

Caracterización de clones estables de SHP-1 en líneas celulares de cáncer de próstata.

David Echegaray García^a, Begoña Colás Escudero, Santiago Ropero Salinas

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. david.echegaray.uah@gmail.com

Palabras clave: cáncer de próstata; fosfatasa SHP-1; histona metiltransferasa EZH2; AKT; receptor de andrógenos (AR)

Resumen

El cáncer de próstata (CP) es uno de los problemas sanitarios más relevantes de nuestra sociedad actual. A pesar de disponer de diversos tratamientos para abordarla, el avance de la enfermedad hacia un estadio refractario conocido como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) hace que hoy en día siga teniendo altos índices de mortalidad. Muchos de los mecanismos moleculares involucrados en su desarrollo están relacionados con cambios en el receptor de andrógenos (AR), que gobierna el desarrollo normal y patológico de la próstata. Entre estos mecanismos encontramos cambios en la expresión y función de coreguladores de AR, así como la activación del receptor por vías independientes de andrógenos. En estos mecanismos participan una serie de proteínas, entre las que encontramos un complejo de señalización conformado por AKT-EZH2-AR. La evidencia científica respalda el papel de EZH2 como activador independiente de AR, función promovida al ser fosforilada por AKT. Debido a la función reguladora que la fosfatasa SHP-1 podría tener sobre AKT, hipotetizamos sobre el papel que esta podría tener sobre el complejo y, por tanto, sobre el avance de la enfermedad hacia CRPC. Para estudiarlo, obtuvimos mediante CRISPR/Cas9 clones estables de distintas líneas celulares de CP con el gen de SHP-1 silenciado para así poder determinar si existían o no diferencias en una serie de parámetros celulares. El silenciamiento promovió diversas modificaciones en el modelo sensible a andrógenos que no se observaron en los modelos de CRPC, entre las que encontramos una menor sensibilidad a GSK126, una disminución del gen regulado por AR, FKBP5, y la adquisición de un fenotipo neuroendocrino. Los datos apoyan la hipótesis de que SHP-1 podría ser un posible regulador de este complejo de señalización, aunque futuros estudios son necesarios para determinar con exactitud de qué manera.

Cita: Echegaray García, David; Colás Escudero, Begoña; Ropero Salinas, Santiago (2022) Caracterización de clones estables de SHP-1 en líneas celulares de cáncer de próstata. *dianas* 11 (2): e202209fa06. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202209fa06](http://www3.uah.es/dianas?e202209fa06) <http://www3.uah.es/dianas?e202209fa06>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Echegaray-García D, Colás-Escudero B, Ropero-Salinas S. 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/>

Introducción

El cáncer de próstata (CP) es una de las enfermedades tumorales con mayor incidencia a nivel mundial en la población masculina. Existen varios factores de riesgo asociados con su aparición, siendo la edad la más relevante [1]. La alteración del desarrollo normal de la próstata está principalmente asociada con cambios que se dan en el receptor de andrógenos (AR), que funciona como un factor de transcripción que regula la expresión génica y el desarrollo normal de este órgano como consecuencia de la unión de sus ligandos (testosterona y dihidrotestosterona) [2].

En función del estadio de la enfermedad, actualmente existen distintos abordajes terapéuticos. En los casos más agudos, encontramos la cirugía y radiación [3], mientras que, en los casos más graves y debido a que el desarrollo tanto normal como patológico está controlado por los andrógenos y AR, la ablación androgénica es el tratamiento por excelencia. Sin embargo, debido a las alteraciones que caracterizan a esta enfermedad, muchos de los pacientes derivan a un estadio conocido como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), en el cual el tumor es capaz de desarrollarse en ausencia de andrógenos y en cuyo caso solo existen tratamientos paliativos [4].

Existen numerosos mecanismos moleculares que explican la aparición de esta resistencia, entre los que encontramos cambios en la expresión y actividad de coreguladores de AR, así como su activación por vías de señalización alternativas [5]. Es precisamente en estos mecanismos moleculares donde participan una batería de proteínas que son el objeto de estudio de este trabajo y que podrían ser determinantes para el avance de la enfermedad hacia CRPC.

Cuando AR se activa como consecuencia de la unión de su ligando, este se dirige al núcleo para regular la expresión génica. Para ello, el receptor coopera con una serie de coreguladores entre los que encontramos

proteínas reguladoras de las modificaciones epigenéticas [6]. Estas modificaciones, entre las que encontramos la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas, van a regular la pauta de expresión génica. Cambios en estas modificaciones pueden dar lugar a alteraciones responsables del desarrollo de diversas patologías [7]. Uno de los coreguladores que se han descrito y cuyos cambios son esenciales en el desarrollo de distintos tipos de cáncer es la histona metiltransferasa EZH2. El papel canónico de esta proteína es la represión transcripcional mediante la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) [8]. Numerosos estudios han dilucidado una correlación entre la sobreexpresión de esta proteína y una mayor agresividad y peor pronóstico de numerosas enfermedades entre las que encontramos el CP [9]. Sin embargo, EZH2 es capaz de llevar a cabo otras funciones mediante la metilación de sustratos no histonas, entre los que encontramos a AR. La importancia de este hecho es que, tal y como se ha descrito previamente, la metilación de AR es capaz de promover su actividad transcripcional en ausencia de andrógenos y por lo tanto promueve el avance de la enfermedad hacia CRPC [10]. Entre las posibles proteínas que explicarían esta dualidad en la función de EZH2 encontramos AKT. Esta quinasa se encuentra constitutivamente activa en CP, y diversas evidencias parecen apuntar que es la responsable de fosforilar a EZH2 en su residuo Ser21, promoviendo que esta histona metiltransferasa metile y active a AR [11, 12].

