltración loco-regional (principalmente metástasis en ganglios linfáticos cervicales), lo que agrava el pronóstico y manejo de los pacientes (Kramer *et al.*, 2005).

Amplificaciones en las regiones 3q26-29, 8q23-24 y 11q13 son eventos frecuentes durante la progresión de CECC que se asocian con peor resultado de la enfermedad (Lin *et al.*, 2006) (**Figura 2**). La frecuencia de estas alteraciones y la correlación que muestran con enfermedad invasiva justifican el creciente interés por estudiar genes localizados en estas regiones como posibles mediadores de invasión y metástasis (Lin *et al.*, 2006).

La organización del citoesqueleto de actina juega un papel fundamental en procesos de motilidad celular e invasividad. Se han identificado varios genes dentro de estas regiones con una función conocida como reguladores del citoesqueleto de actina, algunos de ellos ya conocidos mediadores de invasión en varios tipos de cáncer. Este es el caso de la subunidad catalítica de la PI3K (PIK3CA), la proteína activadora de GTPasa ASAP1, la quinasa de adhesión focal (FAK) o Cortactina (CTTN), que podrían actuar individualmente o de forma coordinada para promover la invasión y metástasis en CECC y en otros tumores (Kelley *et al.*, 2008).

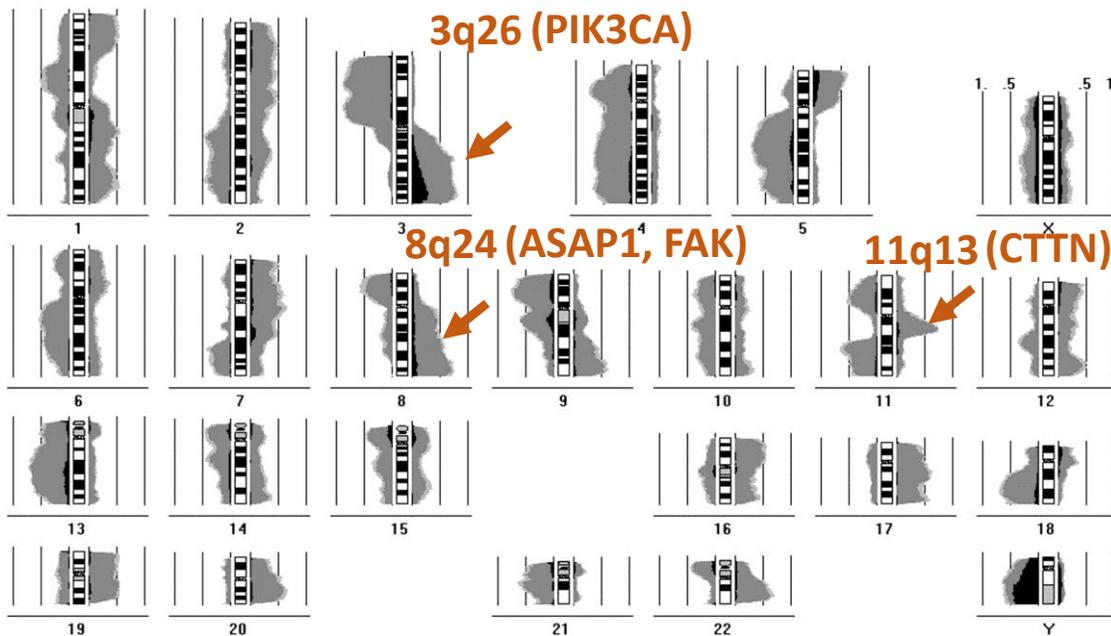


Figura 2. Aberraciones cromosómicas frecuentes en CECC. Representación de histograma que resume los desequilibrios cromosómicos detectados en 113 CECC. Las áreas en el lado izquierdo de cada ideograma cromosómico corresponden a la pérdida de material genético, mientras que las del lado derecho representan ganancias de ADN. Las amplificaciones de 3q26, 8q24 y 11q13 están resaltadas. Figura tomada y modificada de Bockmühl *et al.*, 2000.

1.4 ASAP1: estructura y función

El gen *ASAP1* codifica la proteína AMAP1 o ASAP1 (“Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1”). Esta proteína multidominio pertenece a la familia de proteínas activadoras de GTPasas conocidas como Arf-GAPs (“ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins”), que son específicamente activadas por PIP2 (fostadilinositol 4,5 – bifosfato) y ácido fostatídico (PA), y que regulan el citoesqueleto de actina en procesos de migración e invasión (Randazzo *et al.*, 2000; Sabe *et al.*, 2008).

ASAP1 está formada por múltiples dominios estructurales (**Figura 3**) entre los que destacan los dominios Arf-GAP, una región rica en prolina (PRD), y un dominio de homología Src (SH3). Estos últimos facilitan la señalización y las interacciones de ASAP1 con la quinasa de adhesión focal (FAK), CD2AP, Src, Cortactina y Paxilina (Liu *et al.*, 2002). En la región N-terminal se encuentra el dominio BAR que induce la tubulación de la membrana y puede funcionar como sitio de unión de proteínas (Inoue *et al.*, 2008; Jian *et al.*, 2009). Además, se encuentra el dominio de homología a pleckstrina (PH), con el que ASAP1 regula los factores de ribosilación ADP (ARFs) que circulan entre los estados GDP y GTP (Kam *et al.*, 2000).



Figura 3. Representación esquemática de los dominios estructurales de ASAP1. Figura tomada de la referencia Jian *et al.*, 2015.

La familia de proteínas Arfs se caracterizan por regular el tráfico intracelular de membranas, controlando el ensamblaje y desensamblaje de las proteínas de la cubierta de las vesículas. Destaca su participación en la remodelación del citoesqueleto de actina y, por lo tanto, en procesos de motilidad celular (Randazzo *et al.*, 2000). Los complejos de adhesión de integrinas, incluidas las adhesiones focales y el citoesqueleto de actina asociado controlan la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la migración de las células (Huttenlocher *et al.*, 2011). Estas estructuras son esenciales para la fisiología normal, por lo que su alteración se ha asociado a diferentes enfermedades como el cáncer (Moreno-Layseca *et al.*, 2014).

Este grupo de proteínas participan en múltiples funciones celulares, tales como adhesión celular, migración, la fagocitosis por parte de los macrófagos; e incluso se sabe que

promueven invasión y metástasis en un contexto tumoral (Vitali *et al.*, 2019). Dentro de esta familia de proteínas, ASAP1 es una de las mejor caracterizadas, y se sabe que está relacionada con estructuras o profusiones de la membrana celular ricas en actina como las adhesiones focales, podosomas e invadopodios (Onodera *et al.*, 2005). Son ejemplos de Arf GAPs que afectan al tráfico de membranas controlando los complejos de adhesión de integrinas. ASAP1 concretamente tiene efectos directos sobre el citoesqueleto de actina, que se asocia a los complejos de adhesión de integrinas y los afecta de diferentes maneras (**Figura 4**).

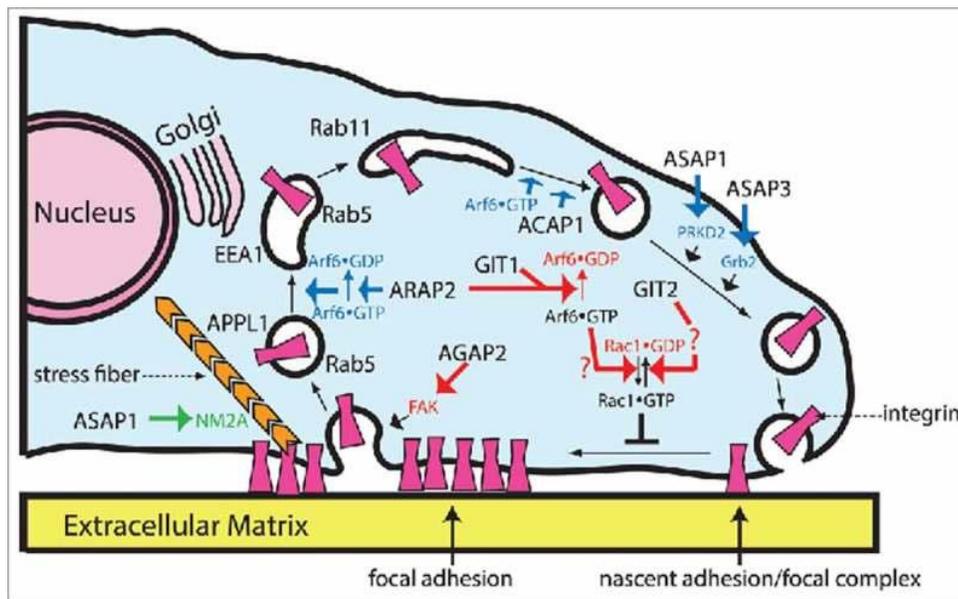


Figura 4. Funciones de las Arf GAPs en la regulación de los complejos de adhesión a las integrinas. La imagen esquematiza tres mecanismos por los que las Arf GAPs pueden afectar a los complejos de adhesión de integrinas y sus posibles lugares de acción en las células. El mecanismo de control del tráfico de membranas de las integrinas (azul) es utilizado por ASAP1, entre otras. ASAP1 y ASAP3 afectan al reciclaje de integrinas, pero no se conoce su compartimento específico (rojo). Otro mecanismo es a través del control de la actomiosina, uniéndose directamente a la miosina 2A no muscular (NM2A, verde). Imagen tomada de la referencia Vitali *et al.*, 2019.

