

ICMT como potencial biomarcador en el cáncer

ICMT as a potential biomarker in cancer

Evelyn Arel Zalazar^{1*}, Nabila Cocordano^{1*}, Sabrina Valente¹, Javier Girardini¹, Carla Borini Etichetti².

*Autoría compartida

¹ Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (CONICET — UNR). Rosario; Argentina.

² Instituto de Fisiología Experimental de Rosario (CONICET — UNR). Rosario; Argentina.

Autor responsable de la correspondencia:

Carla Borini Etichetti—borinietichetti@idicer-conicet.gob.ar

Conflicto de Intereses: no presenta

Resumen

ICMT cataliza el último paso de un proceso de modificación postraduccional que afecta residuos de cisteína C-terminal en ciertas proteínas. En los últimos años, varios estudios demostraron que puede desempeñar un papel en la carcinogénesis. Con el fin de profundizar la caracterización del rol patológico de esta enzima, utilizamos herramientas bioinformáticas para analizar su expresión en bases de datos de pacientes y posibles correlaciones con la evolución clínica. La expresión de ICMT se encuentra extendida en casi todos los tejidos del organismo y está incrementada en la mayoría de los tumores respecto a los correspondientes tejidos sanos. A su vez, la sobreexpresión de ICMT se correlaciona con una menor supervivencia general de los pacientes en un gran número de tumores. A partir de datos de alteración genética de ICMT, observamos que la proporción de pacientes con cambios en el número de copias, fusiones o mutaciones en el mismo es muy baja. Estas observaciones indican que sus efectos protumorales pueden asociarse a cambios en su nivel de expresión. En conjunto, este estudio aporta evidencias que subrayan el valor pronóstico y el papel oncogénico de ICMT en múltiples tipos tumorales.

Palabras claves: ICMT. Carboximetilación. Proteínas CAAX. Cáncer.

Abstract

ICMT encodes the third of three enzymes that posttranslationally modify C-terminal cysteine residues in certain proteins. In the last few years, several studies have shown that it may play a role in carcinogenesis. In order to deepen the characterization of the pathological role of this enzyme, we used bioinformatic tools to analyze its expression in patient databases and possible correlations with clinical evolution. ICMT expression is widespread in almost all tissues of the body and it is increased in most tumors with regard to the corresponding healthy tissues. Furthermore, ICMT overexpression correlates with decreased overall patient survival in a large number of tumor types. From ICMT genetic alteration data, we observed that the proportion of patients with ICMT copy number variations, fusions or mutations is very low. This indicates that its protumoral effects may be associated with changes in its expression level. Altogether, this study provides evidence that underscores the prognostic value and oncogenic role of ICMT in multiple tumor types.

Key words: ICMT. Carboxymethylation. CAAX proteins. Cancer.

Introducción

El cáncer es una patología compleja y una de las principales causas de muerte a nivel mundial (1). Se origina como consecuencia de perturbaciones en los mecanismos que controlan el comportamiento autónomo de las células y su respuesta al entorno y a la fisiología del organismo. Su complejidad radica en la multifactorialidad de los fenómenos moleculares asociados a su etiología y progresión, a través de los cuales se afecta profundamente el comportamiento celular. Es así que, como resultado de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, se perturban procesos tales como el ciclo celular, la reparación del ADN, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Estas alteraciones tienen como consecuencia una serie de fenómenos característicos de los tumores, entre los que se encuentran la autosuficiencia en las señales de crecimiento y proliferación, la insensibilidad a las señales antiproliferativas, la evasión a la apoptosis, la inducción de angiogénesis y la invasión (Figura 1).

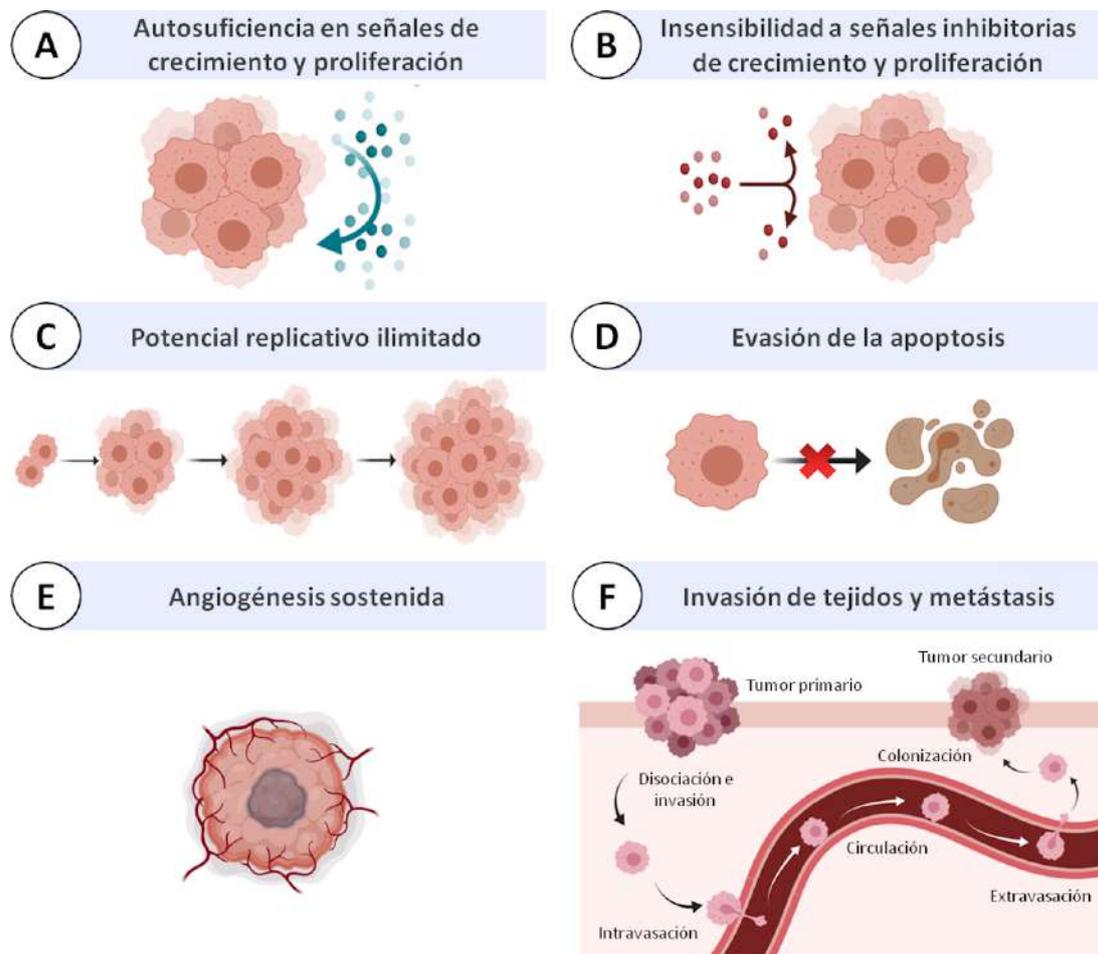


Figura 1. Capacidades adquiridas por las células tumorales. La mayoría de los tumores sólidos, a través de diferentes estrategias, adquieren un conjunto de capacidades funcionales durante su desarrollo.