La activación independiente de andrógenos de AR es otro de los mecanismos moleculares que explicarían la progresión hacia CRPC. En este caso, contribuyen numerosas quinastas cuyo objetivo final será fosforilar y activar al receptor y sus coreguladores. Sin embargo, también son importantes las fosfatases encargadas de apagar la señal, siendo SHP-1 una de las más estudiadas en CP. SHP-1 es una tirosín fosfatasa que presenta dos dominios SH2, lo que permite la interacción de esta con proteínas que presenten residuos de tirosina fosforilados [13]. Estudios en ratones *knockout* han puesto de manifiesto el papel de esta fosfatasa como regulador negativo de vías de señalización relacionadas con proliferación, supervivencia, crecimiento, etc. siendo especialmente clave para el correcto funcionamiento del sistema hematopoyético [14]. Además, también se ha descrito como un posible e importante supresor de tumores en cánceres hematopoyéticos [13]. Sin embargo, su papel en células epiteliales es objeto de controversia, habiéndose descrito un papel contradictorio tanto como regulador positivo y negativo de vías de señalización relacionadas con proliferación [15]. La presencia de esta fosfatasa fue inicialmente descrita en cáncer de próstata por nuestro grupo de investigación, observándose una disminución en sus niveles conforme aumentaba la gravedad de la enfermedad [16]. Además, también es capaz de controlar componentes del ciclo celular a través de la regulación de la vía PI3K-AKT, pues al defosforilar la subunidad p110 de PI3K, aumenta la actividad de esta y por tanto también la de AKT [17].

Debido a toda esta evidencia, nuestra hipótesis se centra en el posible papel de SHP-1 como regulador de la vía de señalización compuesta por AKT-EZH2-AR y que podría contribuir en el avance de la enfermedad hacia CRPC. Por lo tanto, nuestros objetivos son obtener clones estables de SHP-1 mediante la técnica CRISPR-Cas9 y analizar si existen o no diferencias en una serie de parámetros celulares que puedan ayudar a dilucidar el papel de esta fosfatasa.

Material y métodos

Cultivos celulares

En este estudio se ha trabajado con tres líneas celulares de cáncer de próstata. La primera, LNCaP, obtenida del *American Type Culture Collection* (ATCC) procede de metástasis en un ganglio linfático y representa los estadios tempranos de la enfermedad que todavía responden al tratamiento. La segunda, LNCaP-abl (referida posteriormente como Abl), procede del cultivo sucesivo de células LNCaP en un medio desprovisto de andrógenos y, aunque siguen expresando AR, ya no responden al tratamiento y representan el estadio CRPC de la enfermedad. Por último, encontramos la línea 22Rv1, obtenida también del ATCC que al igual que Abl también representa los estadios más graves de la enfermedad y se caracteriza por expresar la variante de *splicing* AR-V7. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) de Sigma-Aldrich, al cual se le suplementó con 0,25mg/ml de penicilina, 0,25 mg/ml de estreptomycin, 2,5 mg/ml de fungizona y 10% de suero fetal bovino (FBS). En el caso de las células Abl, el FBS fue previamente tratado con carbón activo para retirar los estrógenos endógenos y permitir así su crecimiento en un medio libre de andrógenos. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

CRISPR/Cas9

Para la obtención de clones estables con el gen de SHP-1 (PTPN6) silenciado se llevó a cabo la técnica CRISPR/Cas9. Para ello se utilizó el vector *px330* (Addgene), el cual presentaba el gen para Cas9 así como un RNA guía (gRNA) quimérico con un sitio de restricción para poder incorporar la secuencia complementaria a aquella que se quiere silenciar. En primer lugar, se llevó a cabo la digestión del vector y posteriormente la ligación con el inserto del gRNA. Dicho inserto fue previamente diseñado y adquirido en Sigma Aldrich. El siguiente paso consistió en la transformación de bacterias competentes de *E. coli*

DH5 α con el plásmido, sembrando dichas bacterias en placas de agar con ampicilina para seleccionar aquellas que hubiesen incorporado el plásmido. Seguidamente se aisló el plásmido mediante el kit de miniprep de NZYTech y se transfectaron las células LNCaP, Abl y 22Rv1 mediante el reactivo Lipofectamina (Invitrogen). Finalmente, se seleccionaron las células mediante la adición de puromicina (1 μ g/ml) a su medio, ya que el plásmido contenía un gen de resistencia a dicho antibiótico.

Extracción y cuantificación proteica

Para el estudio de los niveles de expresión de las distintas proteínas, las células se sembraron en distintas placas dependiendo del experimento. Una vez alcanzada la confluencia necesaria, las células se lavaron con PBS y se añadió tampón Tris-HCl 50mM a pH 7,5 con EDTA 1mM, NaCl 150mM, inhibidores de proteasas (ROCHE) y Tritón-X100 al 10% para llevar a cabo la extracción de proteínas, incubando las células en rotación a 4°C durante media hora. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12.000rpm durante 15 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante con las proteínas. Una vez obtenida la fracción proteica, la concentración de proteína se cuantificó mediante la técnica Bradford (*Protein Assay* de BioRad).