1.5 Papel de ASAP1 en cáncer

La organización del citoesqueleto de actina representa un factor clave en la formación de filopodios y protuberancias ricas en actina que tienen lugar en las células tumorales (Donaldson *et al.*, 2011). Existen numerosas evidencias que demuestran que ASAP1 desempeña un papel importante en la remodelación del citoesqueleto de actina y en la

regulación del tráfico de la membrana intracelular. Además, la sobreexpresión de ASAP1 se ha asociado con malignidad y se ha detectado en una gran variedad de tumores, incluyendo mama, colorrectal, melanoma, próstata y CECC entre otros (Lin *et al.*, 2008) (**Figura 5**). La sobreexpresión de ASAP1 bloquea la formación de las adhesiones focales, la propagación celular y el crecimiento inducido por el PDGF. Estos datos apoyan la participación de ASAP1 como regulador de la distribución y actividad de microtúbulos y microfilamentos citoesqueléticos que son necesarios para el movimiento celular (Randazzo *et al.*, 2000), y que su papel en carcinogénesis se asocia principalmente regulando procesos de motilidad, invasión y metástasis de las células tumorales (Randazzo *et al.*, 2007).

En contraposición a lo explicado anteriormente, también se ha visto que la pérdida o baja expresión de esta proteína puede estar implicada en patologías, y también en cáncer. Hay estudios que confirman que la supresión/bloqueo de ASAP1 promueve la invasión de las células tumorales a través de la activación de AKT en algunos tumores de mama (Schreiber *et al.*, 2022) o en hepatoblastomas, si la pérdida tiene relación con la señalización por parte de EGFR (Ranganathan *et al.*, 2016) (**Figura 5**). Estos datos muestran la importancia de ASAP1 en el desarrollo tumoral y que su papel puede ser dependiente del contexto celular/tisular.

En resumen, el papel de ASAP1 se relaciona principalmente con la motilidad celular y con la regulación del tráfico de la membrana intracelular, procesos que desempeñan un papel importante en el proceso de desarrollo tumoral y transformación maligna, pero sus funciones específicas son dependientes del tumor y el contexto celular (Li *et al.*, 2017).

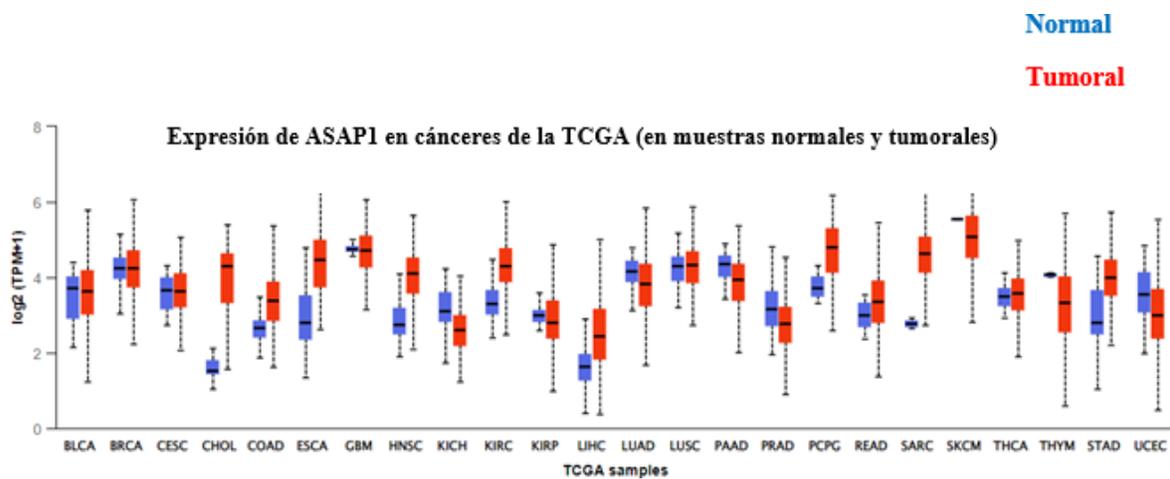


Figura 5. Expresión de ASAP1 en múltiples tumores y sus correspondientes tejidos sanos.

Análisis de los niveles de mRNA de ASAP1 en muestras de tejido sano (azul) y tumoral (rojo) de diferentes cohortes obtenidas del Atlas del Genoma del Cáncer TCGA (del inglés, *The Cancer Genome Atlas*), empleando la plataforma y herramientas web de UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>). La expresión se muestra como el logaritmo en base 2 de los Transcritos Por Millón (TPM) +1. Se muestran datos de expresión de carcinoma urotelial de vejiga (BLCA), carcinoma invasivo de mama (BRCA), carcinoma escamoso cervical (CESC), colangiocarcinoma (CHOL), adenocarcinoma de colon (COAD), carcinoma de esófago (ESCA), glioblastoma multiforme (GBM), carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSC), carcinoma renal de células cromóforas (KICH), carcinoma renal de célula clara (KIRC), carcinoma renal de células papilares (KIRP), carcinoma hepatocelular (LIHC), adenocarcinoma de pulmón (LUAD), carcinoma escamoso de pulmón (LUSC), adenocarcinoma de páncreas (PAAD), adenocarcinoma de próstata (PRAD), feocromocitoma y paraganglioma (PCPG), adenocarcinoma rectal (READ), sarcoma (SARC), melanoma cutáneo (SKCM), carcinoma de tiroides (THCA), timoma (THYM), adenocarcinoma de estómago (STAD) y carcinoma endometrial (UCEC). Figura obtenida de: <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/Pan-cancer.pl?genenam=ASAP1>.

La información creciente en los últimos años ha ayudado a esclarecer más detalladamente el papel de ASAP1, así como las rutas en las que está implicada, regulando invasión y metástasis en distintos tipos de cáncer (Onodera *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014; Hashimoto *et al.*, 2019). Aunque la información mecanística acerca de esta proteína sigue siendo bastante limitada, se ha relacionado con la ruta de señalización PTEN/AKT (Zhang *et al.*, 2018), y con la vía ARF6-ASAP1, promoviendo el reciclaje de PD-L1 y su expresión en la superficie celular en respuesta a la activación de RTK (Hashimoto *et al.*, 2019). Muchos estudios se han centrado en su papel activando la vía EGFR-Arf6, la cual desempeña un papel crucial en procesos de invasión y metástasis de distintos tipos de tumores malignos (Donaldson *et al.*, 2011; Haines *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2014). Concretamente, la sobreexpresión de Arf6 y su efector ASAP1 participan en la activación del eje EGFR-GEP100-Arf6-ASAP1 (**Figura 6**) (Sato *et al.*, 2014). Esta ruta no sólo estimula la capacidad de invasión de la matriz extracelular, sino que también afecta a la adhesión celular mediada por la E-cadherina e induce el reciclaje de β 1-integrina (Sabe *et al.*, 2008). En este contexto, ASAP1 se une a la cola de la integrina β 1 a través de su interacción con la proteína quinasa D2 (PRKD2), un miembro de la familia de la policistina/PKD1/PKC μ . Su asociación es facilitada por Rab5C (activado por el EGFR) y promueve el reciclaje de la integrina β 1 (Onodera *et al.*, 2012). Todos estos cambios en el entorno celular promueven activamente la invasión y la metástasis por parte de las células tumorales (Oka *et al.*, 2014).

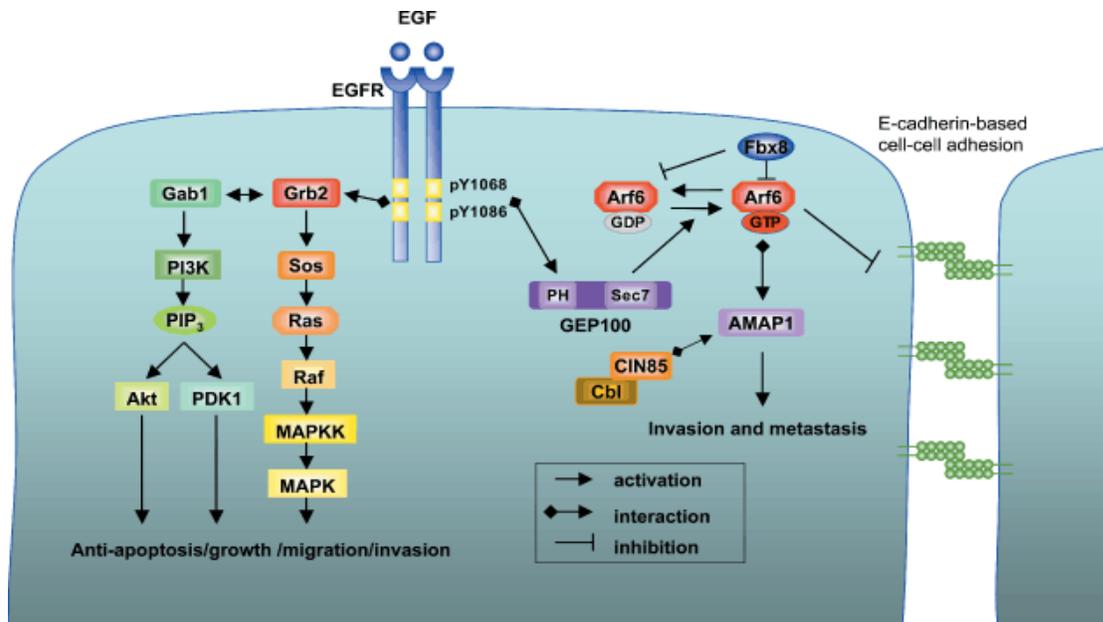


Figura 6. Representación esquemática de la vía EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 en la regulación de la invasión y la metástasis del cáncer. La Tyr1068 o Tyr1086 fosforilada se une directamente al dominio PH de GEP100. A través de esta unión, GEP100 activa Arf6 y su vía de señalización descendente con la participación del efector AMAP1. Para que se desencadene esta vía es necesario que tanto Arf6 como AMAP1 estén altamente sobreexpresados, y las tirosinas fosforiladas. AMAP1 desempeña un papel fundamental en las alteraciones de la adhesión célula-célula basadas en la E-cadherina. La ubiquitinación de AMAP1 por Cbl, a través de la unión de AMAP1 a CIN85, también es necesaria para que se produzca invasión. Imagen tomada de la referencia Sabe *et al.*, 2009.