La conjunción de estas perturbaciones deriva en un elevado potencial replicativo que favorece la expansión del tumor, y en la posibilidad de adquirir fenotipos más agresivos y desarrollar metástasis, lo que conlleva a la muerte del individuo en aproximadamente el 90% de los casos (2,3).

Modificación de proteínas por prenilación

La vía de procesamiento postraducciona, conocida como prenilación, comprende tres etapas y suele darse en proteínas con un motivo CAAX (C = cisteína, A = aminoácido alifático, X = cualquier aminoácido), aunque proteínas conteniendo otros motivos como CXC pueden también ser modificadas (4). Inicialmente, se adiciona un grupo isoprenoide, farnesilo (15 carbonos) o geranylgeranilo (20 carbonos), al residuo de cisteína del motivo CAAX, por acción de las enzimas

Farnesil Transferasa (FTasa) o Geranilgeranil Transferasa 1 (GGTasa I), respectivamente. Luego, el tripéptido AAX es eliminado por una proteasa específica conocida como Endoproteasa Convertidora de Ras1 (RCE1), en la membrana del retículo endoplasmático. Por último, se produce la metilación del extremo carboxilo libre de la cisteína, catalizado por la proteína Isoprenil-Cistein-Carboxi-Metiltransferasa (ICMT), también en la membrana del retículo endoplasmático. En esta reacción, se consume S-adenosilmetionina (AdoMet), la cual participa como dadora del grupo metilo, y se genera S-adenosilhomocisteína (AdoHcy) como producto (Figura 2).

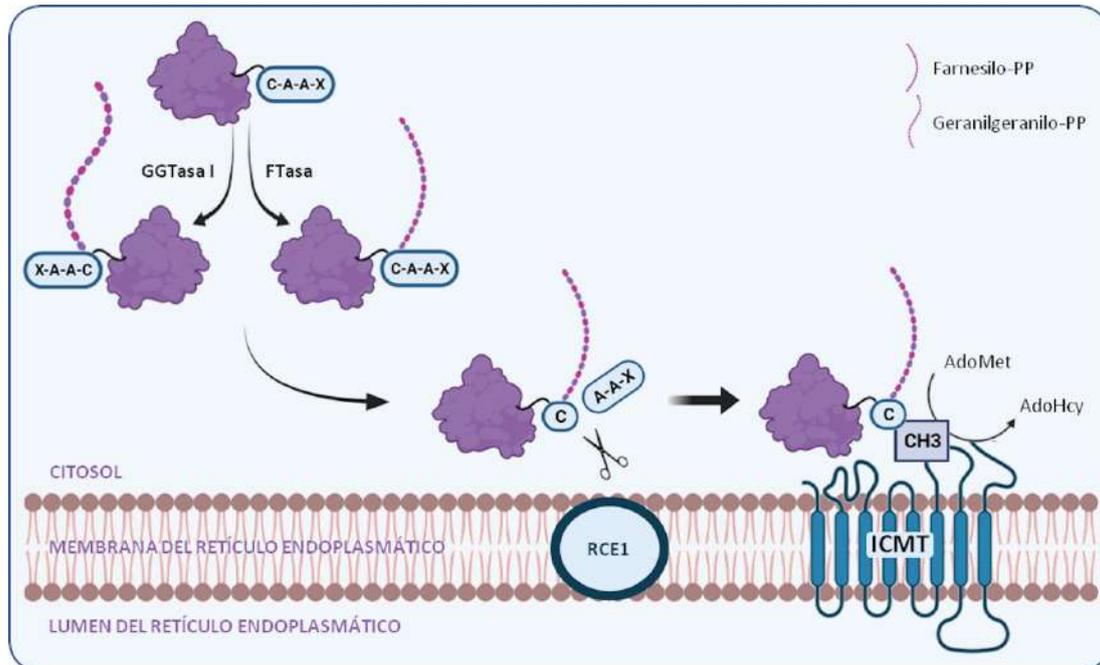


Figura 2. Esquema de la vía de prenilación de proteínas CAAX. Las enzimas citosólicas FTasa y GGTasa I agregan un isoprenoide farnesilo o geranilgeranilo, respectivamente, al residuo de cisteína del motivo CAAX de la proteína sustrato. Las modificaciones post-prenilación se producen en la superficie citosólica del retículo endoplasmático por acción de RCE1 e ICMT, ambas proteínas intrínsecas de la membrana de dicha organela. Las proteínas preniladas, completamente procesadas, se transportan luego a diferentes localizaciones subcelulares. FTasa, Farnesil Transferasa; GGTasa I, Geranilgeranil Transferasa 1; RCE1, Endoproteasa Convertidora de Ras 1; ICMT, Isoprenil-Cistein-Carboxi-Metiltransferasa; AdoMet, S-adenosilmetionina; AdoHcy, S-adenosilhomocisteína.

Esta modificación provee a las proteínas de un extremo C-terminal hidrofóbico, que aumenta su capacidad de interactuar con las membranas celulares y determina su localización específica dentro de la misma. Sumado a esto, también puede afectar la interacción con otras proteínas o modificar su estabilidad (4).

ICMT y sus proteínas sustrato

ICMT es una proteína integral de membrana localizada en el retículo endoplasmático y su actividad catalítica requiere la asociación al mismo (5,6); atraviesa la membrana ocho veces, con sus extremos N-terminal y C-terminal dispuestos hacia el citosol (Figura 3) (7). El sitio activo de la enzima abarca tanto regiones citosólicas como expuestas a la membrana, lo cual sugiere distintas rutas de entrada para el dador de metilo citosólico, AdoMet, y los sustratos prenilados asociados con la membrana del retículo endoplasmático (8).

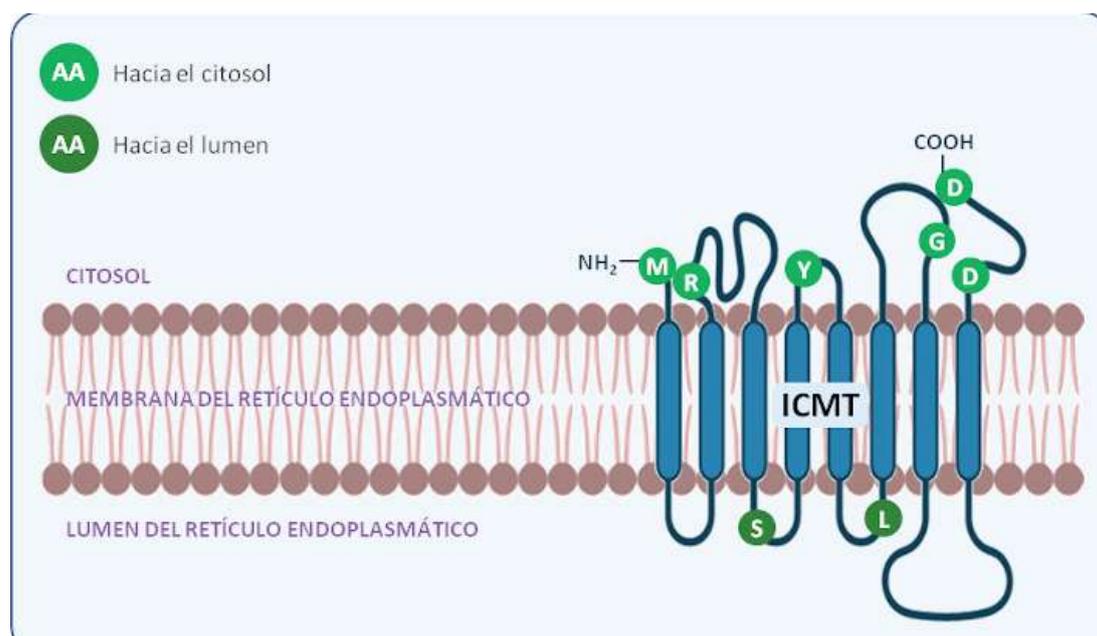


Figura 3. Esquema de la ubicación en la membrana del retículo endoplasmático de ICMT humana. Los círculos verde claro indican los aminoácidos (AA) asignados al citosol mientras que los verde oscuro aquellos asignados a la luz del retículo endoplasmático (7,8).

