

Estudio de la regulación de la histona metilasa EZH2 por la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 en cáncer de próstata.

Cristina García Fernández^a, Santiago Ropero Salinas, Begoña Colás Escudero^b

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. andrecris19971997@gmail.com b. begona.colas@uah.es

Palabras clave: Cáncer de próstata; SHP-1; EZH2; receptor de andrógenos; AKT; CRPC; LNCaP; VCaP; LNCaP Abl

Resumen

El cáncer de próstata (CP) es uno de los tumores malignos más frecuentes en varones de países desarrollados. La privación androgénica es uno de los tratamientos más efectivos para el cáncer de próstata metastásico; sin embargo, con el tiempo, el tumor progresa a una fase independiente de éstos para la que no existe tratamiento. El estudio de los mecanismos moleculares implicados en esta fase de la enfermedad permitirá el desarrollo de nuevas terapias encaminadas a solventar este problema. En este trabajo estudiamos el papel de SHP-1, una tirosina fosfatasa que actúa como regulador negativo de vías de señalización relacionadas con la progresión tumoral, como posible regulador indirecto de EZH2 y su interacción con el receptor de andrógenos (AR) a través de la vía PI3K/AKT para la activación transcripcional de genes diana de este. En primer lugar, se determinará si existe un complejo proteico formado por SHP-1, AKT, EZH2 Y AR mediante ensayos de captura y unión o "pull down" y co-inmunoprecipitación. Posteriormente, el estudio de esta fosfatasa se realizará mediante su silenciamiento por RNA de interferencia con el objetivo de analizar posibles cambios en la actividad de AKT, EZH2 y AR. Además, se realizarán ensayos de proliferación celular con un inhibidor de EZH2 (GSK126) con el fin de determinar si SHP-1 modula su efecto. La existencia de cambios en la actividad de las proteínas o de la efectividad del inhibidor constituyen un paso previo para investigar las consecuencias funcionales de SHP-1 en la progresión del cáncer de próstata.

Cita: García Fernández, Cristina; Ropero Salinas, Santiago; Colás Escudero, Begoña (2020) Estudio de la regulación de la histona metilasa EZH2 por la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 en cáncer de próstata. *dianas* 9 (2): e202009fa07. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202009fa07 <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa07>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © García-Fernández C, Ropero-Salinas S, Colás-Escudero B. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Antecedentes

Cáncer de próstata: aspectos clínicos y moleculares.

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia maligna más frecuente entre los varones a nivel mundial [1]. Si se diagnostica en fases tempranas, que es cuando se considera una enfermedad potencialmente curable, el tratamiento es local y quirúrgico. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones el tumor progresa a fases más agresivas debido a su diseminación con consiguiente metástasis, para las cuales la única solución que prolonga la supervivencia es la privación androgénica [2]. Aún con esto, con el paso del tiempo las células malignas continúan su crecimiento e invasión independientemente de andrógenos y es lo que se conoce como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), última fase en la que el tratamiento que existe es únicamente paliativo; de todos los pacientes diagnosticados con cáncer de próstata, el 10-20% desarrollarán CRPC [3]. En la actualidad, siguen siendo objeto de estudio los mecanismos moleculares responsables de la resistencia al bloqueo hormonal y de la progresión del cáncer, aunque en la mayoría de ellos está implicado el receptor de andrógenos (AR) [4].

El AR actúa como un factor de transcripción regulando la expresión de genes que contienen en sus regiones promotoras secuencias ARE (elementos de respuesta a andrógenos) y que controlan funciones básicas de las células: ciclo celular, proliferación, supervivencia, etc. [5] La unión de la dihidrotestosterona al AR provoca su dimerización, fosforilación y translocación al núcleo, donde ejerce su función a su vez reclutando complejos proteicos entre los que se incluyen proteínas que regulan las modificaciones epigenéticas [6]. Aunque en el CRPC la expresión del receptor y su actividad se mantienen, no siempre se activa por vías dependientes de ligando. Hasta el momento, se han descrito varios mecanismos moleculares implicados:

- Amplificación del AR que aumenta su sensibilidad a su ligando natural [1].
- Expresión de variantes del receptor por splicing alternativo como AR-V7 [7].
- Aumento de expresión de genes que convierten andrógenos adrenales en testosterona [1].

- Activación de vías de señalización alternativas, reguladas por receptores tirosina quinasa, citoquinas y quinasas no receptores que actuando sobre el AR o de forma independiente estimulan la proliferación celular [8].
- Diferenciación neuroendocrina. Adquisición por parte de las células tumorales de características neuroendocrinas [9].
- Modificación de la expresión y/o actividad de los co-reguladores reclutados por AR.