Además, se ha demostrado que AMAP1 forma un complejo trimérico con Cortactina y Paxilina, que resulta esencial para invasión y metástasis en cáncer de mama (Onodera *et al.*, 2005). Este complejo ha sido detectado específicamente en células tumorales altamente invasivas y no en células no invasivas o epiteliales normales (Onodera *et al.*, 2005). Se han identificado los dominios implicados en la interacción AMAP1-Cortactina (dominios PRD de AMAP1 y SH3 de Cortactina) (Onodera *et al.*, 2005), definido la estructura cristalográfica del dímero y se ha demostrado la efectividad de péptidos y moléculas antagonistas de esta unión bloqueando la invasión y metástasis, y por ello se ha propuesto como posible diana terapéutica en cáncer de mama (Hashimoto *et al.*, 2006). Por otro lado, AMAP1 forma complejo con FAK que regula las uniones focales (Liu *et al.*, 2002) y se ha indicado que la unión AMAP1-FAK podría estar mediando también la formación de complejos de AMAP1 con Cortactina (Randazzo *et al.*, 2007). Estos datos muestran que AMAP1 es una proteína

esencial para la invasión y cuya expresión en tumores de mama y líneas celulares se ha correlacionado con invasividad y potencial maligno.

Por otro lado, Cortactina, ASAP1 y FAK son sustratos de SRC, un importante oncogén cuya expresión y actividad se detecta frecuentemente elevada en múltiples tipos de cáncer. Resultados previos de nuestro grupo revelaron mediante análisis inmunohistoquímico que la expresión elevada de SRC activo y sus efectores ASAP1 y FAK se detecta frecuentemente en los CECC, y muestra diferente relevancia pronóstica dependiendo de la localización tumoral (Hermida-Prado *et al.*, 2019). De forma concordante, tanto la expresión de SRC activo como ASAP1 y FAK demostraron ser predictores de mal pronóstico en carcinomas de laringe, pero no faringe. También se ha demostrado que altos niveles de expresión de ASAP1 se asocian con mal pronóstico en carcinomas orales (Sato *et al.*, 2014).

Todos estos datos nos han llevado a investigar el papel funcional de ASAP1 en la progresión tumoral de los CECC, con el objetivo de entender mejor los procesos biológicos y funciones celulares que regula en el contexto específico del cáncer de cabeza y cuello. El conocimiento de los cambios moleculares que acompañan las diferentes etapas del desarrollo tumoral y su influencia en la biología de la célula tumoral son fundamentales para que toda esa información pueda ser aplicada con fines diagnósticos, pronósticos y/o terapéuticos.

2. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo ha consistido en investigar el papel patobiológico de ASAP1 en CECC. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Generación de modelos deficientes de ASAP1 en líneas tumorales de CECC mediante la tecnología de edición genética CRISPR/Cas9.
2. Impacto funcional del bloqueo genético de ASAP1 en modelos de CECC, evaluando sus efectos sobre la viabilidad y proliferación celular y la capacidad invasiva.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se han empleado dos líneas celulares tumorales derivadas de CECC: UT-SCC38 (carcinoma epidermoide de laringe) y FaDu (carcinoma epidermoide de hipofaringe), las cuales se han cultivado en medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) con 4,5 g/L de glucosa y 2 mM de L-glutamina (Corning), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Corning®), 100 U/mL de penicilina (Biowest), 200 mg/mL de estreptomicina (Biowest), 10mM de HEPES (pH=7,3) (Biowest) y 100 mM de aminoácidos no esenciales (Biowest) en una atmósfera controlada a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturada.

3.2 Silenciamiento de ASAP1 mediante edición genética con la tecnología CRISPR/Cas9

Para poder llevar a cabo la técnica de CRISPR/Cas9, inicialmente se diseñaron los ARNs guía (sgRNAs) para ASAP1, que fueron sintetizados comercialmente (Thermo). Cada pareja de oligonucleótidos se anilló y subclonó en el vector pKLV2-U6gRNA5 (BbsI)-PKGpuro2AZsG-W, con el que se transformaron bacterias competentes de *Escherichia coli* de la cepa XL-1 Blue. Tras la selección de colonias de cada construcción, se extrajo el ADN plasmídico y se secuenció para comprobar la correcta integración de los diferentes sgRNAs. A continuación, se transfectaron células HEK293T con los diferentes plásmidos para la producción de los lentivirus, que contendrán el plásmido con la secuencia del sgRNA o el vector vacío (condición control o *empty vector*). Tras la generación de lentivirus, se infectaron las líneas tumorales FaDu/Cas9 y UT-SCC38/Cas9. En el laboratorio ya se disponía de las líneas tumorales con expresión estable del enzima Cas9, necesaria para lograr el silenciamiento de ASAP1 mediante la tecnología CRISPR y obtener las líneas celulares derivadas de CECC deficientes (KO) para ASAP1.

3.2.1 Diseño de ARN guías (sgRNAs)

Para ello fue empleada la herramienta bioinformática “Wellcome Sanger Institute Genome Editing” (<https://wge.stemcell.sanger.ac.uk/>), y las secuencias seleccionadas se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Secuencias de los dos sgRNAs sintetizados para *ASAP1*, *Forward* y *Reverse*.

sgRNA	Forward (5'-3') –NGG	Reverse (3'-5')
ASAP1_gRNA1	CACCGATTCCACTCATATTCTACG	AAACCGTAGAATATGAGTGGAATC
ASAP1_gRNA2	CACCGAAAGAAGAGGCCCTAACCA	AAACTGGTTAGGGCCTCTTCTTTC

3.2.2 Subclonación, transformación de bacterias competentes y aislamiento de ADN plasmídico

Cada pareja de oligonucleótidos se anilló y subclonó en el vector pKLV2- U6gRNA5(BbsI)-PKGpuro2AZsG-W (Addgene), que contiene el *cassette* de resistencia a puromicina (**Figura 7**), utilizando la enzima de restricción *BbsI*. Las bacterias competentes *Escherichia Coli* de la cepa XL-1 Blue se transformaron con cada plásmido y se sembraron en placas de LB (Luria-Bertani) agar con 100 µg/mL de ampicilina e incubaron a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se seleccionaron tres colonias por cada construcción de sgRNA, las cuales se crecieron en medio LB a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, el ADN plasmídico fue extraído usando el kit de Miniprep *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las construcciones de cada sgRNA fueron comprobadas mediante secuenciación (SCT-Universidad de Oviedo).

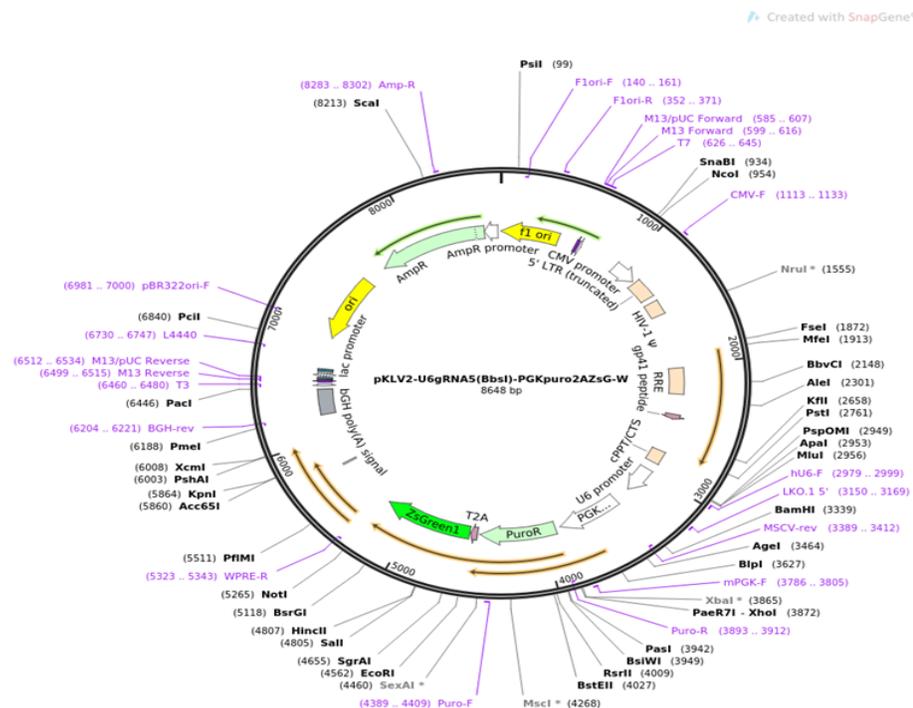


Figura 7. Mapa del plásmido pKLV2-U6gRNA5(BbsI)- PKGpuro2AZsG-W. Figura tomada de <https://www.addgene.org/67975/>.

3.2.3 Transfección de células HEK293T y producción de lentivirus

El siguiente paso es transfectar las células HEK293T con los plásmidos que contienen los sgRNAs o el vector vacío y con los plásmidos que contienen los componentes estructurales de los lentivirus (pLP1, pLP2 y VsVg). De esta manera, se obtienen lentivirus que contienen la secuencia de cada sgRNA o el vector vacío. Primeramente, se siembran las células HEK293T a una densidad de 700.000 células/pocillo en placas 6 pocillos y al día siguiente se retira el medio DMEM y se sustituye por OptiMEM (Gibco), el cual facilita la transfección utilizando lipofectamina. Posteriormente, se prepara una mezcla con los plásmidos que contienen los componentes estructurales de los lentivirus, el plásmido con la secuencia del sgRNA o el vector vacío, Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y OptiMEM (Gibco) y se añade a las células HEK293T gota a gota, las cuales se incubaron a 37°C durante 5 horas. Pasado este tiempo, se sustituye el medio por DMEM fresco y las placas se incuban durante 72 horas para la producción de virus. Transcurrido ese tiempo, los virus se recogen en el medio, el cual se filtra utilizando un filtro de 0,45 µm y se almacena a -80° hasta su uso.