ICMT es esencial durante el desarrollo embrionario, ya que su deficiencia en ratones da como resultado la muerte de los embriones entre los días E10.5 y E12.5 (E: *embryonic day*) (9). A su vez, es requerida para las primeras etapas del desarrollo del hígado dado que los embriones deficientes en ICMT mueren de anemia causada por defectos en el desarrollo hepático (10).

Los sustratos de ICMT se distribuyen entre diferentes familias, lo que complica la racionalización de sus efectos patológicos. Además de miembros de las subfamilias de RAS y RHO GTPasas, se han identificado más de 200 proteínas CAAX basándose en un análisis estructural (11,12). Muchos polipéptidos que terminan en CXC, incluyendo miembros de la familia RAB doblemente geranilgeranilados, también se modifican por esta vía. Algunos de los sustratos de ICMT reportados, que se enuncian en la Tabla 1 (13), están involucrados en diferentes procesos celulares; dentro de los que podemos mencionar, la organización del citoesqueleto de actina, la adhesión, la migración, la división celular, la proliferación y la diferenciación (14,15).

Tabla 1. Proteínas preniladas identificadas como sustratos de ICMT. Los motivos CAAX o CXC y el tipo de isoprenoide están indicados. *Proteínas reportadas como farnesiladas o geranilgeraniladas. Adaptado de (13).

Nombre de la proteína	Motivo CAAX	Grupo prenilo
GRK1	CLVS	farnesilo
GNGT1/GNG1	CVIS	farnesilo
GNG2	CAIL	geranilgeranilo
LMNB1 (Lamin B1)	CAIM	farnesilo
LMNA (Lamin A)	CSIM	farnesilo
ERAS	CSVA	farnesilo
HRAS	CVLS	farnesilo

KRAS4A	CIIM	farnesilo
KRAS4B	CVIM	farnesilo
NRAS	CVVM	farnesilo
RAB3B	CSC	geranilgeranilo
RAB3D	CSC	geranilgeranilo
RAB4A	CGC	geranilgeranilo
RAB6A	CSC	geranilgeranilo
RAB7A	CSC	geranilgeranilo
RAB8A	CVLL	geranilgeranilo
RAB13	CSLG	geranilgeranilo
RAB18	CSVL	geranilgeranilo
RAB23	CSVP	geranilgeranilo
RAB27A	CGC	geranilgeranilo
RALA	CCIL	geranilgeranilo
RALB	CCLL	geranilgeranilo
RHEB1	CHLM	farnesilo
RHEB2	CSVM	farnesilo
RHOA	CLVL	geranilgeranilo
RHOB	CKVL	farnesilo / geranilgeranilo*
RHOC	CPIL	geranilgeranilo
RHOD	CVVT	farnesilo
RHOH	CKIF	farnesilo / geranilgeranilo*
CDC42	CCIF	geranilgeranilo
RAC1	CLLL	geranilgeranilo
RAC2	CSLL	geranilgeranilo
RAC3	CTVF	geranilgeranilo
PDE6A/PDE α	CCIQ	farnesilo
PDE6B/PDE β	CCIL	geranilgeranilo

Sustratos de ICMT en el cáncer

La identificación de miembros de la familia de RAS y de la familia de las RHO GTPasas como sustratos de ICMT (16) reforzó la idea de que la prenilación de proteínas puede desempeñar un rol en el cáncer (17,18). De acuerdo con esta hipótesis, la ablación genética de ICMT redujo la transformación inducida por KRAS de fibroblastos embrionarios de ratón *in vitro* (19). La supresión tejido-específica de este gen en ratones que expresan KRAS mutante en células mieloides y neumocitos, atenuó el síndrome mieloproliferativo y redujo las áreas de lesiones neoplásicas en los pulmones (20). De la misma manera, en líneas celulares de cáncer de mama que albergan RAS mutante, la ablación redujo la formación de tumores en un modelo de xenotransplante (21). Asimismo, se observó una reducción de la migración y la invasión en las células de fibrosarcoma HT-1080 tras la inhibición de ICMT (22), que se asoció con la función deficiente de RAB4A. A su vez, la sobreexpresión de ICMT favoreció el desarrollo de tumores *in vivo* y se asoció a la progresión de la patología en pacientes con cáncer de mama y pulmón (23).

Por otro lado, diversos estudios demuestran que la alteración de la función de RHOA, RAC1 y CDC42 puede favorecer procesos asociados con la metástasis (24). Por lo tanto, es posible hipotetizar que el efecto de ICMT sobre dichas RHO GTPasas podría afectar la progresión tumoral. En uno de los estudios que apoya esta hipótesis se observó que la inhibición o el silenciamiento de ICMT redujeron la migración en la línea celular MDA-MB-231, cuyo efecto se asoció a una disminución de los niveles de RHOA y RAC1 activos (25). A su vez, la capacidad de miR-100 para atenuar la formación de lamelipodios, la activación de la metaloproteasa de matriz 2 (MMP2, del inglés *Matrix metalloproteinase-2*) y la metástasis en células de carcinoma hepatocelular, se asoció con la inhibición de la señalización a través de RAC1 (26). Adicionalmente, la sobreexpresión de ICMT en células H1299 afectó significativamente el citoesqueleto de actina (23), lo que sugiere un efecto sobre las RHO GTPasas, ya que varios de sus miembros, incluyendo a RAC1, RHOA y CDC42, regulan la dinámica de polimerización y el entrecruzamiento de filamentos de actina. Por otra parte, la inactivación de la vía del supresor tumoral p53 se asoció a un aumento en la expresión de ICMT (23). En conjunto, estas evidencias ponen de manifiesto el rol de la sobreexpresión de ICMT como una alteración relevante en la progresión tumoral.

En este trabajo nos propusimos como objetivo utilizar herramientas bioinformáticas para analizar bases de datos de pacientes de distintos tipos de cáncer con el fin de identificar alteraciones en la expresión de ICMT y comprender si las mismas se correlacionan con la progresión de la patología.