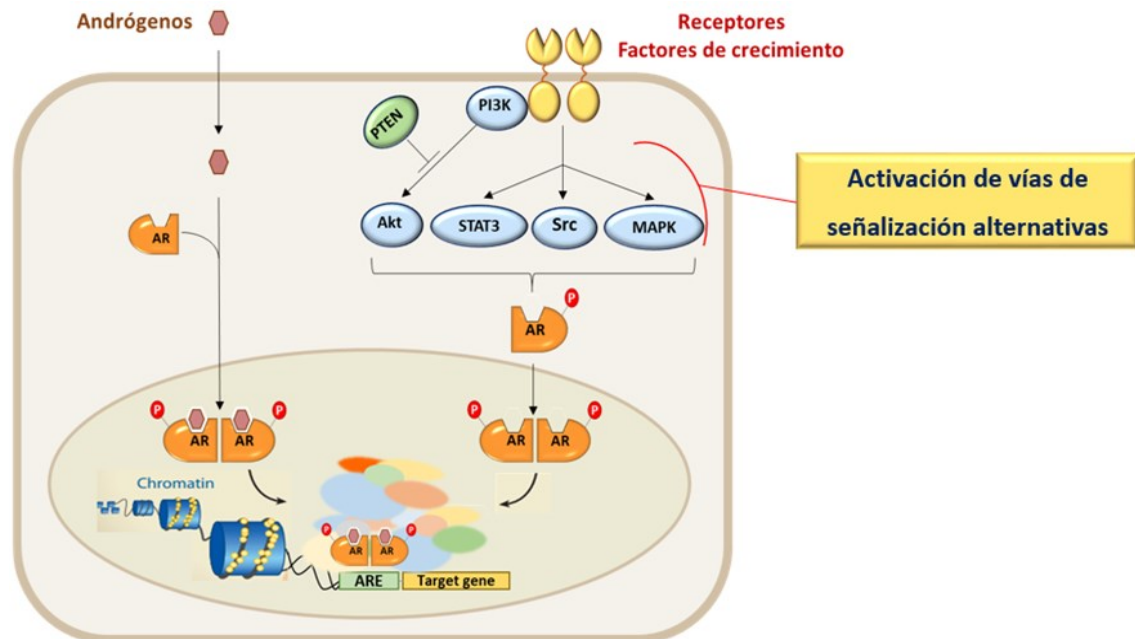


Figura 1.- Mecanismos moleculares de resistencia a la castración. Los andrógenos se unen y activan su receptor (AR). AR activo se une a elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en el DNA para activar la transcripción de genes diana. Para llevar a cabo esta función recluta co-reguladores entre los que se encuentran modificadores de histonas y remodeladores de la cromatina. En CRPC, el AR puede ser activado de forma independiente de ligando por vías de señalización alternativas.

Papel de las proteínas epigenéticas en CRPC.

La aberrante función de los genes y los cambios en el perfil de expresión de estos contribuyen de manera negativa sobre las enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Esta desregulación está controlada en parte por la epigenética, que estudia las modificaciones químicas del ADN y las histonas de carácter reversible y heredable que, sin afectar a la secuencia primaria del ADN, regulan la expresión génica y la estabilidad genómica [10].

En el apartado anterior comentábamos que, cuando el AR se activa, regula la transcripción génica mediante el reclutamiento de complejos proteicos, entre los que se incluyen las proteínas que regulan las modificaciones epigenéticas. De entre estas modificaciones, las más estudiadas son la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas. Dentro de las modificaciones postraduccionales de las histonas podemos destacar la metilación, acetilación y fosforilación. Las enzimas encargadas de la acetilación de las histonas son las histonas acetilasas (HATs), cuyo papel se traduce en una cromatina más laxa y por tanto más accesible a la ARN polimerasa II, aumentando la transcripción génica. Por el contrario, las enzimas desacetilasas (HDACs) condensan el estado de la cromatina, silenciando la expresión génica [11].

La metilación de las histonas es regulada por las enzimas metiltransferasas (HMTs) y las demetilasas (HDMTs), y esta modificación tiene efectos distintos dependiendo del residuo de lisina que se modifique; por ejemplo, la metilación de la lisina 4, 36 y 79 de la histona 3 se relaciona con la activación de la expresión génica mientras que la metilación de la lisina 9 y 27 de esta misma histona está relacionada con el silenciamiento génico [12]. Todas estas modificaciones trabajan juntas para mantener el estado de la cromatina y con ello la homeostasis celular, y las alteraciones en este patrón epigenético están implicadas en patologías como el cáncer, siendo uno de los ejemplos más característicos en un gran número de tumores la pérdida de acetilación de la lys16 y de la metilación de la lys20 de la histona H4 [13].

Por consiguiente, el equilibrio entre las modificaciones de histonas represoras y activas (también conocido como el código de histonas) determina en última instancia si un gen se transcribirá o reprimirá, y los genes diana del AR no son una excepción, siendo plausible pensar que este receptor recluta las proteínas epigenéticas dependiendo de la vía por la que se estimule modificando el perfil de expresión y contribuyendo a la progresión tumoral y resistencia a la castración. Por lo tanto, el estudio de estas proteínas y su comportamiento en las distintas fases del cáncer de próstata puede proporcionar nuevas

dianas que permita el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para superar todos los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente.

La histona metiltransferasa EZH2 en el CP.

EZH2 es una histona metiltransferasa que desempeña un papel fundamental en los sistemas hematopoyético y nervioso central, y que forma parte de la familia del complejo proteico multimérico PRC2 (Polycomb repressive complex 2). Su papel canónico, junto a las proteínas SUZ12 y EED y a través de su dominio SET, es el mantenimiento del estado represivo transcripcional de los genes durante generaciones celulares sucesivas mediante la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) [14-15]. En este sentido, existen actualmente inhibidores de la enzima como GSK126 que inhibe EZH2 disminuyendo los niveles de H3K27me3 y aumentando la expresión de genes supresores tumorales y disminuyendo la invasión de células tumorales en algunos tipos de tumores. Normalmente, EZH2 se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de próstata [16]. En las fases tempranas de esta patología, EZH2 actúa silenciando genes supresores de tumores, comportándose, así como un oncogén. A medida que la enfermedad avanza y se hace independiente de andrógenos, la expresión de EZH2 aumenta, correlacionándose con una menor supervivencia [17].

En CRPC, estudios recientes (Xu et al. (2012)) han demostrado que EZH2, se une a promotores de genes que, sin embargo, no presentan marcas de metilación en sus histonas, y que al inhibir la metilasa estos genes se silencian. Estos datos sugieren que, en la fase más avanzada del cáncer de próstata, hay un cambio en la actividad de EZH2 de represor a activador transcripcional [18].