3.2.4 Infección de líneas tumorales y selección de células deficientes (KO) para ASAP1

La generación de mutantes utilizando la tecnología CRISPR requiere que las células expresen la enzima Cas9 y ocurra el silenciamiento (*knock-out*) del gen de interés. Dado que ya se disponía de líneas con expresión estable de Cas9 en el laboratorio (FaDu/Cas9 y UT-SCC38/Cas9), se utilizaron estas líneas para llevar a cabo la infección con los lentivirus generados, obteniendo al final de este paso las líneas ASAP1 KO si integran las secuencias de cada sgRNA y ASAP1 *empty* si integran el vector vacío.

Para lograrlo, las células FaDu y UT-SCC38 se crecen hasta alcanzar el 50% de confluencia y se añaden 200 µL de una mezcla de lentivirus y 1:1000 de polibrene (el cual aumenta la eficiencia de la infección). Tras 48 horas de incubación a 37°C, se retira el medio y se comienza la selección de las células con el plásmido integrado utilizando puromicina a una concentración de 2 µg/µL (el plásmido contiene el gen de resistencia a puromicina). El

silenciamiento del gen *ASAPI* se comprobó analizando la expresión de la proteína mediante Western Blot.

3.3 Ensayos funcionales

3.3.1 Ensayos de viabilidad

La viabilidad celular se analizó utilizando el ensayo MTS *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega). Este es un método colorimétrico que se basa en la reducción celular de una sal de tetrazolio para dar lugar a formazán, un compuesto cuya absorbancia se puede medir a 490 nm y se relaciona de manera directa con el número de células viables.

La línea celular FaDu se sembró a una densidad de 2.000 células por pocillo y la línea UT-SCC38 a una densidad de 3.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. A los 4 días se midió la viabilidad celular utilizando MTS y midiendo la absorbancia a 490 nm en un lector de placas Synergy HT (BioTek, Winooski, VT).

3.3.2 Ensayos de proliferación

La proliferación celular se analizó utilizando ensayos clonogénicos o de formación de colonias. Para ello se sembraron 8.000 células por pocillo (en placas de 6 pocillos) de la línea UT-SCC38 y 6.000 células por pocillo de la línea FaDu. A los 10 días las células se fijaron con etanol y se tiñeron con cristal violeta. La proliferación celular se calculó tomando imágenes con el escáner de placas GelCount (Oxford Optronix Ltd) y midiendo el porcentaje de área teñida utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3.3.3 Ensayos de invasión

La capacidad invasiva de las diferentes líneas tumorales se analizó utilizando un ensayo de invasión 3D *in vitro* que se basa en formar un esferoide y embeberlo en una matriz tridimensional de colágeno para estudiar su capacidad invasiva. La primera parte de este experimento consiste en la formación de esferoides empleando un sistema de gota colgante en cámara húmeda. Para ello, se resuspendieron 100.000 células/mL de células tumorales en DMEM completo con 20% de metilcelulosa y los esferoides se obtuvieron pipeteando 25 µL (2.500 células/gota) en la tapa de una placa de Petri que se incubó a 37°C durante 18 horas

en posición invertida. Al día siguiente, cada esferoide se transfirió a un pocillo de una placa de 96 pocillos, embebido en 110 μ L de matriz de colágeno (2,3 mg/mL bovine collagen matrix; PureCol, Advanced Biomatrix).

Se tomaron fotos en un microscopio invertido Leica DMi1 (Leica Microsystems) a tiempo inicial (t=0h), a tiempo (t=24h) y a tiempo final (t=48h). La invasión se cuantificó normalizando el área a los diferentes tiempos (24 y 48 horas) frente al área de dicha esfera a tiempo inicial (0 horas). Los datos se representaron relativos a la condición control (vector vacío o *empty*) y las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3.4 Extracción y cuantificación de proteína

Para la extracción proteica se empleó el tampón de lisis celular *Laemml*i (Tris 1M pH 7,5, glicerol al 20%, SDS (del inglés *Sodium dodecyl sulfate*) al 10%) con 1mM DTT (Ditiotreitol) (Sigma) y un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Thermo Scientific). Las células se lavaron con PBS, se añadieron 300 μ L de *Laemml*i buffer y el volumen se transfiere a un tubo *Eppendorf*. Posteriormente las muestras se sonicaron, se centrifugaron 10 minutos a 4°C a 13.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo *Eppendorf* nuevo.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo usando el kit colorimétrico *Pierce*TM *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia a 562 nm se midió en un lector de placas Synergy HT (BioTek, Winooski, VT) y la concentración de proteína de cada muestra se calculó utilizando en una recta patrón de suero bovino (BSA, del inglés, *Bovine Serum Albumina*) de concentraciones conocidas entre 0.5 y 10 μ g/mL.

3.5 Análisis Western Blot

Se separaron los extractos de proteína mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con geles comerciales con un gradiente de 4-12% (GeneScript) y tampón MOPS 1X utilizando el sistema de electroforesis vertical Mini-Protean Tetra Cell (Bio Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó utilizando el sistema Mini Trans-Blot (Biorad) durante 7 minutos a 1,3 A siguiendo las instrucciones comerciales.

Las membranas se bloquearon durante 1 hora con BSA y posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-ASAP1 (Novus; Policlonal de conejo) o anti-β-actina (Sigma; Monoclonal de ratón), como control endógeno de carga, a una concentración 1:1000 y 1:2000 respectivamente. Al día siguiente se incubaron con los anticuerpos secundarios: IRdye Goat anti-Rabbit o Goat anti-Mouse (LI-COR Biosciences) a una concentración 1:10000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Para finalizar, las membranas se revelaron utilizando el sistema Odyssey Fc Dual-Mode Imaging System (LI-COR Biosciences), midiendo las distintas señales de fluorescencia: a 700 nm (canal rojo) y a 800 nm (canal verde). Para el análisis de las imágenes se usó el software Image Studio Lite (LI-COR Biosciences).

3.6 Extracción de ARN

Se aisló el ARN total a partir de las diferentes líneas celulares empleando el reactivo Trizol (Invitrogen Life Technologies) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La concentración de ARN se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm (A260) en un nano-espectrofotómetro NANODROP 2000 SPECTROPHOTOMETER (Thermo Scientific®) y la relación entre absorbancias A260/A280 permitió evaluar la calidad del ARN obtenido.

3.7 RT-qPCR

La retrotranscripción se realizó usando el kit Invitrogen™ Superscript™ II Reverse Transcriptase siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En la reacción se usan 1000 µg de ARN de cada muestra, en un volumen final de 21 µL.

La PCR cuantitativa (qPCR, del inglés, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) se llevó a cabo con 1 µL del cDNA resultante de la retrotranscripción. Se prepara una mezcla con 4,5 µM de los correspondientes oligonucleótidos (**Tabla 2**) para los genes ASAP1, ASAP3 o RPL19 (control endógeno) y Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), en un volumen final de 10 µL. La reacción tuvo lugar en un StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada gen se analizó por triplicado, y la expresión se determinó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizada respecto al gen ribosomal RPL19 (control endógeno), y relativa respecto a la condición *empty*.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
ASAP1	CAACGACCTCACGCCTACTCT	TCAC TTTATTTTCCCGTATTGAT
ASAP3	GCGCGGAGCCCTGAA	AGTCTTGCAAAAGTTGCACAGAAC
RPL19	GCGGAAGGGTACAGCCAAT	GCAGCCGGCGCAAA

3.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se empleó la herramienta GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc). Se llevó a cabo el análisis múltiple t-test para el análisis estadístico de los datos. Los datos se representan como media \pm desviación estándar (SD) de al menos 3 experimentos independientes. Los valores $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Generación de líneas celulares derivadas de CECC deficientes (KO) para ASAP1

Para investigar el posible papel biológico de ASAP1 en la progresión tumoral de CECC, como primer paso nos planteamos generar líneas tumorales deficientes (KO) para ASAP1. Estas líneas nos permitirán estudiar su contribución en distintas funciones clave para el desarrollo tumoral como son la proliferación/viabilidad o la invasión. La generación de modelos celulares deficientes en ASAP1 se realizó empleando el sistema de edición genética CRISPR/Cas9.

Para ello, primero se diseñaron los ARNs guía (sgRNAs) y se subclonaron en el vector pKLV2-U6gRNA5 (BbsI)- PKGpuro2AZsG-W. Tras comprobar mediante secuenciación las construcciones generadas para cada sgRNA, se transfectaron células HEK293T con los plásmidos que contienen los sgRNAs o el vector vacío y los plásmidos que contienen los componentes estructurales de los lentivirus (pLP1, pLP2 y VsVg) y generar los

correspondientes lentivirus. El medio conteniendo los virus se filtró con un filtro de 0,45 μm y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Posteriormente, se seleccionaron las líneas derivadas de CECC, UT-SCC38 (laringe) y FaDu (faringe) para la generación de modelos deficientes (KO) de ASAP1. En el laboratorio se disponían de ambas líneas con expresión estable de Cas9, por lo tanto, se procedió a infectar las líneas UT-SCC38/Cas9 y FaDu/Cas9 con los lentivirus que contenían los plásmidos con diferentes sgRNAs para ASAP1 o lentivirus con el vector vacío (*empty*; condición control).