Materiales y métodos

Análisis de la expresión génica en tejidos normales | *The Human Protein Atlas* (HPA)

The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) (27) es una herramienta bioinformática con datos de perfiles de expresión de genes humanos tanto a nivel de ARN mensajero (ARNm) como de proteínas. Los datos de expresión de ARNm derivan de la secuenciación completa de ARN (ARN-Seq) de 37 tipos de tejidos normales diferentes y de tres fuentes; HPA generados internamente, *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) y *Cap Analysis of Gene Expression* (CAGE) del proyecto *Functional ANnotation Of the Mammalian genome* (FANTOM5). Se grafica la expresión normalizada de ICMT en cada tejido. La normalización compensa los transcritos no codificantes, que fueron eliminados del análisis. De esta manera, se obtiene el nivel de expresión normalizado que permite combinar los 3 datasets, utilizando el nivel de expresión más alto de cada tejido entre las tres bases de datos transcriptómicas. Los datos de expresión de proteínas de 44 tipos de tejidos humanos normales derivan del perfil de proteínas resultante basado en anticuerpos utilizando inmunohistoquímica.

Análisis de la expresión génica normal vs. tumoral | *Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2* (GEPIA2)

Los datos de la expresión diferencial de ICMT, a nivel del ARNm, entre tumores y tejidos normales fueron analizados a través de la herramienta web *Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2* (GEPIA2, <http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) (28). Estos datos provienen de la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y del proyecto *Genotype-Tissue Expression* (GTEx).

Análisis de supervivencia | Gráficos de Kaplan-Meier

La correlación entre la expresión de ICMT y la supervivencia de pacientes con diferentes tipos tumorales fue analizada mediante gráficos de Kaplan-Meier obtenidos utilizando la herramienta GEPIA2 (28). Se graficó la supervivencia promedio. Se utilizó la media para estratificar entre grupos de pacientes con alta y baja expresión de ICMT y la unidad del eje de tiempo fue seteada en meses. Las curvas de supervivencia se comparan a través del test de Log-rank (Mantel-Cox) y su valor de probabilidad asociada (p). Se provee el hazard ratio (HR) y su correspondiente valor p . El HR se define como el cociente del riesgo de que se produzca un evento (deceso) en un grupo en comparación con el otro en un momento dado; se cuantifica la probabilidad de que el evento ocurra durante los intervalos del estudio. Un HR mayor o menor que 1 significa que la supervivencia fue mejor en uno de los grupos.

Análisis de alteración génica | cBioPortal

cBio Cancer Genomics Portal (cBioPortal, <https://www.cbioportal.org/>) (29,30) es una herramienta de análisis online utilizada para la exploración de datos genómicos de cáncer provenientes de muestras tumorales en diferentes estudios clínicos. Se seleccionaron los datos del TCGA's PanCancer Atlas Studies, obteniendo la frecuencia de alteraciones genéticas de ICMT en varios tipos tumorales, a partir de la solapa Cancer Types Summary. Además, se utilizó la solapa Mutations para obtener el diagrama de las mutaciones en ICMT encontradas en los diferentes tipos tumorales.

Resultados

Análisis de la expresión de ICMT

Utilizando el conjunto de datos disponible en *The Human Protein Atlas* (27), se analizó el perfil de expresión de ICMT a nivel de ARNm y de proteína en tejidos humanos normales. Este análisis demostró que hay una baja especificidad de tejido tanto para ARNm (Figura 4a) como a nivel proteico (Figura 4b). Sin embargo, es interesante remarcar que a nivel de ARNm se ve una menor expresión de ICMT en médula ósea y células del sistema inmunológico como monocitos, linfocitos T y B, células dendríticas y células natural killer. No obstante, los niveles proteicos de ICMT en médula ósea se equiparan al resto de los tejidos y para las células mononucleares de sangre periférica no hay información disponible para ser analizada. Estas observaciones podrían ser indicativas de un rol diferencial de ICMT en el sistema inmunológico. A su vez, para glándula paratiroidea, testículo, ovario, músculo cardíaco, tejido adiposo e hipocampo, a pesar de tener un nivel de ARNm comparable a otros tejidos, a nivel proteico, la expresión de ICMT no fue detectada. Estas evidencias podrían interpretarse como una posible regulación postranscripcional diferencial de ICMT en estos tejidos. A continuación, se utilizó la herramienta *Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2* (GEPIA2) (28) para investigar, en bases de datos de pacientes, el perfil de expresión génica de ICMT en varios tipos de tumores en relación con los respectivos tejidos normales. Similar a su distribución en tejido normal, ICMT también mostró una baja especificidad tumoral y su expresión aumentó en varios tejidos tumorales respecto al tejido normal correspondiente. Particularmente, la expresión génica de ICMT se encontró aumentada en 28 tumores, de los 31 en total analizados, sugiriendo que ICMT puede promover la carcinogénesis en distintos tipos de cáncer (Figura 4c).