En este marco, EZH2 interacciona con AR y lo metila en sus lisinas 630 y 632, potenciando su actividad transcripcional y actuando como coactivador de este en la expresión de oncogenes [18]. Para que se produzca la interacción entre ambas proteínas es necesaria la fosforilación de EZH2 en su serina 21, lo que reduce su capacidad de metilar H3K27 interrumpiendo el silenciamiento génico [19]. Esta fosforilación está catalizada por la quinasa AKT activada por PI3K. La vía PI3K/AKT se encuentra constitutivamente activa en cáncer de próstata debido a diversos factores [20], y se encarga de regular genes implicados en procesos tan importantes como son el crecimiento, la supervivencia, el ciclo celular, etc [21], contribuyendo a la progresión de la enfermedad. Asimismo, se ha demostrado recientemente que EZH2 activa la transcripción del AR al unirse a su promotor distal reclutando factores de transcripción y que, además, tratamientos dirigidos a inhibir esta metilasa aumentan la eficacia de los antagonistas del AR para suprimir la progresión del cáncer [22].

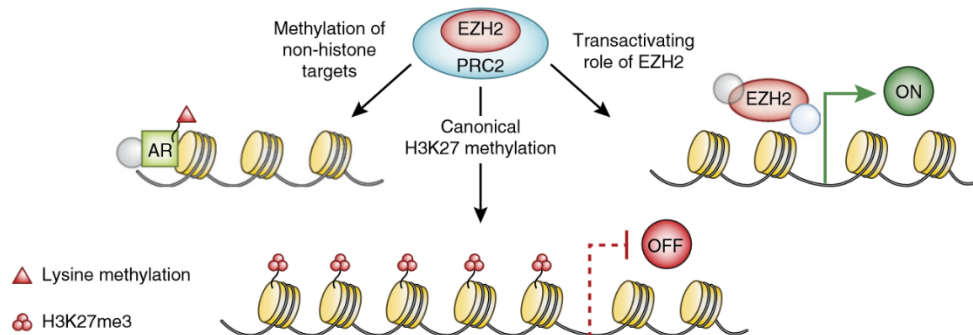


Figura 2.- Actividad transcripcional de EZH2: EZH2 como parte de PRC2 metila la lisina 27 de la histona 3 (H3K27), lo que contribuye al silenciamiento transcripcional. EZH2 también tiene un papel independiente de PRC2 metilando proteínas no histonas como AR y activando la transcripción. OFF y ON se refieren al silenciamiento y la activación transcripcionales, respectivamente (Tomado de Kim et al).

Por lo tanto, EZH2, en esta patología, puede actuar como supresor o activador de la expresión génica, dependiendo de las proteínas epigenéticas que reclute para llevar a cabo su acción y dependiendo también del contexto celular.

SHP-1.

El papel de las fosforilaciones en las vías de señalización encargadas de mantener la homeostasis celular es imprescindible, sobre todo las fosforilaciones en residuos de tirosina. Las proteínas responsables de regular el nivel de fosforilación en tirosina son las proteínas tirosinas quinasas y las proteínas tirosinas fosfatasas (PTPs). Los sustratos a los que pueden defosforilar las PTPs van a depender de dos factores principalmente: de la especificidad intrínseca de la PTP por dicho sustrato, dentro de la que se encuentra una gran variedad de moléculas como receptores y factores de transcripción entre otros y de la localización celular ya sea nuclear o citoplasmática [23]. Las PTPs clásicas no similares a receptores además del centro catalítico, poseen diversos dominios adicionales, como los dominios Src homology 2 (SH2). Estos dominios son frecuentes en PTK, pero solamente dos PTPs humanas los poseen, estas son

SHP-1 y SHP-2 [24]. En este sentido entra en juego SHP-1, una proteína tirosina fosfatasa (PTP) citosólica con dos dominios SH2, los cuales permiten la interacción de esta fosfatasa con proteínas que presenten residuos de tirosina fosforilados [25].

Esta fosfatasa se expresa preferentemente en células hematopoyéticas y su importancia se definió después de analizar el fenotipo de ratones que presentaban una deficiencia parcial (*mev*) o total de esta enzima (*me*). Estos ratones presentaban anomalías hematopoyéticas que acortan considerablemente su vida, lo que permitió demostrar la importancia de SHP-1 en el sistema hematopoyético. Estos estudios, además, demostraron también la importancia de SHP-1 como regulador negativo de vías de transducción de señales activadas por factores de crecimiento y citoquinas [26]. Esta PTP también se expresa en células epiteliales, aunque la función que desempeña a este nivel no se conoce con detalle. Además, se ha observado que sus niveles disminuyen en distintos tipos de cáncer, entre los que se encuentra el CRPC. En estos tipos celulares, el papel de la PTP es contradictorio, pero no por ello menos importante.

Anteriormente, hemos mencionado que uno de los mecanismos implicados en la progresión a CRPC es la activación del AR de forma independiente de ligando por vías de señalización alternativas, reguladas por receptores tirosina quinasa, citoquinas y quinasas celulares. De hecho, el aumento en los niveles de proteínas fosforiladas en tirosina se ha relacionado con la progresión a CRPC [27]. La activación de estas vías de señalización va a provocar la fosforilación del AR y va a regular su estabilidad, su localización nuclear, su sensibilidad a las hormonas, su unión al DNA y sus interacciones con otras proteínas, lo que al final determinará la especificidad y el grado de regulación de los genes diana. Por lo tanto, la fosforilación del AR puede contribuir a su activación en ausencia de andrógenos o a su sensibilización a bajos niveles de estos y jugar un papel importante en el desarrollo de la independencia androgénica del cáncer de próstata [28]. Aunque estas fosforilaciones son un campo poco explorado en el cáncer de próstata, es evidente que los cambios en la fosforilación del AR pueden deberse también a alteraciones en la actividad de estas fosfatasas.

El grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo demostró por primera vez la expresión de SHP-1 en la próstata humana. Un primer análisis de su expresión en muestras de tumores indicó que la enzima está presente en alteraciones no malignas (Hiperplasia Prostática Benigna), en lesiones precursoras del adenocarcinoma prostático (Neoplasia Intraepitelial Prostática), y en carcinoma de próstata bien diferenciado. Ahora bien, SHP-1 desaparece en las variantes poco diferenciadas del tumor [29]. Estos resultados permiten plantear la hipótesis de que la pérdida de expresión de SHP-1 parece relacionarse estrechamente con el desarrollo y la progresión de fenotipos agresivos de cáncer de próstata.

Además, se ha demostrado que, en cáncer de próstata, esta fosfatasa regula la actividad y/o la localización de los componentes de la maquinaria que controla el ciclo celular regulando la proliferación celular. Estos efectos se deben a que SHP-1 interacciona con PI3K y regula su actividad, así como la de AKT. Por último, el análisis morfológico e histológico del tracto genitourinario de los ratones *motheaten viable (me^v)*, que expresan una forma deficiente de la enzima, muestra la ausencia de vesículas seminales y una diferenciación aberrante del complejo prostático [30]. Todos estos resultados nos llevan a pensar que SHP-1 puede ser un elemento clave en el desarrollo normal de la próstata, así como en el origen y progresión del cáncer de próstata.

Hipótesis

Uno de los tratamientos del cáncer de próstata es la eliminación de andrógenos. No obstante, la respuesta a esta terapia es limitada y de forma casi invariable los pacientes dejan de responder al bloqueo androgénico continuado progresando a una fase de la enfermedad resistente a la castración (CRPC) que supone un grave problema de salud dada la ausencia de tratamientos eficaces. La histona metiltransferasa EZH2 se sobreexpresa en esta fase de la enfermedad, pero su función oncogénica no depende de su actividad canónica como represor transcripcional sino más bien de la activación de la transcripción. La fosforilación de EZH2 por PI3K/AKT provoca su interacción con AR y su cambio de represor de la expresión génica a coactivador transcripcional. La actividad de la vía PI3K/AKT es regulada por SHP-1, fosfatasa que se expresa en próstata y que parece ser un elemento clave en el desarrollo normal de la próstata, así como en el origen y progresión del cáncer de próstata [31].

Por ello, pensamos que SHP-1 puede controlar el papel como activador transcripcional de EZH2 a través de AKT y, por lo tanto, sea capaz de modular la eficacia de los tratamientos con inhibidores de esta metilasa (Figura 3). Hasta la fecha, se han descubierto varios inhibidores de enzimas clave en la epigenética del cáncer, y proporcionan una vía prometedora para desarrollar agentes farmacológicos efectivos para combatir enfermedades resistentes a las terapias actuales [32]. Se desconoce si atacar a las histonas metiltransferasas (EZH2) y a otros coactivadores de AR será seguro y efectivo, pero los datos preclínicos hasta la fecha sugieren que tales ensayos clínicos son racionales. Por otro lado, el diseño de terapias contra la fosfatasa SHP-1 es especialmente interesante, ya que es capaz de regular distintas vías implicadas en la progresión a CRPC, modificando el perfil de expresión génica [33].

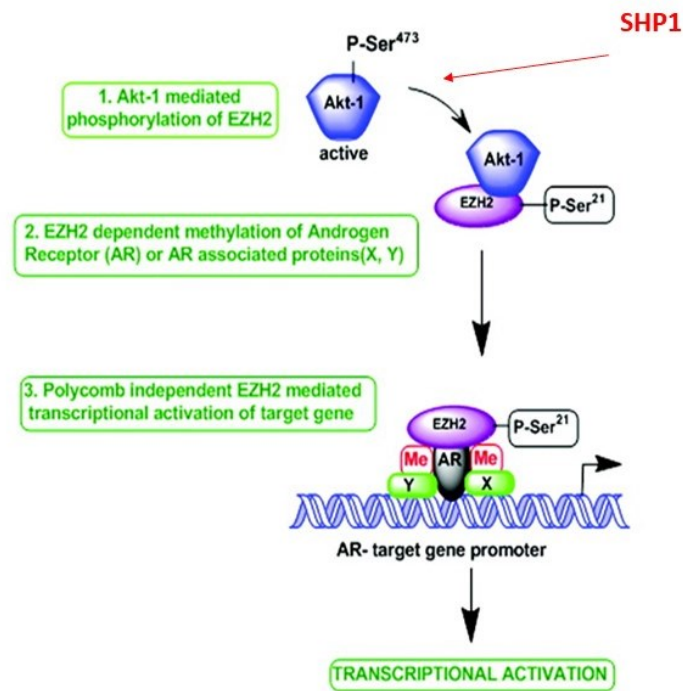


Figura 3.- Regulación de EZH2 por AKT1 y su consecuencia en la transcripción génica. En células de cáncer de próstata, AKT1 fosforila EZH2 en la serina 21. EZH2 fosforilada interacciona con AR y lo metila en la lisina 630 y 632, lo que puede aumentar su actividad transcripcional (Tomado de Geb *et al*).

Objetivos

Los objetivos que se proponen abordar en este trabajo son:

1. Determinar si SHP-1 forma parte de un complejo de señalización con AKT, EZH2 y AR.
2. Determinar si la eliminación de SHP-1 afecta a la actividad de AKT, EZH2 y AR.
3. Determinar si SHP-1 regula el efecto sobre la proliferación celular de GSK126, un inhibidor de EZH2.

Metodología

Muestras.

Para llevar a cabo este proyecto utilizaremos las siguientes líneas celulares prostáticas humanas:

Células LNCaP: Línea celular que procede de una metástasis en ganglio linfático de un adenocarcinoma prostático. Expresa el antígeno prostático específico (PSA), la fosfatasa ácida prostática y el receptor de andrógenos. Representa una fase dependiente de andrógenos y responde a tratamientos con hormonas androgénicas.

Células LNCaP Abl: Estas células fueron cedidas por el Dr. Culig (Universidad de Innsbruck, Austria) y se generó mediante el cultivo continuado de las células LNCaP en un medio libre de andrógenos. Esta línea celular es insensible a los tratamientos hormonales, pero expresan el receptor de andrógenos.