Inmunodetección de proteínas (Western-Blot)

Alicuotas de 50 μ g de proteína con tampón de Laemmli (SDS 20%, 20% 2-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,008% azul de bromofenol, 0,250 M Tris HCL y agua miliQ) se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración de 8 o 15% en tampón de electroforesis (25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 192mM Glicina y 0,1% SDS). Al terminar la electroforesis, se realizó la transferencia a membranas de PVDF durante aproximadamente 16 horas a 4°C y a un amperaje constante de 65 mA en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM Glicina y 20% metanol). Una vez transferidas las proteínas, se incubó la membrana en TTBS (Tris 0,1mM, NaCl 1,5mM y 0,05% Tween-20) con leche desnatada al 5% para así bloquear los sitios de unión inespecíficos. Posteriormente se incubó la membrana con sus respectivos anticuerpos primarios diluidos en TTBS durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, y anticuerpos secundarios diluidos en TTBS con leche desnatada al 5% durante una hora a temperatura ambiente, realizando tres lavados de diez minutos con TTBS después de cada incubación. Se hicieron diluciones 1:500 para los anticuerpos primarios, a excepción de β -Tubulina, cuya dilución fue 1:4000, mientras que la dilución para los anticuerpos secundarios fue 1:5000. Por último, la membrana se incubó durante un minuto en un reactivo de detección quimioluminiscente (*WesternBright ECL*), revelando la membrana en un BioRad ChemiDoc Imager.

Anticuerpo	Casa comercial	Anticuerpo secundario
SHP-1	Sigma-Aldrich	
NSE	NeoMarkers	Anti-Rabbit IgG (Millipore)
H3	Abcam	
H3K27me3	Millipore	
β -Tubulina	Sigma-Aldrich	Anti-Mouse IgG (Sigma)

Tabla 1.- Anticuerpos primarios utilizados para los ensayos de inmunodetección por western-blot, indicando la casa comercial y el respectivo anticuerpo secundario.

Extracción ácida de histonas

Se sembraron células en placas P100 a una densidad de 150.000 células/ml. Tras 48 horas, se trataron con 5 μ M de GSK126 durante tres días. Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo la extracción de las histonas. Para ello, se levantaron las células con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en tampón RSB (Tris 10mM pH 7,5, NaCl 10mM, MgCl₂ 3mM) con NP-40 al 10% e inhibidores de proteasas (ROCHE), incubando durante 10 minutos en hielo. Después se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavó el pellet dos veces con RSB, descartando siempre el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 0,5ml de HCl 0,25M, se incubó en rotación durante 3-4 horas a 4°C y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C, recuperándose, en este caso, el sobrenadante. Este se pasó a tubos limpios y se añadió a cada uno 8 volúmenes de acetona, dejándolo toda la noche a -20°C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C, lavando seguidamente el pellet dos veces con acetona. Una vez seco el pellet, se resuspendió de nuevo en RSB y se prosiguió a cuantificar la cantidad de histonas mediante la técnica Bradford (*Protein Assay* de BioRad).

Ensayos de viabilidad celular

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células/pocillo. Transcurridos dos días, las células se trataron con dosis crecientes del fármaco GSK126, un potente inhibidor de la histona metiltransferasa EZH2. Tras 48 horas desde el tratamiento, se añadió 10 µl de MTT, incubando las placas durante 2-3 horas a 37°C. El MTT es un reactivo que, al ser reducido por la enzima succinato-deshidrogenasa, se transforma en un producto coloreado llamado formazán, de manera que, dependiendo del grado de viabilidad de las células, la cantidad de este producto en cada pocillo será distinta, siendo mayor conforme mayor sea la viabilidad de las células. Este producto se disolvió posteriormente en 100 µl de DMSO, realizando una lectura en un espectrofotómetro a 570 nm.

Análisis de viabilidad celular por citometría de flujo

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos a una densidad de 100.000 células/ml. Transcurridos dos días, las células se trataron con GSK126 5 y 10 µM, dejando un pocillo como control. Pasadas 24 horas desde el tratamiento, se llevó a cabo el análisis de la viabilidad por citometría de flujo. Para ello se dividió la cantidad total de células en dos tubos para llevar a cabo distintos análisis utilizando el citómetro de flujo MACS Quant 10 (Unidad de Cultivos, UAH):

- TMRM. El pellet de células se resuspendió en 240 µl de RPMI, añadiendo a cada tubo 10 µl de la sonda TMRM, dejando un tubo como control de la autofluorescencia de las células. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C, se analizó en el citómetro de flujo. Esta sonda permitió estudiar cambios en el potencial de membrana, ya que aquellas células viables la secuestran, mientras que en aquellas en las que se haya iniciado la apoptosis se dará una despolarización de la membrana mitocondrial, disminuyendo la señal de la sonda.
- Anexina V. Se utilizó el kit “FITC annexin V/dead cell apoptosis” (Invitrogen) y se procedió según indica el fabricante. El pellet de células se lavó con PBS y se resuspendió en 100 µl del buffer anexina, añadiendo 5 µl de anexina V y 1 µl de yoduro de propidio. Tras incubar los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió 400 µl de buffer anexina y se analizó en el citómetro de flujo. En este caso, las sondas permiten diferenciar procesos de apoptosis temprana (anexina V positivas) de apoptosis tardía (anexina V y yoduro de propidio positivas).

Cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR

El aislamiento de RNA se llevó a cabo utilizando el kit “Nzy Total RNA Isolation” (NzyTech), siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez cuantificada la cantidad de RNA extraída, se realizó la retrotranscripción a cDNA usando 3µg de RNA mediante el kit “Nzy First-Strand cDNA Synthesis” (NzyTech). Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo la cuantificación de la expresión génica mediante una PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) usando NzySpeedy qPCR Green Master Mix (2x) y el sistema Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción consistieron en un ciclo de 95°C durante 2 minutos y 40 ciclos de 5 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. Los niveles de expresión se normalizaron utilizando GAPDH como control interno.

Resultados y discusión

Estudio del papel de EZH2 en el desarrollo del CP

El objetivo principal de nuestro estudio fue determinar si el silenciamiento de SHP-1 alteraba de alguna manera los procesos celulares regulados por la vía de señalización conformada por AKT-EZH2-AR, que parece tener un importante papel no solo en el desarrollo del CP, sino en el avance de este hacia CRPC. Para ello, se utilizaron tres líneas celulares de CP que representaban distintas fases de la enfermedad. LNCaP representaría la fase más temprana y sensible al tratamiento y Abl y 22Rv1 las fases más tardías, definiéndose esta última por la presencia de una variante de *splicing* de AR llamada AR-V7. Esta variante es un marcador de agresividad y suele asociarse con un peor pronóstico al disminuir la eficacia de los tratamientos antiandrogénicos [18].

Para poder determinar, por tanto, este posible papel regulador de SHP-1, primero se analizó el efecto de EZH2 sobre la viabilidad de las tres líneas celulares de CP, pues tal y como se detalla en el apartado de Introducción, esta histona metiltransferasa es clave al ser capaz de promover la actividad de AR de manera independiente de andrógenos. Para ello, se utilizó uno de sus inhibidores por excelencia, GSK126. Antes de proseguir con este estudio, y dado que EZH2 metila la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3), primero se quiso comprobar la eficacia del fármaco para disminuir dichos niveles. Para ello, se trataron las células con 5 µM de GSK126 durante 72 horas y se extrajeron las histonas para analizar mediante western-blot los niveles de H3K27me3. Como puede apreciarse en la Figura 1, el tratamiento es capaz de disminuir considerablemente esta metilación, confirmando así la idoneidad del fármaco para llevar a cabo estos estudios sobre EZH2.

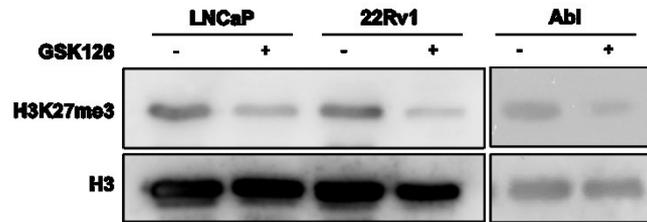


Figura 1.- Niveles de H3K27me3 en las líneas celulares LNCaP, 22Rv1 y Abl. Se trataron las células con 5 μ M de GSK126 durante 72 horas, para después extraer las histonas y estudiar los niveles proteicos mediante western-blot, utilizando H3 como control de carga.

Tras esta comprobación se determinó cuál era el papel que EZH2 jugaba en el desarrollo y progresión del CP. En este caso se realizaron ensayos de viabilidad en los que se trataron las líneas celulares con dosis crecientes de GSK126, dosis que fueron previamente establecidas por nuestro grupo de investigación mediante cinéticas de tiempo. Como se ilustra en la Figura 2, la inhibición de EZH2 disminuyó la viabilidad celular, siendo este efecto más evidente en las líneas celulares Abl y 22Rv1. Ambas líneas presentan una sensibilidad parecida con una IC50 de 12 μ M, mientras que LNCaP es menos sensible, con una IC50 de 17 μ M.

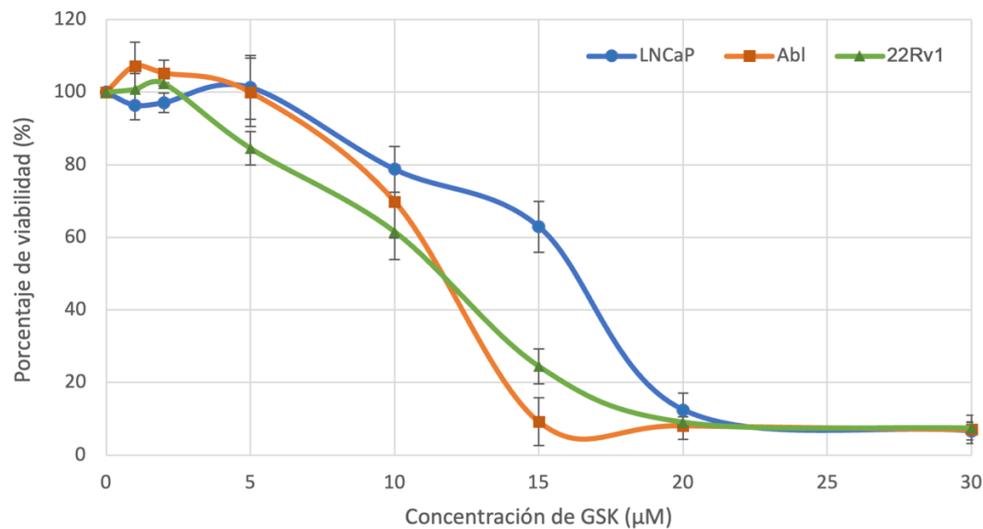


Figura 2.- Efecto de GSK126 en la viabilidad celular de LNCaP, Abl y 22Rv1. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y a los dos días se trataron con dosis crecientes del fármaco (1, 2, 5, 10, 15, 20 y 30 μ M) durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad por MTT tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, utilizando células sin tratamiento como control. Los datos son el resultado de la media \pm SD de 3 experimentos realizados por quintuplicado.