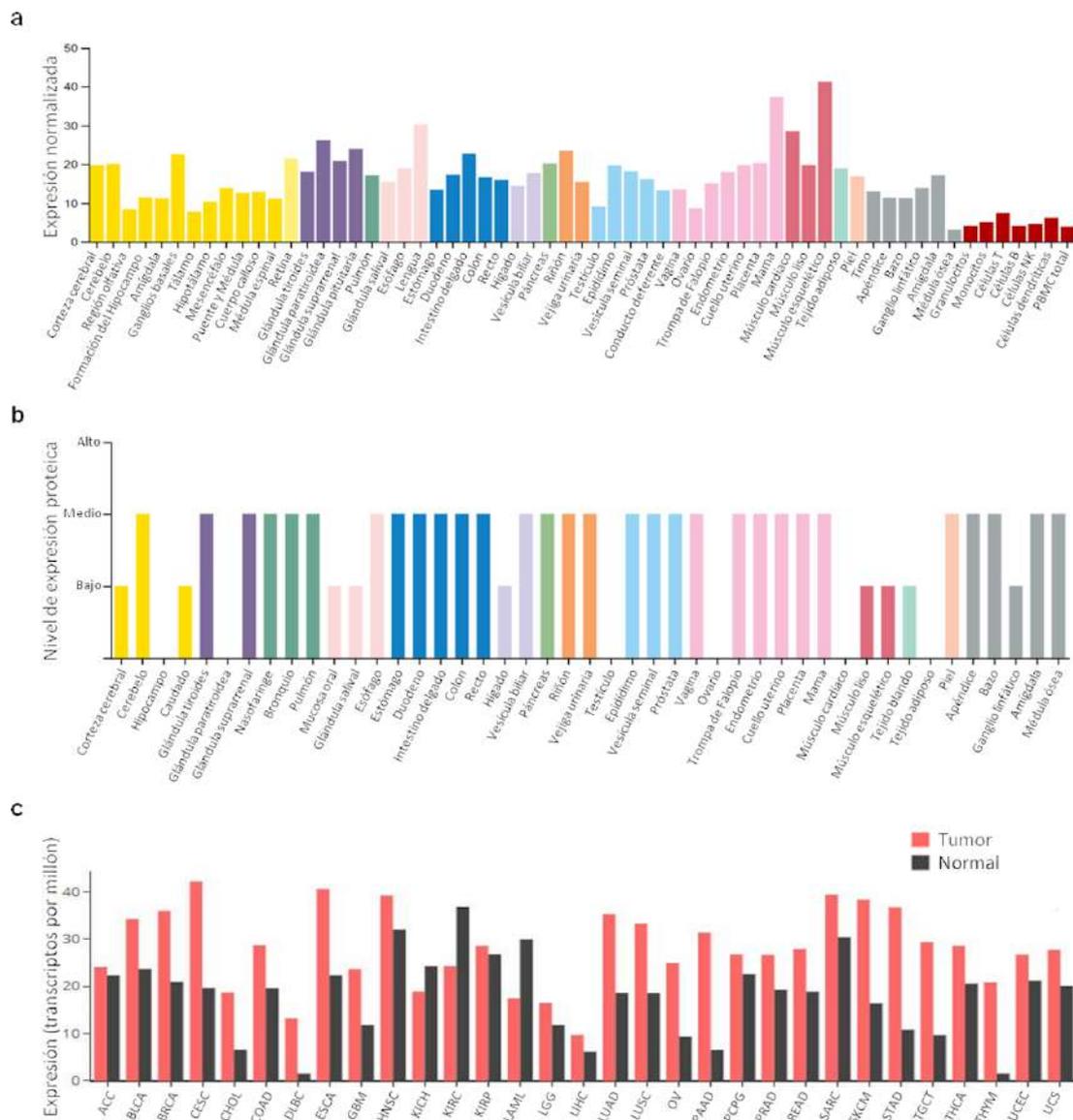


Figura 4. Expresión de ICMT en tejidos normales y tumorales. a) Niveles de ARNm de ICMT normalizados para diferentes tipos de tejido y células sanguíneas. La codificación por colores se basa en tejidos agrupados por características funcionales en común. PBMC: células mononucleares de sangre periférica. b) Niveles proteicos de ICMT para diferentes tejidos humanos. El código de colores se basa en tejidos agrupados por características funcionales en común. La ausencia de barra indica niveles no detectables de ICMT. c) Perfil de expresión génica de ICMT en 31 tipos tumorales y sus correspondientes tejidos normales. La altura de las barras representa la expresión media en el tejido tumoral o normal para cada tipo. Carcinoma adrenocortical (ACC), carcinoma urotelial de vejiga (BLCA), carcinoma invasivo de mama (BRCA), carcinoma cervical de células escamosas y adenocarcinoma endocervical (CESC), colangiocarcinoma (CHOL), adenocarcinoma de colon (COAD), linfoma difuso de células B grandes (DLBC), carcinoma de esófago (ESCA), glioblastoma multiforme (GBM), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSC), carcinoma renal de células cromóforas (KICH), carcinoma renal de células claras (KIRC), carcinoma de células renales papilares (KIRP), leucemia mieloide aguda (LAML), glioma cerebral de grado inferior (LGG), carcinoma hepatocelular (LIHC), adenocarcinoma pulmonar (LUAD), carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC), cistoadenocarcinoma seroso de ovario (OV), adenocarcinoma pancreático (PAAD), feocromocitoma y paraganglioma (PCPG), adenocarcinoma de próstata (PRAD), adenocarcinoma rectal (READ), sarcoma (SARC), melanoma cutáneo (SKCM), adenocarcinoma de estómago (STAD), tumor testicular de células germinales (TGCT), carcinoma de tiroides (THCA), timoma (THYM), carcinoma de endometrio (UCEC), carcinosarcoma uterino (UCS).

Asociación entre la expresión de ICMT y la prognosis de pacientes con cáncer

La exploración del valor pronóstico potencial de ICMT se llevó a cabo construyendo gráficos de Kaplan-Meier, mediante la herramienta de GEPIA2(28), con el fin de evaluar la correlación entre la

expresión de ICMT y la supervivencia de pacientes con diferentes tipos de cáncer (Figura 5). A partir de este análisis, se encontró que la sobreexpresión de ICMT se correlaciona significativamente con una supervivencia más corta en los pacientes con carcinoma adrenocortical (ACC), carcinoma invasivo de mama (BRCA), carcinoma renal de células cromóforas (KICH), glioma cerebral de grado inferior (LGG) y carcinoma hepatocelular (LIHC). En los casos de carcinoma urotelial de vejiga (BLCA), carcinoma cervical de células escamosas y adenocarcinoma endocervical (CESC), colangiocarcinoma (CHOL), leucemia mieloide aguda (LAML), adenocarcinoma pulmonar (LUAD), sarcoma (SARC) y adenocarcinoma de estómago (STAD), la correlación no fue significativa. Sin embargo, la prognosis de los pacientes empeoró en los casos con niveles de ICMT más altos (curva roja). Entre los tipos de cáncer en los cuales el análisis sugiere un mayor efecto, se destaca KICH. En el mismo, a partir del *hazard ratio* (HR), vemos que el riesgo de muerte para los pacientes que tienen altos niveles de ICMT fue 9,6 veces superior respecto a aquellos con bajos niveles de dicho gen. En cuanto a pacientes con ACC y LGG, su riesgo de muerte es del doble al sobreexpresar ICMT. Estos resultados indican que la expresión elevada de ICMT se asocia significativamente con un mal pronóstico de pacientes en un gran número de tipos tumorales, reflejando un potencial valor predictivo como biomarcador en el cáncer.