Células VCaP: Línea celular que procede de una metástasis ósea de un paciente con cáncer de próstata resistente a la castración. Expresa el receptor de andrógenos y representa una fase independiente de andrógenos.

Estas líneas celulares fueron seleccionadas como modelos *in vitro* de las distintas fases del cáncer de próstata. LNCaP representa una fase temprana de la enfermedad, mientras que Abl y VCaP representan una fase más tardía, correspondiente a la insensible a andrógenos y, por tanto, resistente a la castración. La razón de elegir líneas que representen distintos estadios de la enfermedad nos permitirá determinar si el posible efecto de SHP-1 sobre el mecanismo de acción de EZH2 depende de la fase del tumor en que esté, pudiendo establecer estrategias terapéuticas distintas en función de la necesidad de cada paciente.

Objetivo 1. Determinar si SHP-1 interacciona con AKT, EZH2 y AR.

Para abordar este objetivo aislaremos extractos proteicos de las distintas líneas celulares y analizaremos los complejos proteicos formados por SHP-1 mediante ensayos de captura y unión y co-

immunoprecipitación. La presencia en estos complejos de las proteínas que nos interesan se realizará mediante western-blot.

Aislamiento de extractos proteicos. Las células se sembrarán en placas P100 a una densidad óptima, en medio completo. A las 72 horas, se lavarán y se lisarán con un tampón que contiene el detergente Tritón x100. La fracción soluble se separará mediante centrifugación y se determinará el contenido proteico mediante la técnica Bradford (Protein Assay de BioRad). Como estándar se usará una solución de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1mg/ml. Las muestras que no se utilicen el mismo día se conservarán a -20° C.

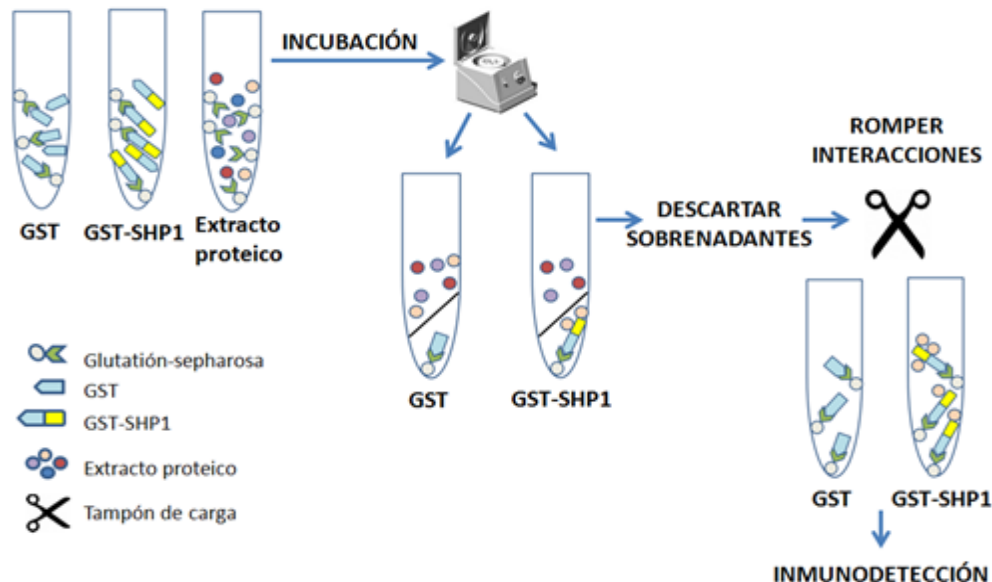


Figura 4.- Esquema explicativo de las fases más importantes del *pull down*.

Ensayos de captura y unión “pull down”. Se utilizará una proteína de fusión GST-SHP-1 que permitirá capturar todas aquellas proteínas que interaccionen con SHP-1. Esta proteína se inducirá en bacterias utilizando un vector de expresión pGEX que contiene la secuencia correspondiente a la enzima glutatión transferasa (GST) fusionada al cDNA que codifica para SHP-1. La proteína GST-SHP-1 purificada se incubará con extractos proteicos de las líneas celulares prostáticas, los complejos formados se precipitarán utilizando glutatión-sepharosa, el glutatión interaccionará con la parte GST de la proteína de fusión GST-SHP-1 y la Sepharosa permitirá arrastrar los complejos formados. Las proteínas capturadas presentes en estos complejos se analizarán mediante western blot. Como control utilizaremos el vector pGEX que solamente expresa GST.

Co-immunoprecipitación. Las interacciones con SHP-1 encontradas se validarán “*in vivo*” mediante la técnica de co-immunoprecipitación. En estos ensayos se incubarán extractos proteicos de las líneas celulares prostáticas con un anticuerpo contra SHP-1. El anticuerpo interaccionará con SHP-1 formando un complejo donde también estarán presentes las proteínas unidas a la fosfatasa. Estos complejos se precipitarán mediante proteína G-sepharosa, la proteína G interaccionará con el anticuerpo mientras que la matriz Sepharosa permitirá el arrastre y precipitación de los complejos formados que se analizarán posteriormente mediante western blot. Como control, y en paralelo, se realizará el mismo procedimiento en extracto proteico donde no se añadirá el anticuerpo contra SHP-1. Estos ensayos se podrán repetir inmunoprecipitando también AR, EZH2 y AKT.