Posteriormente, para determinar si el mecanismo por el cual GSK126 disminuía la viabilidad celular era por muerte celular programada (apoptosis) o mediante otro mecanismo distinto, se llevaron a cabo una serie de análisis por citometría de flujo. En primer lugar, se analizó una disminución en el potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda TMRM, indicador de apoptosis temprana. Tal y como se aprecia en la Figura 3A, en las tres líneas celulares se produce un aumento de las células TMRM negativas conforme aumenta la concentración del fármaco. En segundo lugar, mediante la sonda anexina V se estudiaron cambios en la distribución de la fosfatidilserina en la membrana plasmática, pasando de estar en la cara interna a la cara externa de la membrana, y que es otro evento característico de apoptosis temprana. En este caso, también se aprecia un aumento de las células anexina V positivas de manera dosis dependiente (Figura 3B). Por lo tanto, estos datos indican que la inhibición de EZH2 disminuye la viabilidad celular de células cancerígenas prostáticas sensible e insensible a andrógenos, aunque estas últimas, modelos *in vitro* de CRPC, son más sensibles. En todos los casos la disminución de la viabilidad celular se debe a un aumento de la apoptosis celular.

Estos datos confirman que EZH2 es clave en el avance de la enfermedad hacia CRPC, no solo por la mayor sensibilidad de los modelos de CRPC a la inhibición de esta histona metiltransferasa, sino porque estudios previos ya habían observado que EZH2 metilaba y activaba a AR de manera independiente de andrógenos [10], y por lo tanto era de esperar que la proliferación de las líneas celulares que crecen de manera independiente de andrógenos presentasen una mayor sensibilidad a su inhibición. Además, la mayor sensibilidad de las células Abl frente a LNCaP a la inhibición de EZH2 ya había sido previamente descrita por este grupo de investigación [10]. Todos estos datos, junto con la relación que se ha

establecido entre EZH2 y un amplio espectro de cánceres humanos apoyan los esfuerzos que se están realizando para estudiar la eficacia de GSK126 en el tratamiento de linfomas y tumores sólidos [19].

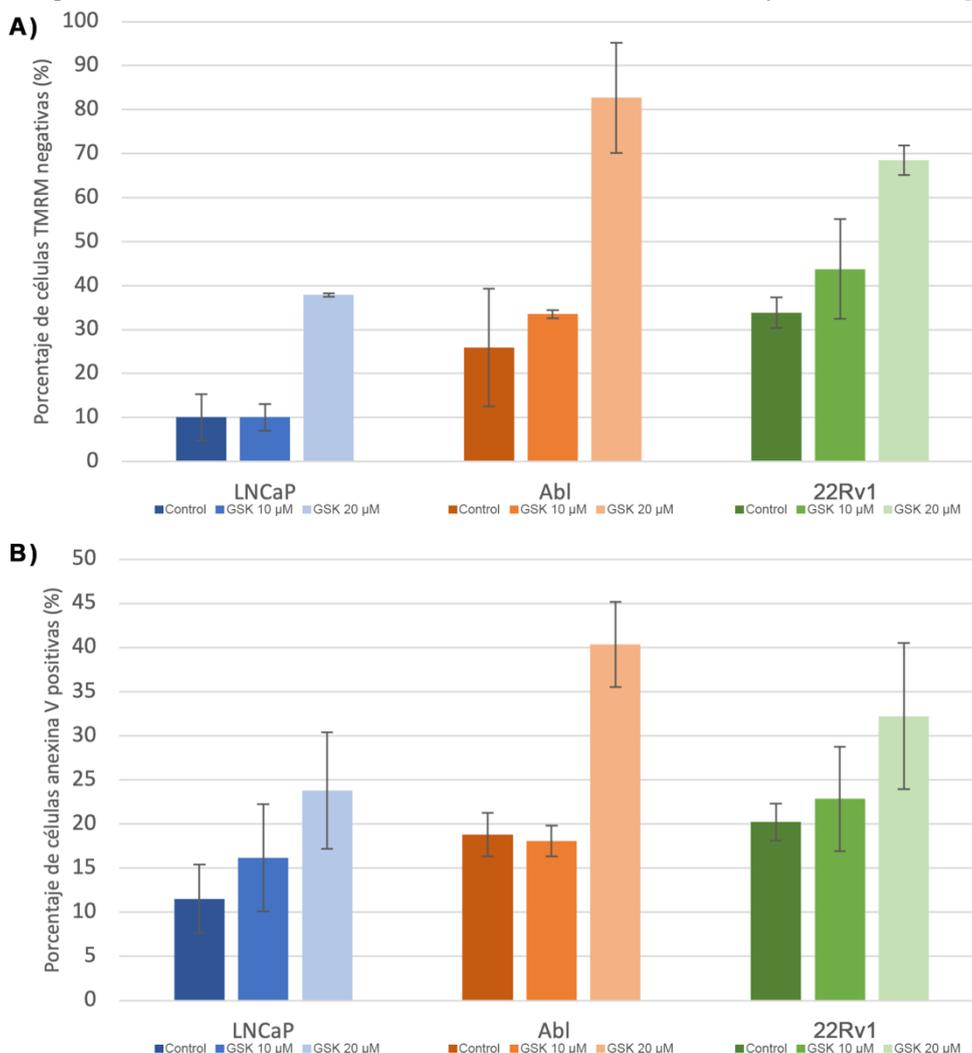


Figura 3.- Estudio de distintos indicadores de apoptosis en células LNCaP, Abl y 22Rv1 tratadas con GSK126. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y a los dos días se trataron con 10 y 20 μ M durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se llevaron a cabo los distintos análisis por citometría de flujo descritos en el apartado de Materiales y Métodos, utilizando células sin tratamiento como control. Los datos son el resultado de la media \pm SD de 2 experimentos: A) Ensayo de TMRM, contabilizando las células TMRM negativas; B) Ensayo de anexina V, contabilizando las células anexina V positivas.