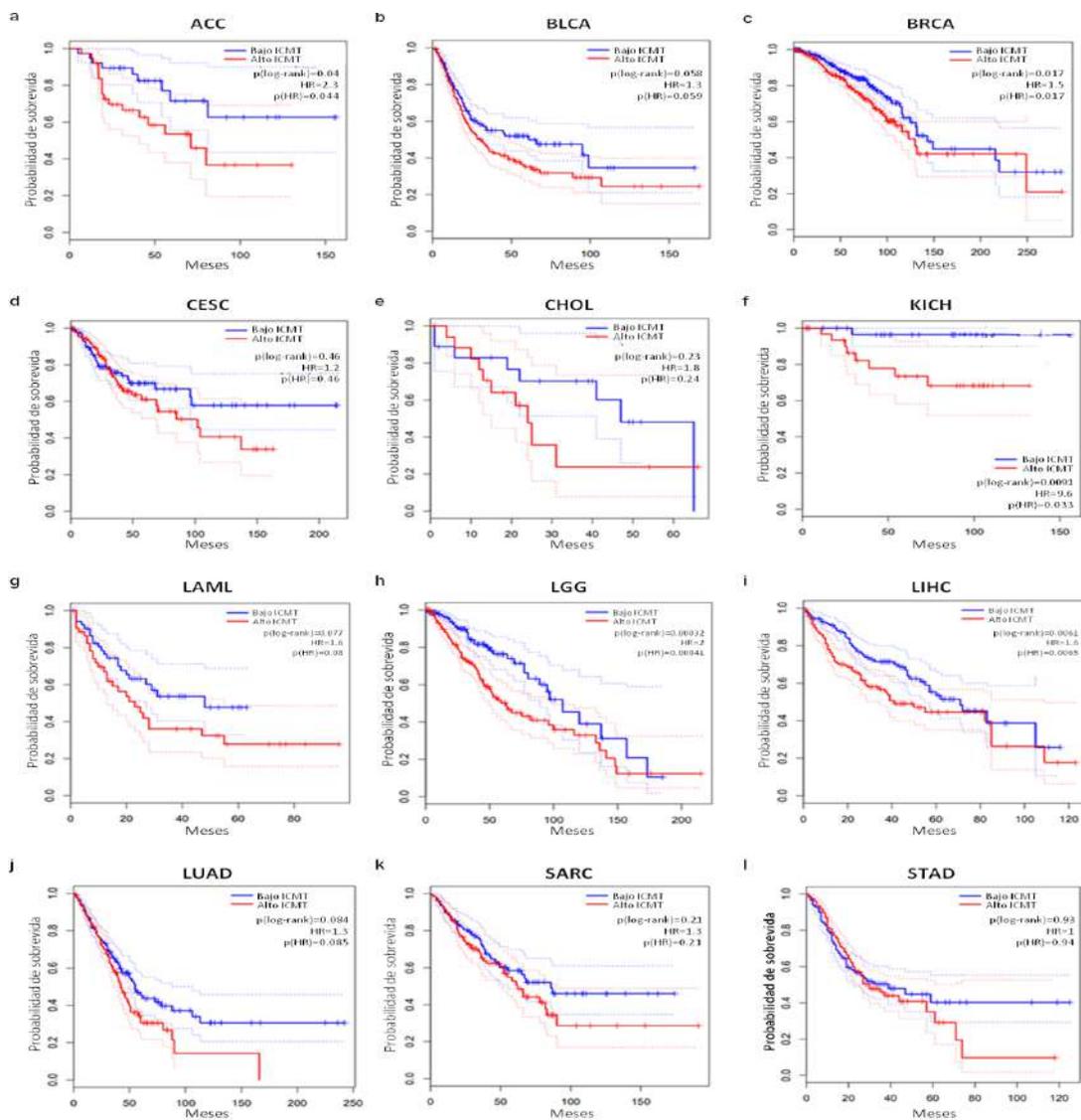


Figura 5. Análisis de la correlación entre la supervivencia de pacientes con diferentes tipos de cáncer y los niveles de expresión de ICMT. La información se presenta como gráficos de Kaplan-Meier con datos provenientes de TCGA. En rojo se muestran los casos con altos niveles de expresión estandarizada de ICMT, mientras que en azul, aquellos con niveles bajos. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se muestran en líneas sólidas, y en líneas punteadas se grafican las curvas correspondientes al intervalo de confianza del 95%. Las curvas de supervivencia se comparan a través del test de Log-rank (Mantel-Cox) y su valor de probabilidad

asociada (p). Se detalla el hazard ratio (HR) y su respectivo p, comparando entre alta y baja expresión de ICMT. a) Carcinoma adrenocortical (ACC), b) carcinoma urotelial de vejiga (BLCA), c) carcinoma invasivo de mama (BRCA), d) carcinoma cervical de células escamosas y adenocarcinoma endocervical (CESC), e) colangiocarcinoma (CHOL), f) carcinoma renal de células cromóforas (KICH), g) leucemia mieloide aguda (LAML), h) glioma cerebral de grado inferior (LGG), i) carcinoma hepatocelular (LIHC), j) adenocarcinoma pulmonar (LUAD), k) sarcoma (SARC), l) adenocarcinoma de estómago (STAD).

Alteraciones genéticas de ICMT en diferentes tumores

Posteriormente, la herramienta cBioPortal for Cancer Genomics (29,30) permitió investigar el estado de alteración genética de ICMT en varios tipos de tumores en conjuntos de datos del TCGA's PanCancer Atlas. Para ello, se trabajó con datos combinados de 10.967 muestras provenientes de 10.953 pacientes de 32 estudios clínicos. Se encontró que el porcentaje de muestras con alteración genética en ICMT fue solo del 2% en promedio y que la frecuencia de alteración más alta (> 4%) ocurrió en las muestras de carcinoma adrenocortical, seguido por adenocarcinoma cervical y neoplasias de células B maduras (Figura 6a). Dentro de las alteraciones se hallaron mutaciones puntuales, alteraciones en el número de copias (amplificaciones y deleciones) y variantes estructurales/fusiones. Las mismas fueron distribuidas entre los distintos tipos de tumores (Tabla 2). Las fusiones reportadas se dan con la proteína nefrocistina-4 (NPHP4) en melanoma, con acil-coenzima A tioesterasa 7 (ACOT7) en carcinoma invasivo de mama y carcinoma embrionario y con el receptor asociado a proteína G 153 (GPR153) en carcinoma ductal invasivo de mama (Tabla 2). Como se muestra en la Figura 6b, del total de mutaciones puntuales en ICMT, se detectaron 75% de mutaciones de tipo missense, 15,6% truncating, 6,3% inframe y 3,1% de tipo splicing. Dichas mutaciones han sido clasificadas como variantes de importancia incierta (*variant of uncertain significance*, VUS), ya que fueron identificadas mediante pruebas genéticas pero su importancia en el cáncer se desconoce. A su vez, no se observan regiones con alta frecuencia de mutación (*hotspots*) a lo largo de la secuencia de ICMT ni mutaciones recurrentes en los distintos tumores. En la imagen se resalta la región correspondiente al motivo conservado dentro de la familia de ICMT (PEMT, *Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase*) incluyendo a más de 13.000 proteínas de diferentes organismos (31). Dicha secuencia consiste en dos regiones homólogas entre sí que flanquean un intervalo hidrofóbico de 30 aminoácidos (AA). Su interés, y la razón por la que sea conservada en la evolución, recae en que existe evidencia de su participación en la unión a AdoMet, y consecuentemente, en su actividad metiltransferasa. Las regiones comprendidas entre los AA 197-200 y 210-213 y los AA 190, 205 y 251 son sitios de unión a AdoMet, mientras que el AA 247 sería crítico en la unión al sustrato (32). En la Tabla 2 se señalan las mutaciones en estos AA esenciales para la actividad enzimática de ICMT encontradas en los distintos tipos de cáncer. La baja representatividad de alteraciones genéticas sobre ICMT en los pacientes, sugiere que el rol protumoral de ICMT podría estar asociado a cambios en su nivel de expresión y no a dichas alteraciones.