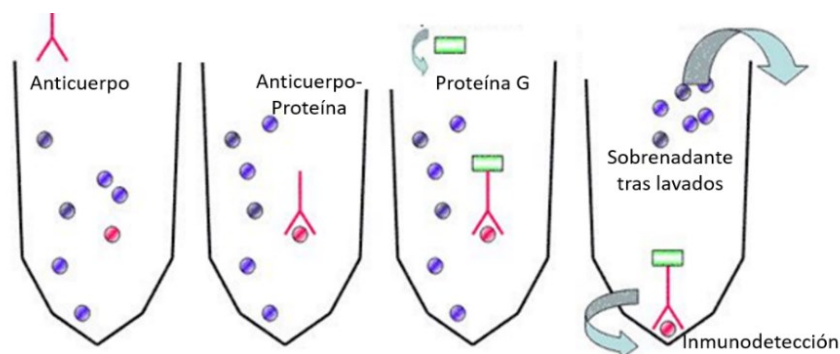


Figura 5.- Fases más importantes de la co-immunoprecipitación.

Western blot. En ella, las proteínas se someterán a una separación electroforética en SDS-PAGE para su posterior transferencia a una membrana de PVDF. La membrana se incubará con los anticuerpos

primarios anti-SHP-1, anti-AR, anti-EZH2 y anti-AKT y un anticuerpo secundario Anti-IG marcado con peroxidasa (HRP) para proceder a su revelado tras incubar las membranas con un reactivo quimioluminiscente.

Con estos procedimientos se conseguirá determinar si SHP-1 está formando un complejo proteico con AR, EZH2 y AKT y, además, permitiría comparar los perfiles de interacción obtenidos en células sensibles y células resistentes al tratamiento hormonal.

Objetivo 2. Determinar si la eliminación de SHP-1 afecta a la actividad de AKT, EZH2 y AR.

Con este objetivo pretendemos determinar cuáles son las consecuencias funcionales de las interacciones detectadas en el apartado anterior. Para ello anularemos la expresión de SHP-1 mediante RNA de interferencia y estudiaremos los cambios en la actividad de EZH2 analizando los niveles de H3K27me3, su fosforilación en la Ser 21 y si se modifica su interacción con AR. A continuación, estudiaremos las consecuencias generadas por estos cambios en la actividad del AR analizando su grado de metilación, su nivel de fosforilación en tirosina y su actividad transcripcional. Por último, estableceremos si los cambios inducidos en el sistema EZH2-AR por la anulación de SHP-1 están mediados por AKT, midiendo la actividad de esta quinasa.

RNA de interferencia. Anularemos la expresión de SHP-1 transfectando las células con un RNA pequeño de interferencia (siRNA) específico para el gen de SHP-1, en presencia del reactivo *Lipofectamine RNAiMAX* (Invitrogen), con el objetivo de degradar el RNAm de esta proteína. Como control, se transfectarán células con un RNA *scrambled* (SC) que no inhibe ningún gen humano. Con el fin de comprobar la anulación de la proteína se realizarán ensayos de western-blot tras 72 horas de la transfección.

Actividad de EZH2. Para determinar si el silenciamiento de SHP-1 afecta a la función de EZH2 se analizarán, en células con y sin SHP-1, los niveles de H3K27me mediante western blot con anticuerpos contra la histona H3 metilada en la lisina 27; como control de carga se utilizarán los niveles de la histona H3. De la misma manera, se realizarán ensayos de western blot con anticuerpos contra EZH2 fosforilada en la serina 21 y se utilizará como control de carga EZH2.

Por último, se realizarán ensayos de co-inmunoprecipitación para analizar si el silenciamiento de SHP-1 afecta a la interacción de EZH2 con AR, inmunoprecipitando cualquiera de las dos proteínas y analizando los inmunocomplejos formados mediante western blot.

Actividad del AR. Para determinar si el silenciamiento de SHP-1 afecta de manera directa o indirecta a la actividad transcripcional del receptor de andrógenos se realizarán ensayos de RT-PCR cuantitativa para medir los niveles del RNAm del PSA, uno de los genes regulados por AR. En primer lugar, se llevará a cabo la extracción del RNA siguiendo el protocolo de Trizol (Invitrogen) y después la síntesis de cDNA mediante un kit comercial. A continuación, se realizarán las reacciones de PCR con oligonucleótidos que amplifiquen el cDNA que codifica para el PSA. Las reacciones se llevarán a cabo por triplicado en cada uno de los experimentos. Los valores obtenidos se normalizarán utilizando el gen de expresión constitutiva gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas (*Gdph*). El análisis de los datos se llevará a cabo mediante el programa 7500 software v2.0.1.

Dado que pSer21EZH2 metila al receptor de andrógenos en sus lisinas 630 y 632, se inmunoprecipitará AR en presencia y en ausencia de SHP-1 y se analizará, por western blot su grado de metilación utilizando un anticuerpo que reconoce lisinas metiladas. Utilizando un procedimiento similar, inmunoprecipitación de AR y western blot, se analizará la fosforilación de AR utilizando un anticuerpo que reconoce tirosinas fosforiladas.

Actividad de AKT. Se realizarán ensayos de western blot utilizando un anticuerpo que reconoce AKT fosforilada en la serina 473, lo cual es un indicador aceptado de su actividad. Como control de carga se utilizará AKT total.

Con los resultados que obtengamos intentaremos confirmar nuestra hipótesis de que SHP-1 regula a través de la vía PI3K/AKT la vía de señalización por la que EZH2 se transforma de represor transcripcional en un coactivador transcripcional con AR contribuyendo a la progresión del cáncer de próstata a la fase independiente de andrógenos o CRPC. De la misma manera, estos estudios nos permitirán comparar los perfiles de fosforilación de estas proteínas en estadios diferentes de la enfermedad. Con todo esto, se abrirá la puerta a posibles terapias contra la resistencia hormonal del cáncer de próstata considerando como dianas terapéuticas las proteínas implicadas.

Objetivo 3. Determinar si SHP-1 regula el efecto sobre la proliferación celular de GSK126, un inhibidor de EZH2.