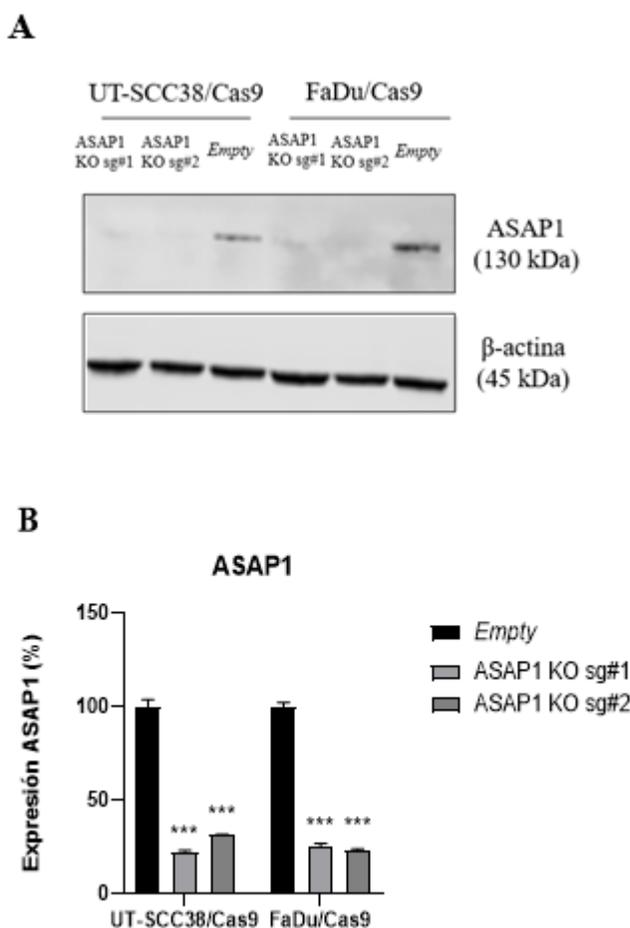


Figura 8. Generación de líneas celulares derivadas de CECC deficientes en ASAP1 mediante la tecnología CRISPR/Cas9. (A) Análisis Western Blot de la expresión de ASAP1 en las líneas UT-SCC38/Cas9 y FaDu/Cas9 tras la infección con lentivirus portadores del vector vacío (*empty*), el sgRNA#1 o el sgRNA#2 para ASAP1. (B) Análisis de la expresión de ASAP1 mediante RT-qPCR. La cuantificación de los niveles de ARNm de ASAP1 fue normalizada respecto a RPL19 (control endógeno de expresión constitutiva) y relativa a la condición control (*empty*). Los datos se representan como media \pm SD. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo mediante t-test. Los valores *** $p \leq 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

El silenciamiento de la expresión de ASAP1 se comprobó mediante Western Blot. Como se muestra en la **Figura 8A**, se obtuvo un robusto bloqueo de los niveles endógenos de ASAP1 a nivel de proteína en las dos líneas celulares utilizadas, siendo indetectable la expresión de ASAP1 tanto con sgRNA#1 como con sgRNA#2 (**Figura 8A**). A partir de este punto llamaremos a las líneas celulares generadas UT-SCC38/Cas9 ASAP1 KO y FaDu/Cas9 ASAP1 KO respectivamente, mientras que las infectadas con los lentivirus con los vectores vacíos (condición control), se denominan UT-SCC38/Cas9 *empty* y FaDu/Cas9 *empty*.

También se evaluó el silenciamiento de ASAP1 a nivel de ARNm mediante RTqPCR. Los resultados de este análisis mostraron una reducción de los niveles endógenos de ASAP1 del 75% con el sg#1 y del 60% con el sg#2 para la línea UT-SCC38/Cas9. En la línea celular FaDu/Cas9 se observó una bajada del 75% con el sg#1 y del 80% con el sg#2 (**Figura 8B**).

Con el fin de comprobar el efecto del silenciamiento en otros miembros de la familia, se analizó la expresión de ASAP3 mediante RTqPCR. Los resultados de este análisis mostraron una bajada parcial de la expresión endógena de ASAP3 en las líneas ASAP1 KO. En concreto, en la línea UT-SCC38/Cas9 ASAP1 KO, la expresión de ASAP3 se redujo un 50% con el sg#1 y un 40% con el sg#2. Los resultados para la línea celular FaDu/Cas9 ASAP1 KO mostraron una bajada del 35% con el sg#1 y un 42% con el sg#2 (**Figura 9A**).

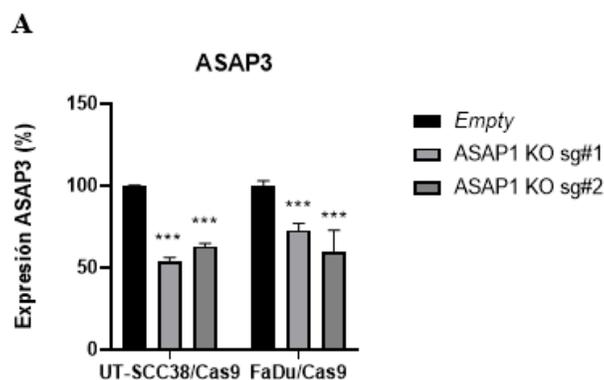


Figura 9. Análisis de los niveles de ARNm de ASAP3 en líneas celulares CECC deficientes en ASAP1. Cuantificación de la expresión de ASAP3 mediante RTqPCR. Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de RPL19 (control endógeno) y relativos a la condición control *empty*. Los datos se representan como media \pm SD. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo mediante t-test. Los valores $***p \leq 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4.2 Efecto del silenciamiento/bloqueo de ASAP1 en la viabilidad y proliferación celular

Una vez establecidas las líneas derivadas de CECC deficientes en ASAP1, y con el fin de estudiar el papel de esta proteína en la viabilidad celular, se llevaron a cabo ensayos MTS en ambas líneas ASAP1 KO.

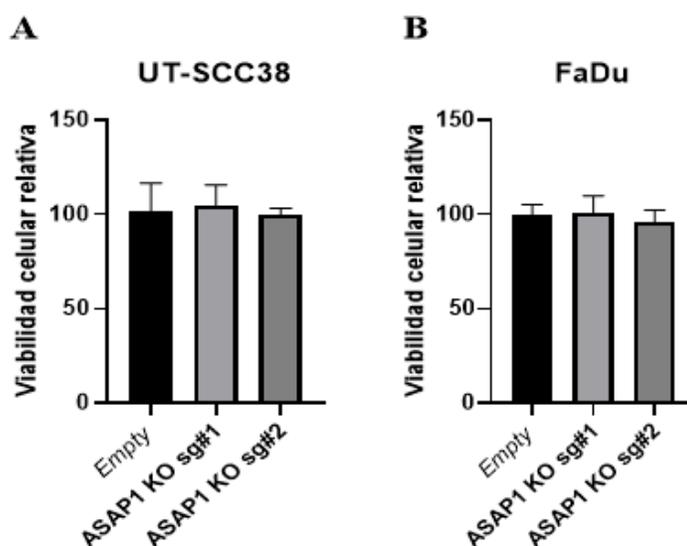


Figura 10. Efecto del bloqueo de ASAP1 en la viabilidad celular de líneas CECC. La viabilidad celular se cuantificó mediante MTS para las líneas (A) UT-SCC38/Cas9 *empty* y ASAP1 KO sg#1 y sg#2 y (B) FaDu/Cas9 *empty* y ASAP1 KO sg#1 y sg#2 a las 96h post-siembra. Los valores de Abs490 nm se normalizaron respecto a la Abs a día 0 y se presentan relativos a la condición *empty*. Los datos se representan como media \pm SD y provienen de 4 experimentos independientes realizados por quintuplicado. Las comparaciones entre dos grupos se llevaron a cabo mediante t-test.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguna de las dos líneas celulares derivadas de CECC analizadas (**Figura 10A, B**), lo cual indica que el silenciamiento de ASAP1 no afecta a la viabilidad de las líneas tumorales testadas.

Paralelamente, se llevaron a cabo ensayos de colonias (*colony assays*) para analizar el efecto de esta proteína en la proliferación celular (**Figura 11A**).