Obtención y comprobación de los clones estables de SHP-1

Estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación habían demostrado que SHP-1 regula la vía PI3K/AKT en un modelo de CP [17]. Dada la relación existente entre AKT, EZH2 y la actividad transcripcional de AR en CRPC, se quiso demostrar si esta fosfatasa podía modular el efecto de EZH2 sobre la viabilidad celular y sobre la actividad transcripcional de AR. Con el objetivo de realizar este estudio, se obtuvieron clones estables que presentasen el gen de SHP-1 (PTPN6) silenciado. Para ello se llevó a cabo la técnica CRISPR/Cas9 tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. Una vez obtenidos, se seleccionaron aquellos clones que presentasen un mejor silenciamiento de SHP-1. Para ello se obtuvieron extractos proteicos y se analizaron los niveles de SHP-1 mediante western-blot (Figura 4). Los clones seleccionados fueron px4 e In2 para LNCaP, px33 e In4 para Abl y px33 e In2 para 22Rv1.

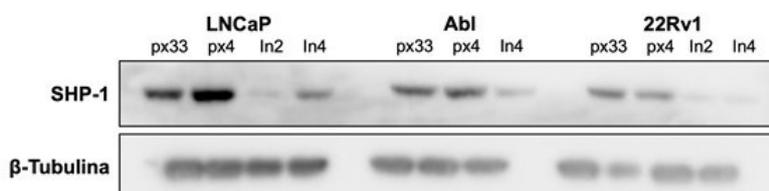


Figura 4.- Niveles de SHP-1 en los clones control (px33 y px4) y en los clones silenciados (In2 e In4) en LNCaP, Abl y 22Rv1. Se realizaron lisados celulares y se estudiaron los niveles proteicos mediante western-blot, utilizando β -Tubulina como control de carga.

Caracterización de los clones estables de SHP-1

El siguiente paso fue estudiar si el silenciamiento de SHP-1 afectaba o no a la sensibilidad mostrada por las células a la inhibición de EZH2. Para ello, se trataron los clones seleccionados con concentraciones crecientes de GSK126 y se analizó la viabilidad celular. Tal y como se muestra en la Figura 5, el silenciamiento de SHP-1 parece modificar la sensibilidad de las células LNCaP, haciéndolas más resistentes a la inhibición de EZH2. Por otro lado, en el caso de 22Rv1 y Abl, no se apreciaron diferencias significativas respecto a la sensibilidad al inhibidor. Aunque estos resultados son preliminares, parecen indicar que la presencia de SHP-1 es necesaria para que las células LNCaP sean más sensibles a la inhibición de EZH2, dato a tener en cuenta en posibles estrategias de tratamiento de CP con inhibidores de EZH2. Futuros estudios son necesarios para confirmar este dato con otros inhibidores de EZH2 y dilucidar a que se debe la diferencia mostrada con los modelos de CRPC.