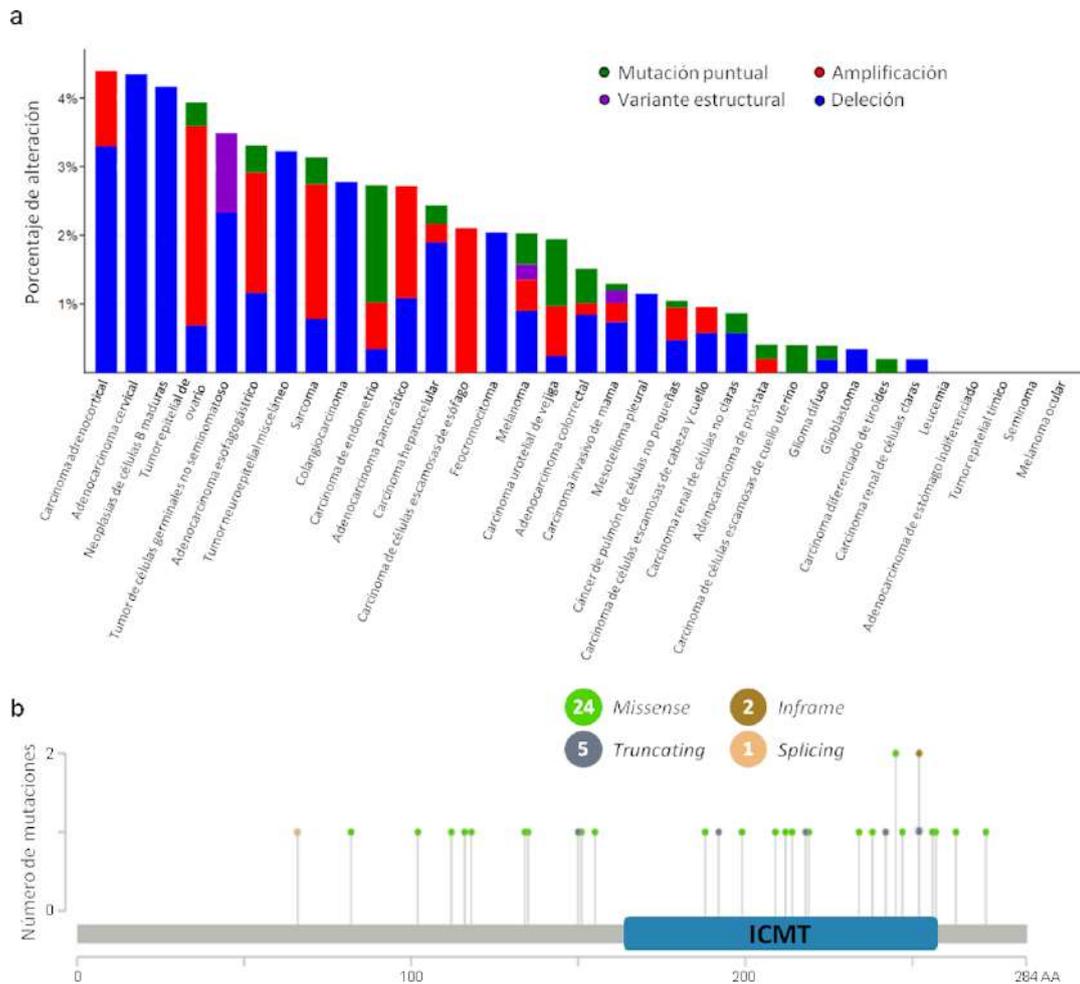


Figura 6. Alteraciones genéticas de ICMT encontradas en distintos tipos de tumores. a) Frecuencia de alteraciones genéticas en ICMT según el tipo de cáncer, clasificadas como mutaciones puntuales, variantes estructurales, amplificaciones y deleciones. b) Sitios aminoacídicos y tipos de mutaciones puntuales de la proteína ICMT encontrados en los tumores. Los círculos del diagrama representan mutaciones y están coloreados respecto al tipo. La región en la secuencia de ICMT resaltada en color azul, que incluye a los aminoácidos (AA) 164-257, representa una secuencia homóloga altamente conservada entre las proteínas integrantes de la superfamilia PEMT (Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase) (31).

Tabla 2. Alteraciones genéticas de ICMT encontradas en diferentes tipos de tumores mediante el uso de cBioPortal a partir de datos obtenidos de TCGA's PanCancer Atlas. Nefrocistina-4 (NPHP4), acil-coenzima A tioesterasa 7 (ACOT7), receptor asociado a proteína G 153 (GPR153). El * simboliza una mutación de tipo nonsense, con ese aminoácido terminal. †, mutaciones en región conservada perteneciente a la familia PEMT. ‡, mutaciones en sitios de unión a S-adenosil-L-metionina (SAM). §, mutación en sitio de unión al sustrato (31,32). ||, misma mutación en dos muestras tumorales distintas.

Tipo de cáncer	Cambio en la proteína	Tipo de alteración
Cáncer papilar de tiroides	Y218 *†	Mutación Nonsense
Astrocitoma	V234I †	Mutación Missense
Cáncer de ovario seroso	S118I	Mutación Missense

Cáncer de ovario seroso	P151S	Mutación Missense
Leiomiomasarcoma	Q155K	Mutación Missense
Carcinoma de células escamosas de pulmón	W150Ffs *43	Mutación Frameshift
Carcinoma urotelial de vejiga	P116S	Mutación Missense
Carcinoma urotelial de vejiga	S212F †‡	Mutación Missense
Carcinoma urotelial de vejiga	R242 *†	Mutación Nonsense
Carcinoma urotelial de vejiga	V134A	Mutación Missense
Carcinoma hepatocelular	E192 *†	Mutación Nonsense
Adenocarcinoma de próstata	R247Q †§	Mutación Missense
Carcinoma de endometrio	R245C †	Mutación Missense
Carcinoma de endometrio	A112T	Mutación Missense
Carcinoma de endometrio	E252del †	Mutación Inframe
Carcinoma de endometrio	E252del †	Mutación Inframe
Carcinoma de endometrio	I256N †	Mutación Missense
Carcinoma de endometrio	L238P †	Mutación Missense
Carcinoma de endometrio	X66_splice	Mutación Splicing
Carcinoma de endometrio	A135S	Mutación Missense
Carcinoma de endometrio	E252 *†	Mutación Nonsense
Carcinoma de endometrio	V214I †	Mutación Missense
Adenocarcinoma de esófago	W219G †	Mutación Missense
Melanoma	H257R †	Mutación Missense
Melanoma	L102V	Mutación Missense
Adenocarcinoma tubular de estómago	L82P	Mutación Missense
Carcinoma ductal invasivo de mama	L199V †‡	Mutación Missense
Adenocarcinoma de colon	R245C †	Mutación Missense
Adenocarcinoma de recto	R209W †	Mutación Missense
Adenocarcinoma de colon	T272M	Mutación Missense

Carcinoma papilar de células renales	Y263F	Mutación Missense
Carcinoma de células escamosas de cuello uterino	V188M †	Mutación Missense
Melanoma	ICMT-NPHP4	Fusión
Carcinoma invasivo de mama	ICMT-ACOT7	Fusión
Carcinoma ductal invasivo de mama	ICMT-GPRI53	Fusión
Carcinoma embrionario	ICMT-ACOT7	Fusión