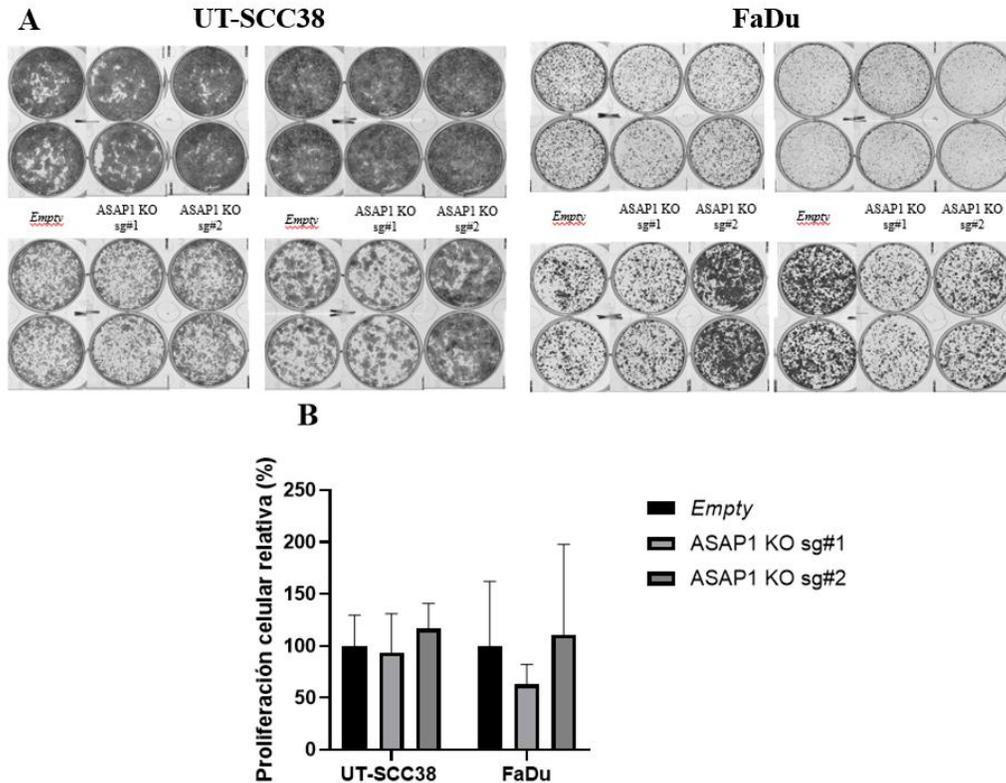


Figura 11. (A) Efecto del silenciamiento de ASAP1 en la proliferación de líneas de CECC, mediante ensayos clonogénicos o de formación de colonias. (A) Imágenes de los ensayos de colonias realizados en las líneas UT-SCC38/Cas9 *empty* (control), UT-SCC38/Cas9 KO sg#1 y sg#2, FaDu/Cas9 *empty* (control) y FaDu/Cas9 KO sg#1 y sg#2. A los 10 días post-siembra las colonias formadas fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Las placas se escanearon utilizando el GelCount (Oxford Optronix) y la superficie ocupada fue cuantificada con la herramienta de análisis ImageJ. (B) Representación de la cuantificación del área teñida en los ensayos de colonias. Los porcentajes de superficie ocupada por las colonias se normalizaron respecto a la condición control (*empty*). Los datos se representan como media \pm SD y provienen de 4 experimentos independientes realizados por duplicado. Las comparaciones entre dos grupos se llevaron a cabo mediante t-test.

No se observaron diferencias significativas entre las condiciones *empty* control y ASAP1 KO en ninguna de las líneas celulares analizadas (**Figura 11 A y B**). Cabe destacar que, aunque se apreciaron ciertas diferencias en algún ensayo individual fueron debidas a la variabilidad entre experimentos, lo que se refleja en el tamaño de las barras de error de algunas condiciones principalmente para la línea FaDu. El análisis conjunto de los datos de los 4 experimentos independientes realizados para cada línea no mostró diferencias significativas

entre las condiciones estudiadas. En concordancia con los resultados de los ensayos de viabilidad, ASAP1 no parece estar regulando la proliferación de las líneas de CECC testadas.

4.1 Efecto del silenciamiento de ASAP1 en la capacidad invasiva

Dado el importante papel de ASAP1 en procesos de remodelación del citoesqueleto de actina, motilidad celular e invasión (Vitali *et al.*, 2019; Randazzo *et al.*, 2000), se estudió el impacto del silenciamiento de esta proteína en la capacidad invasiva de las líneas tumorales derivadas de CECC. Para ello, se emplearon ensayos de invasión con esferoides de células tumorales embebidos en una matriz tridimensional de colágeno.

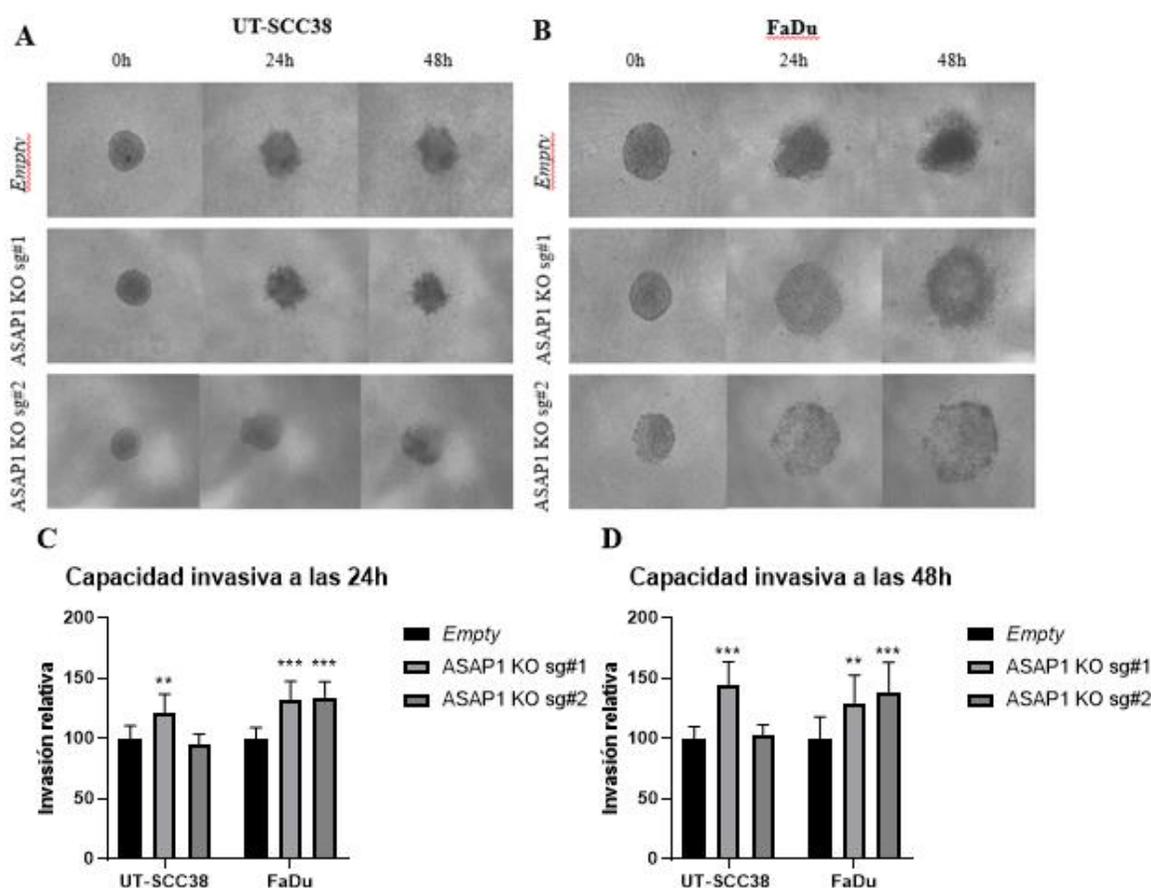


Figura 12. Efecto del silenciamiento de ASAP1 en la capacidad invasiva de líneas derivadas de CECC. Imágenes representativas de los esferoides tumorales en una matriz 3D de colágeno, a tiempo 0, a las 24 h y a las 48 h en la línea (A) UT-SCC38/Cas9 *empty*, ASAP1 KO sg#1 y sg#2 y (B) FaDu/Cas9 *empty*, ASAP1 KO sg#1 y sg#2. La capacidad invasiva de los esferoides tumorales se determinó a las 24 y 48h, midiendo el área del esferoide en cada tiempo final (t = 24h y t = 48h), que se normalizó respecto al área a tiempo inicial (t = 0h) y se representó relativo respecto a su condición *empty*. Las imágenes se capturaron con un microscopio invertido Leica DMi1 y cuantificaron con el programa ImageJ. Los datos se representan como media \pm SD, procedentes de 3 experimentos

independientes realizados por triplicado. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo mediante t-test. Los valores $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Los ensayos de invasión mostraron un aumento significativo, en la capacidad invasiva de las líneas CECC que tienen ASAP1 silenciado (**Figura 12**). Los resultados muestran que el incremento de invasión es similar en ambas líneas celulares y bastante consistente, en torno al 20-30% a las 24 horas y en torno al 30-40% a las 48 horas respecto a la condición control (*empty*). Sin embargo, en el caso de la línea celular UT-SCC38, solamente se observó un aumento de la invasión con el sg#1 (**Figura 12**).

Estos resultados indican que el bloqueo de ASAP1 no sería una estrategia efectiva para inhibir la capacidad invasiva de las líneas CECC, sino que aumenta la invasión de las dos líneas testadas UT-SCC38 y FaDu.

5. DISCUSIÓN

A pesar de los continuos avances en las distintas modalidades de tratamiento, la esperanza de vida de los pacientes afectados por CECC no ha mejorado de manera sustancial en las últimas décadas (Leemans *et al.*, 2011). Por ello continúa existiendo un gran interés por identificar marcadores moleculares que aumenten la sensibilidad de las técnicas diagnósticas, mejoren el poder predictivo de los marcadores clínico-patológicos actuales, y faciliten el manejo clínico de los pacientes con CECC, incorporando marcadores que predigan el riesgo de desarrollar recidivas o metástasis, ayuden al seguimiento de los pacientes o permitan estratificarlos mejor seleccionando solamente aquellos pacientes que se beneficien de un tratamiento específico. Además, estos marcadores podrían servir como nuevas dianas terapéuticas. Para alcanzar este objetivo, profundizar en el conocimiento de los cambios moleculares que acompañan las diferentes etapas del proceso tumoral es una cuestión fundamental, así como identificar los genes/proteínas que tengan un papel clave como *drivers* de la progresión tumoral que permitan el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más selectivas y eficaces para pacientes con CECC.

Los CECC constituyen una enfermedad compleja y heterogénea (intra e intertumoral). Estos tumores albergan múltiples alteraciones genéticas y moleculares, y numerosas aberraciones

cromosómicas recurrentes como consecuencia de la exposición a los carcinógenos del tabaco y el alcohol (Leemans *et al.*, 2011). Las amplificaciones de las regiones 3q26, 8q24 y 11q13 se han asociado con mal pronóstico en CECC (Lin *et al.*, 2006) y otros cánceres, lo que sugiere que albergan posibles oncogenes y esto ha impulsado que sean objeto de intenso estudio para identificar los genes *drivers*. Se han identificado varios genes dentro de estas regiones con una función conocida como reguladores del citoesqueleto de actina, algunos de ellos ya conocidos mediadores de invasión y metástasis en varios tipos de cáncer como la Cortactina (CTTN), la quinasa de adhesión focal (FAK) y la proteína activadora de GTPasa ASAP1 (Lin *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que estas proteínas forman complejo y por tanto podrían promover la invasión y metástasis actuando individualmente o de forma coordinada (Kelley *et al.*, 2008).