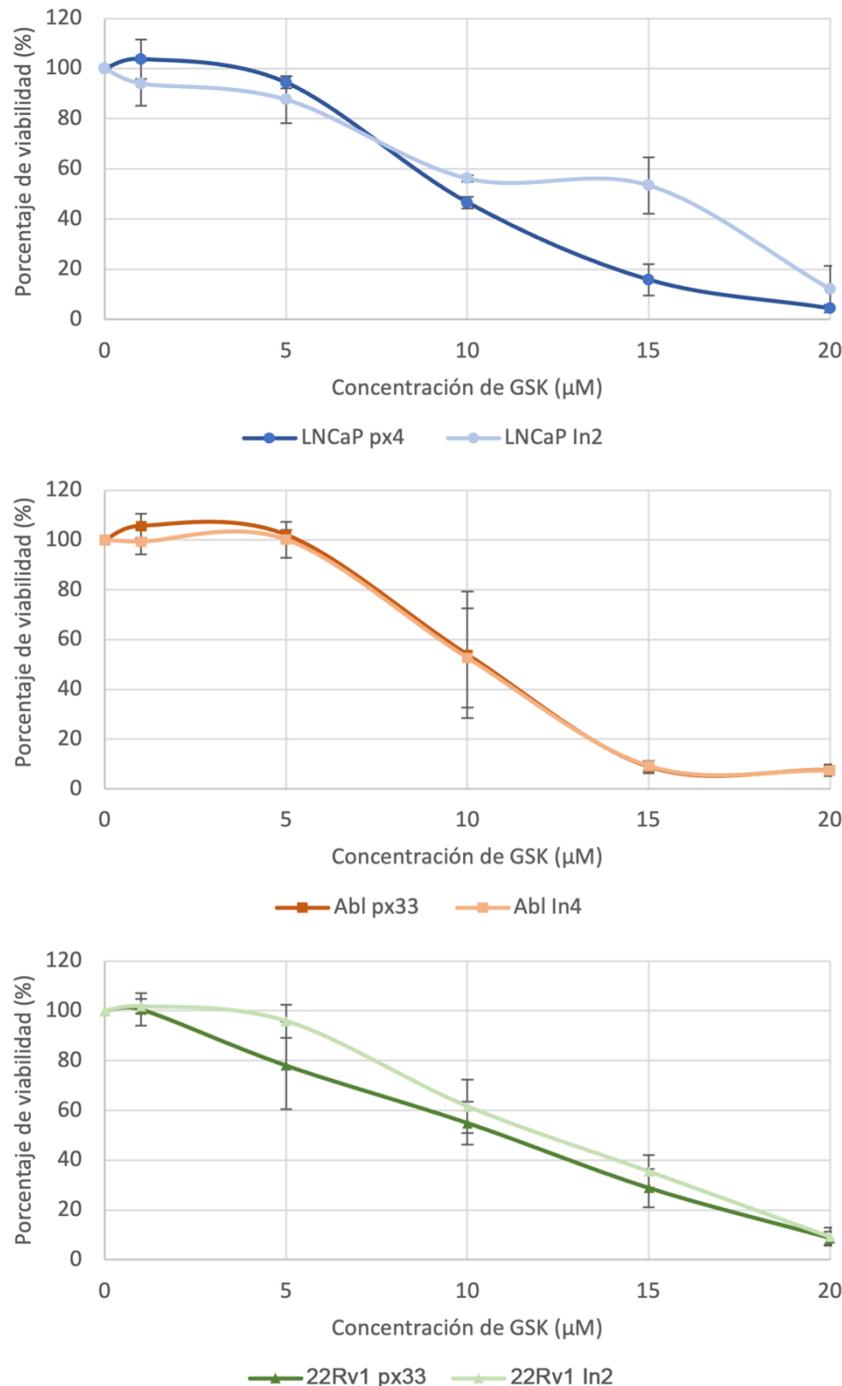


Figura 5.- Efecto de GSK126 en la viabilidad celular de los clones control y silenciados de LNCaP, Abl y 22Rv1. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y a los dos días se trataron con dosis crecientes del fármaco (1, 5, 10, 15 y 20 μM) durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se

llevó a cabo el ensayo de viabilidad por MTT tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, utilizando células sin tratamiento como control. Los datos son el resultado de la media \pm SD de 3 experimentos realizados por quintuplicado.

Como hemos indicado previamente, también quisimos determinar si el silenciamiento de SHP-1 modificaba la actividad transcripcional de AR en las líneas celulares estudiadas. Por ello analizamos si dicho silenciamiento producía cambios o no en la expresión de dos genes regulados por AR, PSA y FKBP5. Previamente, se compararon los niveles de expresión de dichos genes en las tres líneas celulares. Como se aprecia en la Figura 6A, los niveles de PSA son drásticamente inferiores en Abl y 22Rv1 en comparación con LNCaP, confirmando de esta manera la idoneidad de estas células como modelos de CRPC. Los niveles de FKBP5 también disminuyen en las células Abl, no así en las 22Rv1 a pesar de que ambas son modelos de CRPC. Esto podría deberse a la expresión de la variante AR-V7 por parte de 22Rv1, que carece de dominio de unión al ligando y que promueve una alteración en el patrón de expresión del CP [20].

En cuanto a los cambios observados como consecuencia del silenciamiento de SHP-1, se aprecia una disminución del 36,76% de FKBP5 en LNCaP sin cambios en PSA (Figura 6B). Por otro lado, en 22Rv1 encontramos una disminución del 62,34% de PSA sin cambios en FKBP5 (Figura 6D). Por último, en Abl no se observan cambios en ninguno de los genes analizados (Figura 6C). Los bajos niveles de expresión de estos genes en Abl y 22Rv1 requiere un mayor número de experimentos para sacar conclusiones sobre el papel desempeñado por SHP-1 como regulador de la actividad transcripcional de AR. Aun así, estos resultados preliminares son prometedores.