Para abordar el siguiente objetivo, se anulará la expresión de SHP-1, se incubarán las células con GSK126 y se analizará la viabilidad celular mediante un ensayo con MTT. Posteriormente, para

determinar si los cambios en viabilidad celular se deben a apoptosis o a necrosis, determinaremos viabilidad celular mediante incorporación de yoduro de propidio, mediremos el potencial de membrana mitocondrial y analizaremos las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Ensayo de viabilidad con MTT. Las células con y sin SHP1, se tratarán a distintos tiempos con el inhibidor GSK126 a concentraciones crecientes. Como control se utilizarán células sin tratamiento. La proliferación se analizará usando el reactivo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). El MTT se transformará, por la acción de las oxido-reductasas mitocondriales, en un compuesto insoluble denominado formazán que absorbe a 595nm, por lo que la viabilidad celular es proporcional a la absorbancia a esta longitud de onda. Transcurridos los tiempos de incubación con el GSK126, se añadirá el MTT; a las 3 horas se añadirá dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán, producto de la reacción, y se medirá la absorbancia en un espectrofotómetro a 595nm.

Análisis de viabilidad mediante incorporación de yoduro de propidio. Para analizar viabilidad celular se cogerá una suspensión de células a la que se le añadirá una solución de yoduro de propidio (IP). La capacidad de IP para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana; el IP no se incorpora en las células con una membrana plasmática intacta. Cuando las células son apoptóticas y necróticas, la integridad de la membrana plasmática y nuclear disminuye, lo que permite pasar al IP a través de las membranas y que se intercale en el DNA. Al analizar los datos en el citómetro, mediremos células IP positivas y negativas; si las células son IP positivas indicaría rotura en su membrana plasmática, que se traduce en muerte celular.

Análisis del potencial de membrana mitocondrial. La caída del potencial de membrana mitocondrial es un indicador de apoptosis temprana. Para valorar este potencial se utilizará la sonda TMRM (Tetramethylrhodamine methyl ester, perchlorate). Esta sonda se une a las mitocondrias y emite fluorescencia cuando el potencial de membrana mitocondrial es normal pero cuando hay una caída de este potencial la sonda se dispersa en el citosol y la fluorescencia cae drásticamente. Las células tratadas con o sin GSK126 se incubarán con la sonda TMRM y se analizarán utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur de Beckton Dickinson (Unidad de cultivos, UAH) lo que nos permitirá cuantificar el % de células TMRM negativa como indicador de apoptosis.

Análisis del ciclo celular: Las células tratadas con o sin GSK126 se permeabilizarán con etanol al 70% para permitir la entrada del yoduro de propidio. Este reactivo se intercala en el DNA proporcionalmente a la cantidad de este. Las células se analizarán utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur de Beckton Dickinson (Unidad de cultivos, UAH) que nos permitirá cuantificar el % de células en cada fase del ciclo celular. Este tipo de análisis nos permitirá determinar el efecto del GSK126 sobre la proliferación celular pero también nos cuantificará incluida la fase sub G₀, que nos indica apoptosis.

Con estos resultados esperamos determinar si SHP-1 modula la eficacia de GSK126 sobre la proliferación celular de líneas celulares prostáticas sensibles y resistentes a andrógenos y que, por lo tanto, representan *in vitro* distintas fases en la progresión de la enfermedad. En la actualidad, existen distintos ensayos clínicos con fármacos que inhiben EZH2, entre los que se encuentra GSK126 por lo que esperamos que estos estudios permitan un mejor diseño de estos tratamientos y mejorar su eficacia.

Dianas terapéuticas y terapias futuras

El cáncer de próstata resistente a la castración constituye un grave problema de salud con un mal pronóstico al no existir actualmente tratamientos curativos. Esto es debido a los múltiples mecanismos moleculares alternativos que se activan tras la ablación androgénica y que no se conocen en profundidad. Es por ello por lo que este trabajo está dirigido a intentar aclarar el papel potencial tanto de las proteínas epigenéticas que regulan la expresión génica, como del AR y por supuesto de SHP-1 como dianas terapéuticas contra las que establecer nuevas estrategias curativas. El cambio de EZH2 de represor a activador de la transcripción junto con AR en células de CRPC requiere de una investigación más profunda sobre todo para descifrar en qué circunstancias o qué otras moléculas son responsables de este cambio de función, lo que permitirá desarrollar inhibidores que se dirijan específicamente a la función activadora EZH2 al tiempo que conserven su función represiva PRC2. Además, el hallazgo de que EZH2 coopera con complejos asociados con AR y requiere fosforilación para promover el crecimiento de CRPC ha sido el origen de este proyecto para estudiar la contribución de la fosfatasa SHP-1 y abre las puertas a nuevas combinaciones terapéuticas para el tratamiento del CRPC. En relación con el cáncer de próstata, los datos expuestos sugieren que SHP-1 podría tener un papel relevante en la progresión de la enfermedad mediante la interacción y el control de la actividad del AR y las proteínas que regulan las modificaciones epigenéticas, por lo que podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de tumores de próstata refractarios al bloqueo hormonal.