Discusión

La prenilación de proteínas está emergiendo como una modificación postraduccional crítica que afecta diferentes aspectos de la fisiología celular. Recientemente, evidencias interesantes propusieron que la alteración del procesamiento por prenilación o post-prenilación puede cooperar con el cáncer (4); sin embargo, los mecanismos subyacentes no se comprenden completamente. La inhibición de FTasa se propuso como una estrategia terapéutica en esta patología tras los resultados alentadores de modelos experimentales; sin embargo, las moléculas probadas en ensayos clínicos mostraron una respuesta limitada (33). Una posible explicación del desempeño decepcionante de los inhibidores de FTasa es la prenilación alternativa por GGTasa I. La manipulación farmacológica de RCE1 o ICMT, enzimas que catalizan las etapas de procesamiento posteriores al agregado del isoprenilo, ofrece la ventaja de que ambas pueden actuar sobre sustratos farnesilados o geranilgeranilados y, por lo tanto, proporcionan un espectro más amplio de acción terapéutica en comparación con los inhibidores de farnesil y geranilgeranil transferasas. Los estudios sobre RCE1 mostraron resultados relativamente modestos y posibles efectos adversos que incluyen cardiomiopatías y retinopatías (4). Por el contrario, se han observado resultados alentadores para la inactivación o inhibición de ICMT en algunos modelos experimentales (4, 33). Por tanto, es necesario un conocimiento profundo de la alteración de ICMT en el cáncer para explotar su potencial como diana terapéutica. En este trabajo, mediante la utilización de bases de datos, se evaluó la relevancia de ICMT en el cáncer a través del análisis de características tales como la expresión y la alteración génica. Se encontró que ICMT se expresa comúnmente en un gran número de tejidos en condiciones fisiológicas y que en la mayoría de los tumores su expresión se encuentra aumentada. Además, la sobreexpresión de ICMT se correlaciona con un mal pronóstico, debido a una supervivencia más corta, en muchos tipos de cáncer. A su vez, a causa del bajo porcentaje de alteraciones genéticas encontradas en los pacientes, se podría asociar el rol protumoral de ICMT a cambios en su nivel de expresión y no a la aparición de alteraciones genéticas. Los resultados presentados, en conjunto con datos previos de la función biológica de ICMT y de sus diversos sustratos, indican que esta enzima podría colaborar con la progresión tumoral, justificando próximos estudios experimentales sobre su potencialidad como biomarcador y blanco terapéutico.

Fuentes de Financiamiento: ANPCyT (PICT-2019-00612)

Referencias Bibliográficas

1. Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, www.iarc.fr, ISBN 978-92-832-0429-9).
2. Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 2008 Dec 25;359(26):2814-23. doi: 10.1056/NEJMra0805239.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
4. Wang M, Casey PJ. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Feb;17(2):110-22. doi: 10.1038/nrm.2015.11. Epub 2016 Jan 21.
5. Dai Q, Choy E, Chiu V, et al. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1998 Jun 12;273(24):15030-4. doi: 10.1074/jbc.273.24.15030.

6. Pillinger MH, Volker C, Stock JB, Weissmann G, Philips MR. Characterization of a plasma membrane-associated prenylcysteine-directed alpha carboxyl methyltransferase in human neutrophils. *J Biol Chem*. 1994 Jan 14;269(2):1486-92.
7. Wright LP, Court H, Mor A, Ahearn IM, Casey PJ, Philips MR. Topology of mammalian isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase determined in live cells with a fluorescent probe. *Mol Cell Biol*. 2009 Apr;29(7):1826-33. doi: 10.1128/MCB.01719-08. Epub 2009 Jan 21.
8. Diver MM, Pedi L, Koide A, Koide S, Long SB. Atomic structure of the eukaryotic intramembrane RAS methyltransferase ICMT. *Nature*. 2018 Jan 25;553(7689):526-529. doi: 10.1038/nature25439. Epub 2018 Jan 17.
9. Bergo MO, Leung GK, Ambroziak P, et al. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase deficiency in mice. *J Biol Chem*. 2001 Feb 23;276(8):5841-5. doi: 10.1074/jbc.C000831200. Epub 2000 Dec 19.
10. Lin X, Jung J, Kang D, Xu B, Zaret KS, Zoghbi H. Prenylcysteine carboxylmethyltransferase is essential for the earliest stages of liver development in mice. *Gastroenterology*. 2002 Jul;123(1):345-51. doi: 10.1053/gast.2002.34279.
11. Maurer-Stroh S, Koranda M, Benetka W, Schneider G, Sirota FL, Eisenhaber F. Towards complete sets of farnesylated and geranylgeranylated proteins. *PLoS Comput Biol*. 2007 Apr 6;3(4):e66. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030066. Epub 2007 Feb 23.
12. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):274-84. doi: 10.1038/nrc2622.
13. Borini Etichetti CM, Arel Zalazar E, Cocordano N, Girardini J. Beyond the Mevalonate Pathway: Control of Post-Prenylation Processing by Mutant p53. *Front Oncol*. 2020 Nov 5;10:595034. doi: 10.3389/fonc.2020.595034.
14. Rajakylä EK, Vartiainen MK. Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases*. 2014;5:e27539. doi: 10.4161/sgtp.27539. Epub 2014 Mar 6.
15. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992 Aug 7;70(3):389-99. doi: 10.1016/0092-8674(92)90163-7.
16. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 May;5(5):355-66. doi: 10.1038/nrml365.
17. Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*. 1989 Jun 30;57(7):1167-77. doi: 10.1016/0092-8674(89)90054-8.
18. Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE. p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(21):8323-7. doi: 10.1073/pnas.86.21.8323.
19. Bergo MO, Gavino BJ, Hong C, et al. Inactivation of *Icmt* inhibits transformation by oncogenic K-Ras and B-Raf. *J Clin Invest*. 2004 Feb;113(4):539-50. doi: 10.1172/JCI18829.
20. Wahlstrom AM, Cutts BA, Liu M, et al. Inactivating *Icmt* ameliorates K-RAS-induced myeloproliferative disease. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1357-65. doi: 10.1182/blood-2007-06-094060. Epub 2008 May 23.
21. Lau HY, Tang J, Casey PJ, Wang M. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase is critical for malignant transformation and tumor maintenance by all RAS isoforms. *Oncogene*. 2017 Jul 6;36(27):3934-3942. doi: 10.1038/onc.2016.508. Epub 2017 Feb 13.
22. Do MT, Chai TF, Casey PJ, Wang M. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase function is essential for RAB4A-mediated integrin β 3 recycling, cell migration and cancer metastasis. *Oncogene*. 2017 Oct 12;36(41):5757-5767. doi: 10.1038/onc.2017.183. Epub 2017 Jun 12.
23. Borini Etichetti C, Di Benedetto C, Rossi C, et al. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) is associated with tumor aggressiveness and its expression is controlled by the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem*. 2019 Mar 29;294(13):5060-5073. doi: 10.1074/jbc.RA118.006037. Epub 2019 Jan 17.
24. Haga RB, Ridley AJ. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases*. 2016 Oct;7(4):207-221. doi: 10.1080/21541248.2016.1232583. Epub 2016 Sep 14.
25. Cushman I, Casey PJ. RHO methylation matters: a role for isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase in cell migration and adhesion. *Cell Adh Migr*. 2011 Jan-Feb;5(1):11-5. doi: 10.4161/cam.5.1.13196. Epub 2011 Jan 1.
26. Zhou HC, Fang JH, Luo X, et al. Downregulation of microRNA-100 enhances the ICMT-Rac1 signaling and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*. 2014 Dec 15;5(23):12177-88. doi: 10.18632/oncotarget.2601.
27. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015 Jan 23;347(6220):1260419. doi: 10.1126/science.1260419.
28. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. (2019). GEPIA2: An Enhanced Web Server for Large-Scale Expression Profiling and Interactive Analysis. *Nucleic Acids Res*. 47 (W1), W556–W560. doi:10.1093/nar/gkz430.
29. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, 2(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>.
30. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*, 6(269), p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>.
31. Romano JD, Michaelis S. Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Ste14p, founding member of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase family. *Mol Biol Cell*. 2001;12(7):1957-1971. doi:10.1091/mbc.12.7.1957.
32. The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, 8 January 2021, Pages D480–D489, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
33. Winter-Vann AM, Casey PJ. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005 May;5(5):405-12. doi: 10.1038/nrc1612.