En estudios previos de nuestro grupo se ha investigado el significado clínico y biológico de CTTN y FAK en la progresión de los CECC y también en las etapas iniciales de tumorigénesis. Nuestro grupo ha sido pionero demostrando la utilidad de CTTN y FAK como potentes predictores del riesgo de cáncer oral (de Vicente *et al.*, 2012) y de laringe, por encima del grado de displasia que es el actual *gold standard* en la rutina clínica (Rodrigo *et al.*, 2011). Estos resultados fueron validados en un estudio independiente multicéntrico (Villaronga *et al.*, 2018), lo que impulsó su implementación en el HUCA como los primeros marcadores moleculares para evaluar el riesgo de cáncer en pacientes con lesiones premalignas (displasias) de laringe y cavidad oral. Al igual que las proteínas FAK y CTTN desempeñan un papel importante como reguladores de la invasión en CECC y otros cánceres, ASAP1 podría participar también activamente en los procesos invasivos.

Otro aspecto que comparten CTTN, FAK y ASAP1 es que los tres son efectores regulados por la quinasa SRC, bien reconocido como oncogén en múltiples cánceres, que los fosforila modulando su actividad. Nuestro laboratorio también ha demostrado la relevancia clínica de la expresión de SRC activo y sus efectores FAK y ASAP1 en los CECC, todos ellos como marcadores de mal pronóstico en laringe (Hermida-Prado *et al.*, 2019). Se han generado diferentes inhibidores farmacológicos de SRC y el potencial de esta quinasa como una posible diana terapéutica está siendo activamente explorado en modelos preclínicos y ensayos clínicos con pacientes con CECC y otros tipos de cáncer.

Por todo ello, el objetivo principal de este trabajo ha consistido en investigar el papel patobiológico de ASAP1 en los CECC. Partimos de la base de que la desregulación de ASAP1, además de nuestras observaciones en CECC, se ha relacionado en múltiples ocasiones con mal pronóstico y metástasis en distintos tipos de cáncer (mama, colorrectal, melanoma, próstata...). Por lo tanto, para evaluar el potencial de ASAP1 como biomarcador y/o diana terapéutica útil en CECC, hemos generado modelos celulares de CECC deficientes en ASAP1 en células tumorales de laringe (UT-SCC38) y faringe (FaDu) utilizando la tecnología de edición genética CRISPR/Cas9.

Como primer paso hemos confirmado mediante análisis Western Blot el potente silenciamiento de ASAP1 en las líneas *knock out* (UT-SCC38 y FaDu) generadas con dos sgRNAs diferentes respecto a la línea control (*empty*). Posteriormente hemos usado estas líneas para caracterizar funcionalmente el papel de ASAP1 en procesos de viabilidad, proliferación e invasión. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los ensayos de viabilidad (MTS) o de proliferación (ensayos de formación de colonias), lo que refleja que ASAP1 no parece jugar un papel importante en estos procesos. Sin embargo, observamos que el silenciamiento de ASAP1 aumenta significativamente la capacidad invasiva de las células tumorales en ensayos de invasión en matrices 3D de colágeno. Estos datos contrastan con la bibliografía existente que relaciona la sobreexpresión de ASAP1 con malignidad e invasión en distintos tipos de cáncer. También existen estudios en los que se ha encontrado que la sobreexpresión de Arf6 y sus efectores, entre los que se encuentra ASAP1, desempeñan un importante papel durante la tumorigénesis o la angiogénesis tumoral, y que al bloquear estas moléculas se reduce la capacidad de invasión, migración y/o proliferación tanto *in vivo* como *in vitro* (Lin *et al.*, 2008; Randazzo *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2017). En nuestro caso, no hemos observado que el silenciamiento genético de ASAP1 reduzca la invasión, sino que conlleva un aumento de la capacidad invasiva de las dos líneas tumorales testadas UT-SCC38 y FaDu. Este hecho sugiere que el bloqueo efectivo en estas rutas en el contexto de CECC requiere la inhibición de más efectores de la ruta de Arf6, o que ASAP1 no sea la molécula principal a través de la que Arf6 desempeña su papel.

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron la efectividad de los inhibidores de la familia SRC (dasatinib y saracatinib) bloqueando dramáticamente la capacidad invasiva de

las células tumorales mediante la inhibición de su actividad quinasa (Hermida-Prado *et al.*, 2019). Sin embargo, en nuestro caso el silenciamiento de ASAP1 no es capaz de reducir la capacidad invasiva de las líneas de CECC. Estos datos también sugieren que ASAP1 no parece funcionar como oncogén en el contexto de CECC regulando funciones clave de la biología de la célula tumoral como la proliferación o invasión celular. Su papel parece ser dependiente del contexto celular y/o tisular, aunque la expresión de ASAP1 se ha detectado alterada en diferentes tipos tumorales y se ha propuesto su utilidad como biomarcador. También se ha descrito la participación de ASAP1 en diferentes vías de señalización relacionadas con el desarrollo de tumorigénesis (Onodera *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014; Hashimoto *et al.*, 2019). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que ASAP1 no tendría un papel activo como *driver* en la transformación maligna de los CECC. Por otro lado, dado que habíamos observado que los inhibidores de SRC como dasatinib y saracatinib bloquean potentemente la invasión de líneas de CECC (Hermida-Prado *et al.*, 2019), nuestros resultados revelan que ASAP1 como efector de SRC no sería responsable como mediador de invasión. Así, la frecuente alteración de la expresión de ASAP1 que encontramos en biopsias de pacientes con CECC (Hermida-Prado *et al.*, 2019) presumiblemente constituye una alteración *passenger* que acompaña a otras alteraciones promotoras (*drivers*) de la progresión tumoral. Como habíamos demostrado previamente, este es el caso para FAK y CTTN, que participan activamente en el desarrollo y transformación maligna de los CECC (Rodrigo *et al.*, 2011; de Vicente *et al.*, 2012; Villaronga *et al.*, 2018).

En conjunto, nuestros resultados revelan que tras estudiar específicamente la contribución de ASAP1 en CECC, esta proteína no funciona como oncogén durante la progresión en este tipo tumoral como planteamos inicialmente. Basándonos en los resultados de este trabajo, en la bibliografía existente y en estudios previos de nuestro laboratorio, podemos concluir que ASAP1 podría tener utilidad como marcador de mal pronóstico en CECC y en otros tipos tumorales, pero nuestros resultados sugieren que no parece tener potencial como diana terapéutica al menos en este tipo tumoral. En este sentido, otras proteínas como CTTN y FAK relacionadas funcionalmente con ASAP1 emergen por sus características como mejores candidatos como dianas para el desarrollo de fármacos específicos que podrían ser efectivos tanto para el tratamiento como la prevención de CECC.

6. CONCLUSIONES

1. Se han generado con éxito modelos deficientes de ASAP1 en las líneas derivadas de CECC (UT-SCC38 y FaDu), que muestran un robusto silenciamiento de la expresión endógena de la proteína ASAP1.
2. El silenciamiento genético de ASAP1 no afecta a la proliferación ni a la viabilidad de las líneas tumorales UT-SCC38 y FaDu.
3. El silenciamiento de ASAP1 aumenta significativamente la capacidad invasiva de las líneas tumorales UT-SCC38 y FaDu, lo que sugiere que el bloqueo funcional de ASAP1 no sería una estrategia terapéutica efectiva en CECC.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bockmühl, U., Schlüns, K., Küchler, I., Petersen, S., & Petersen, I. (2000). Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. *The American Journal of Pathology*, *157*(2), 369–375. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64549-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64549-X)
2. Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., & Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Research*, *56*(11), 2488–2492. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8653682/>
3. Carey, T. E., Frank, C. J., Raval, J. R., Jones, J. W., McClatchey, K. D., Beals, T. F., Worsham, M. J., & van Dyke, D. L. (1997). Identifying genetic changes associated with tumor progression in squamous cell carcinoma. *Acta otolaryngologica*, *117*(sup529), 229–232. <https://doi.org/10.3109/00016489709124130>
4. Choi, H. R., Roberts, D. B., Johnigan, R. H., Sturgis, E. M., Rosenthal, D. I., Weber, R. S., Luna, M. A., Batsakis, J. G., & El-Naggar, A. K. (2004). Molecular and clinicopathologic comparisons of head and neck squamous carcinoma variants: common and distinctive features of biological significance. *The American Journal of Surgical Pathology*, *28*(10), 1299–1310. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000138003.46650.dc>
5. de Vicente, J. C., Rodrigo, J. P., Rodriguez-Santamarta, T., Lequerica-Fernández, P., Allonca, E., & García-Pedrero, J. M. (2012). Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions. *Oral Oncology*, *48*(7), 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.02.004>
6. Donaldson, J. G., & Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(6), 362–375. <https://doi.org/10.1038/nrm3117>
7. El-Naggar, A. K., Coombes, M. M., Batsakis, J. G., Hong, W. K., Goepfert, H., & Kagan, J. (1998). Localization of chromosome 8p regions involved in early tumorigenesis of oral and laryngeal squamous carcinoma. *Oncogene*, *16*(23), 2983–2987. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201808>