Referencias

1. Harris, W., Mostaghel, E., Nelson, P. and Montgomery, B., 2009. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature Clinical Practice Urology*, 6(2):76-85.
2. Van Cangh, P., Gala, J. and Tombal, B., 2000. Immediate vs. delayed androgen deprivation for prostate cancer. *The Prostate*, 45(S10):19-25.
3. Kirby, M., Hirst, C. and Crawford, E., 2011. Characterising the castration resistant prostate cancer population: a systematic review. *International Journal of Clinical Practice*, 65(11):1180-1192.
4. Huang, Y., Jiang, X., Liang, X., & Jiang, G., 2018. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer (Review). *Oncology Letters*. doi: 10.3892/ol.2018.8123.
5. Loblaw, D., Mendelson, D., Talcott, J., Virgo, K., Somerfield, M., Ben-Josef, E., Middleton, R., Porterfield, H., Sharp, S., Smith, T., Taplin, M., Vogelzang, N., Wade, J., Bennett, C. and Scher, H., 2004. American Society of Clinical Oncology Recommendations for the Initial Hormonal Management of Androgen Sensitive Metastatic, Recurrent, or Progressive Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(14):2927-2941.
6. Culig, Z. and Santer, F., 2014. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 33(2-3):413-427.
7. Li, Y., Xie, N., Gleave, M., Rennie, P. and Dong, X., 2015. AR-v7 protein expression is regulated by protein kinase and phosphatase. *Oncotarget*, 6(32).
8. Mills, I., 2014. Maintaining and reprogramming genomic androgen receptor activity in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(5):381-381.
9. Aggarwal RR, Feng FY, Small EJ., 2017. Emerging Categories of Disease in Advanced Prostate Cancer and Their Therapeutic Implications. *Oncology*, 33:467-74.
10. Baylin, S., 2000. Aberrant Methylation of Gene Promoters in Cancer-Concepts, Misconcepts, and Promise. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(18):1460-1461.
11. Nowacka-Zawza, M a W ś k., 2017. DNA methylation and histone modifications as epigenetic regulation in prostate cancer. *Oncology Reports*, 38(5):2587-2596.
12. Crea, F., Sun, L., Mai, A., Chiang, Y., Farrar, W., Danesi, R. and Helgason, C., 2012. The emerging role of histone lysine demethylases in prostate cancer. *Molecular Cancer*, 11(1):52.
13. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al., 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 37(4):391-400.
14. Cavalli, G., 2012. EZH2 Goes Solo. *Science*, 338(6113):1430-1431.
15. Margueron, R. and Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330):343-349.
16. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al., 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419:624-9.
17. Yang, Y. and Yu, J., 2013. EZH2, an epigenetic driver of prostate cancer. *Protein & Cell*, 4(5):331-341.
18. Xu, K., Wu, Z., Groner, A., He, H., Cai, C., Lis, R., Wu, X., Stack, E., Loda, M., Liu, T., Xu, H., Cato, L., Thornton, J., Gregory, R., Morrissey, C., Vessella, R., Montironi, R., Magi-Galluzzi, C., Kantoff, P., Balk, S., Liu, X. and Brown, M., 2012. EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent. *Science*, 338(6113):1465-1469.
19. Cha, T., 2005. Akt-Mediated Phosphorylation of EZH2 Suppresses Methylation of Lysine 27 in Histone H3. *Science*, 310(5746):306-310.
20. Cariaga-Martinez, A., López-Ruiz, P., Nombela-Blanco, M., Motiño, O., González-Corpas, A., Rodríguez-Ubreva, J., Lobo, M., Cortés, M. and Colás, B., 2013. Distinct and specific roles of AKT1 and AKT2 in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells. *Cellular Signalling*, 25(7):1586-1597.
21. Cuevas, B., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K. and Mills, G., 2001. Tyrosine Phosphorylation of p85 Relieves Its Inhibitory Activity on Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29):27455-27461.

22. Kim, J., Lee, Y., Lu, X., Song, B., Fong, K., Cao, Q., Licht, J., Zhao, J. and Yu, J., 2018. Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. *Cell Reports*, 25(10):2808-2820.
23. Irandoust M, van den Berg TK, Kaspers GJL, Cloos J. Role of tyrosine phosphatase inhibitors in cancer treatment with emphasis on SH2 domain-containing tyrosine phosphatases (SHPs). *Anticancer Agents Med Chem [Internet]*. 2009;9(2):212–20.
24. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. 2004;117:699–711
25. Wu, C., 2003. The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer. *Gene*, 306, 1-12.
26. Sharma, Y., Bashir, S., Bhardwaj, P., Ahmad, A. and Khan, F., 2016. Protein tyrosine phosphatase SHP-1: resurgence as new drug target for human autoimmune disorders. *Immunologic Research*, 64(4):804-819.
27. Drake, J., Graham, N., Stoyanova, T., Sedghi, A., Goldstein, A., Cai, H., Smith, D., Zhang, H., Komisopoulou, E., Huang, J., Graeber, T. and Witte, O., 2012. Oncogene-specific activation of tyrosine kinase networks during prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5): 1643-1648.
28. Guo, Z., Dai, B., Jiang, T., Xu, K., Xie, Y., Kim, O., Nesheiwat, I., Kong, X., Melamed, J., Handratta, V., Njar, V., Brodie, A., Yu, L., Veenstra, T., Chen, H. and Qiu, Y., 2006. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell*, 10(4):309-319
29. Zapata, P., Ropero, R., Valencia, A., Buscail, L., López, J., Martín-Orozco, R., Prieto, J., Angulo, J., Susini, C., López-Ruiz, P. and Colás, B., 2002. Autocrine Regulation of Human Prostate Carcinoma Cell Proliferation by Somatostatin through the Modulation of the SH2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase (SHP)-1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(2):915-926.
30. García-Tello, A., Angulo, J., Rodríguez-Ubreva, J., Andrés, G., López, J., Sánchez-Chapado, M., López-Ruiz, P. and Colás, B., 2014. Prostate anatomy in motheaten viable (mev) mice with mutations in the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, 38(7):438-444.
31. Rodríguez-Ubreva, F., Cariaga-Martinez, A., Cortés, M., Romero-De Pablos, M., Ropero, S., López-Ruiz, P. and Colás, B., 2009. Knockdown of protein tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits G1/S progression in prostate cancer cells through the regulation of components of the cell-cycle machinery. *Oncogene*, 29(3):345-355.
32. Gulati, N., Béguelin, W. and Giulino-Roth, L., 2018. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*, 59(7):1574-1585.
33. Watson, H., Wehenkel, S., Matthews, J. and Ager, A., 2016. SHP-1: the next checkpoint target for cancer immunotherapy? *Biochemical Society Transactions*, 44(2):356-362.