8. Haines, E., Saucier, C., & Claing, A. (2014). The adaptor proteins p66Shc and Grb2 regulate the activation of the GTPases ARF1 and ARF6 in invasive breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 5687–5703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.516047>
9. Hashimoto, S., Furukawa, S., Hashimoto, A., Tsutaho, A., Fukao, A., Sakamura, Y., Parajuli, G., Onodera, Y., Otsuka, Y., Handa, H., Oikawa, T., Hata, S., Nishikawa, Y., Mizukami, Y., Kodama, Y., Murakami, M., Fujiwara, T., Hirano, S., & Sabe, H. (2019). ARF6 and AMAP1 are major targets of KRAS and TP53 mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(35), 17450–17459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901765116>
10. Hemmi, T., Suzuki, J., Ishii, R., Ikeda, R., Kobayashi, Y., Ikushima, H., Nomura, K., Sugawara, M., Ohkoshi, A., & Katori, Y. (2022). Effect of treatments for head and neck cancer on sinus shadow on computed tomography. *Auris, Nasus, Larynx*. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2022.03.020>
11. Hermida-Prado, F., Granda-Díaz, R., Del-Río-Ibisate, N., Villaronga, M. Á., Allonca, E., Garmendia, I., Montuenga, L. M., Rodríguez, R., Vallina, A., Alvarez-Marcos, C., Rodrigo, J. P., & García-Pedrero, J. M. (2019). The differential impact of SRC expression on the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers*, 11(11), 1644. <https://doi.org/10.3390/cancers11111644>
12. Hermida-Prado, F., Villaronga, M. Á., Granda-Díaz, R., Del-Río-Ibisate, N., Santos, L., Hermosilla, M. A., Oro, P., Allonca, E., Agorreta, J., Garmendia, I., Tornín, J., Perez-Escuredo, J., Fuente, R., Montuenga, L. M., Morís, F., Rodrigo, J. P., Rodríguez, R., & García-Pedrero, J. M. (2019). The SRC inhibitor dasatinib induces stem cell-like properties in head and neck cancer cells that are effectively counteracted by the mithralog EC-8042. *Journal of Clinical Medicine*, 8(8), 1157. <https://doi.org/10.3390/jcm8081157>
13. Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(9), a005074. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005074>

14. Inoue, H., Ha, V. L., Prekeris, R., & Randazzo, P. A. (2008). Arf GTPase-activating protein ASAP1 interacts with Rab11 effector FIP3 and regulates pericentrosomal localization of transferrin receptor-positive recycling endosome. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(10), 4224–4237. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0290>
15. Jian, X., Brown, P., Schuck, P., Gruschus, J. M., Balbo, A., Hinshaw, J. E., & Randazzo, P. A. (2009). Autoinhibition of Arf GTPase-activating protein activity by the BAR domain in ASAP1. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(3), 1652–1663. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804218200>
16. Kam, J. L., Miura, K., Jackson, T. R., Gruschus, J., Roller, P., Stauffer, S., Clark, J., Aneja, R., & Randazzo, P. A. (2000). Phosphoinositide-dependent activation of the ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein ASAP1: Evidence for the pleckstrin homology domain functioning as an allosteric site. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(13), 9653–9663. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9653>
17. Kelley, L. C., Shahab, S., & Weed, S. A. (2008). Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*, *25*(4), 289–304. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9154-6>
18. Kramer, R. H., Shen, X., & Zhou, H. (2005). Tumor cell invasion and survival in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, *24*(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5046-2>
19. Krishnamurthy, S., Ahmed, I., Bhise, R., Mohanti, B. K., Sharma, A., Rieckmann, T., Paterson, C., & Bonomo, P. (2022). The dogma of Cetuximab and Radiotherapy in head and neck cancer - A dawn to dusk journey. *Clinical and Translational Radiation Oncology*, *34*, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2022.03.009>
20. Lacas, B., Bourhis, J., Overgaard, J., Zhang, Q., Grégoire, V., Nankivell, M., Zackrisson, B., Szutkowski, Z., Suwiński, R., Poulsen, M., O’Sullivan, B., Corvò, R., Laskar, S. G., Fallai, C., Yamazaki, H., Dobrowsky, W., Cho, K. H., Beadle, B., Langendijk, J. A., ... MARCH Collaborative Group. (2017). Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. *The Lancet Oncology*, *18*(9), 1221–1237. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30458-](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30458-8)

21. Leemans, C. R., Snijders, P. J. F., & Brakenhoff, R. H. (2018). The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *18*(5), 269–282. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.11>
22. Li, R., Peng, C., Zhang, X., Wu, Y., Pan, S., & Xiao, Y. (2017). Roles of Arf6 in cancer cell invasion, metastasis and proliferation. *Life Sciences*, *182*, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.06.008>
23. Lin, M., Smith, L. T., Smiraglia, D. J., Kazhiyur-Mannar, R., Lang, J. C., Schuller, D. E., Kornacker, K., Wenger, R., & Plass, C. (2006). DNA copy number gains in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, *25*(9), 1424–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209166>
24. Liu, Y., Loijens, J. C., Martin, K. H., Karginov, A. V., & Parsons, J. T. (2002). The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(6), 2147–2156. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-01-0018>
25. Marur, S., & Forastiere, A. A. (2008). Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic*, *83*(4), 489–501. <https://doi.org/10.4065/83.4.489>
26. Moreno-Layseca, P., & Streuli, C. H. (2014). Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *34*, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.011>
27. Oka, S., Uramoto, H., Shimokawa, H., Yamada, S., & Tanaka, F. (2014). Epidermal growth factor receptor-GEP100-Arf6 axis affects the prognosis of lung adenocarcinoma. *Oncology*, *86*(5–6), 263–270. <https://doi.org/10.1159/000360089>
28. Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., Ogawa, E., Adachi, M., Sakurai, T., Manabe, T., Wada, H., Matsuura, N., & Sabe, H. (2005). Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *The EMBO Journal*, *24*(5), 963–973. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600588>

29. Onodera, Y., Nam, J.-M., Hashimoto, A., Norman, J. C., Shirato, H., Hashimoto, S., & Sabe, H. (2012). Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *The Journal of Cell Biology*, *197*(7), 983–996. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201065>
30. Randazzo, P. A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y. Q., Stauffer, S., Roller, P., & Cooper, J. A. (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(8), 4011–4016. <https://doi.org/10.1073/pnas.070552297>
31. Randazzo, Paul A., Inoue, H., & Bharti, S. (2007). Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton. *Biology of the Cell*, *99*(10), 583–600. <https://doi.org/10.1042/bc20070034>
32. Ranganathan, S., Ningappa, M., Ashokkumar, C., Higgs, B. W., Min, J., Sun, Q., Schmitt, L., Subramaniam, S., Hakonarson, H., & Sindhi, R. (2016). Loss of EGFR-ASAP1 signaling in metastatic and unresectable hepatoblastoma. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep38347>
33. Rodrigo, J. P., Álvarez-Alija, G., Menéndez, S. T., Mancebo, G., Allonca, E., García-Carracedo, D., Fresno, M. F., Suárez, C., & García-Pedrero, J. M. (2011). Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with laryngeal premalignancy. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *4*(8), 1333–1341. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0338>
34. Sabe, H., Hashimoto, S., Morishige, M., Hashimoto, A., & Ogawa, E. (2008). The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer: Full invasiveness is not from the inside. *Cell adhesion & migration*, *2*(2), 71–73. <https://doi.org/10.4161/cam.2.2.6191>
35. Sato, H., Hatanaka, K. C., Hatanaka, Y., Hatakeyama, H., Hashimoto, A., Matsuno, Y., Fukuda, S., & Sabe, H. (2014). High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *12*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-17>

36. Schreiber, C., Gruber, A., Roßwag, S., Saraswati, S., Harkins, S., Thiele, W., Foroushani, Z. H., Munding, N., Schmaus, A., Rothley, M., Dimmler, A., Tanaka, M., Garvalov, B. K., & Sleeman, J. P. (2022). Loss of ASAP1 in the MMTV-PyMT model of luminal breast cancer activates AKT, accelerates tumorigenesis, and promotes metastasis. *Cancer Letters*, 533(215600), 215600. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215600>
37. Slaughter, D. P., Southwick, H. W., & Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6(5), 963–968. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195309\)6:5<963::aid-cncr2820060515>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195309)6:5<963::aid-cncr2820060515>3.0.co;2-q)
38. Villaronga, M. Á., Hermida-Prado, F., Granda-Díaz, R., Menéndez, S. T., Álvarez-Teijeiro, S., Quer, M., Vilaseca, I., Allonca, E., Garzón-Arango, M., Sanz-Moreno, V., Astudillo, A., Rodrigo, J. P., & García-Pedrero, J. M. (2018). Immunohistochemical expression of cortactin and focal adhesion kinase predicts recurrence risk and laryngeal cancer risk beyond histologic grading. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 27(7), 805–813. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-1082>
39. Vitali, T., Girald-Berlingeri, S., Randazzo, P. A., & Chen, P.-W. (2019). Arf GAPs: A family of proteins with disparate functions that converge on a common structure, the integrin adhesion complex. *Small GTPases*, 10(4), 280–288. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1299271>
40. Wise-Draper, T. M., Bahig, H., Karivedu, V., & Burtness, B. (2022). Current therapy for metastatic head and neck cancer: Evidence, opportunities, and challenges. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology Meeting*, 42(42), 1–14. https://doi.org/10.1200/EDBK_350442
41. Zhang, L., Shi, S.-B., Zhu, Y., Qian, T.-T., & Wang, H.-L. (2018). Long non-coding RNA ASAP1-IT1 promotes cell proliferation, invasion and metastasis through the PTEN/AKT signaling axis in non-small cell lung cancer. *European Review for*

Medical and Pharmacological Sciences, 22(1), 142–149.
https://doi.org/10.26355/eurrev_201801_14111