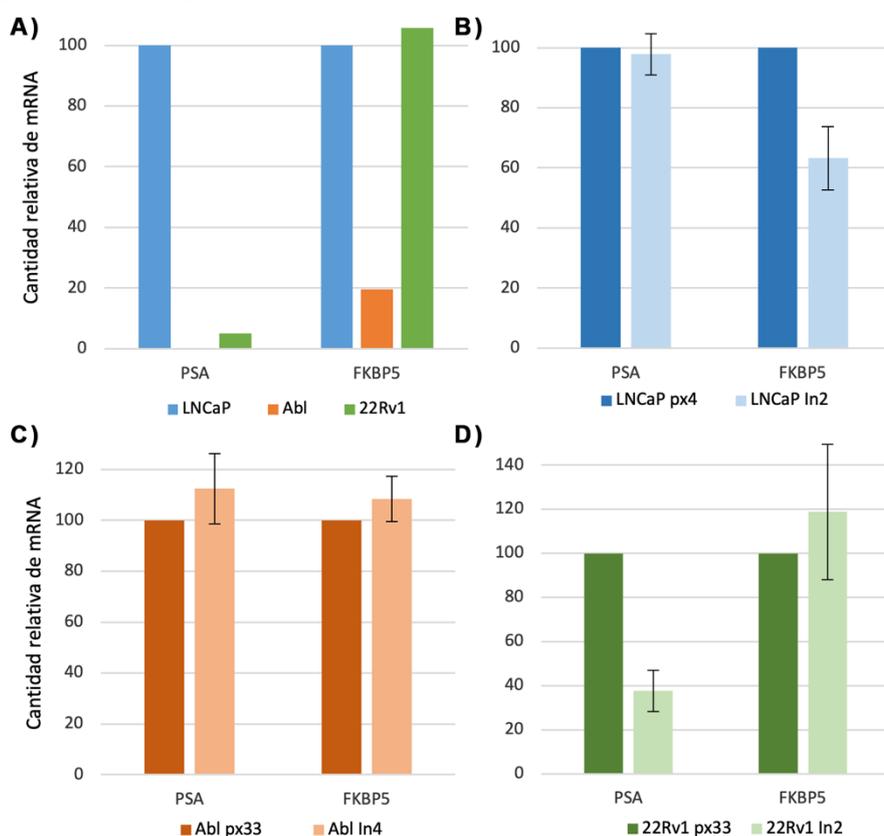
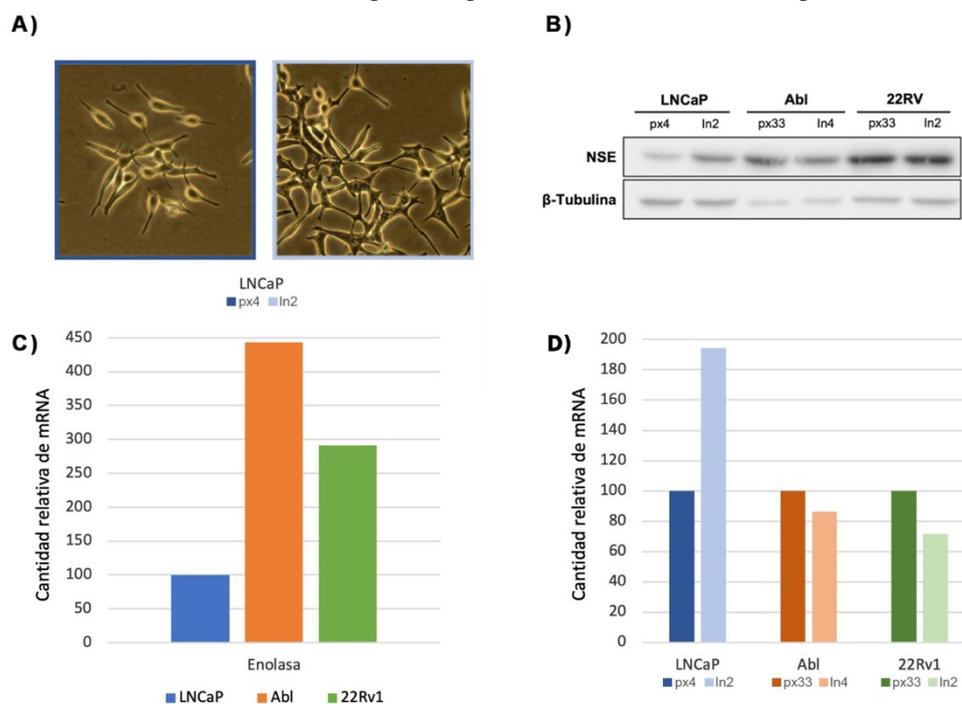


Figura 6.- Efecto del silenciamiento de SHP-1 en la expresión de genes bajo el control de AR. A) Comparación de los niveles de expresión en LNCaP, Abl y 22Rv1; B-D) Comparación de los niveles de expresión de PSA y FKBP5 entre el control y silenciamiento de las líneas celulares LNCaP, Abl y 22Rv1 respectivamente. Los datos son el resultado de la media \pm SD de 2 experimentos.

Hasta el momento, los resultados obtenidos apuntaban a una clara diferencia en la respuesta al silenciamiento entre LNCaP y los modelos de CRPC, tanto en la sensibilidad a la inhibición de EZH2 como en la expresión de genes regulados por AR. Sin embargo, estos no fueron los únicos parámetros que desmarcaron a LNCaP de Abl y 22Rv1. La observación al microscopio de los clones seleccionados evidenció un cambio fenotípico en LNCaP tras el silenciamiento de SHP-1 en comparación con su control. Estas presentaban cuerpos celulares menos refringentes, más alargados y con múltiples prolongaciones (Figura 7A). Estos cambios apuntaban a una diferenciación neuroendocrina, que pudo también evidenciarse por un aumento tanto en los niveles proteicos (Figura 7B) como en la cantidad de mRNA (Figura 7D) de la enolasa neuroespecífica (NSE), marcador específico de diferenciación neuroendocrina en células cancerígenas prostáticas.

Este descubrimiento es particularmente interesante, pues la adquisición de características neuroendocrinas por parte de las células prostáticas es uno de los mecanismos implicados en la progresión hacia fases más agresivas de CRPC e implica la pérdida o disminución de la expresión de AR y la liberación de neuropéptidos que pueden estimular la proliferación celular localmente [21]. De hecho, los niveles de expresión de la enolasa en Abl y 22Rv1, ambos modelos de CRPC, fueron superiores a los encontrados en LNCaP (Figura 7C). Es cierto que en Abl y 22Rv1 no se observaron cambios fenotípicos al anular SHP-1, pero el aumento en la expresión de NSE por parte de estas líneas celulares puede ser un indicador de su progresión a una fase CRPC más avanzada. Además, otros autores han constatado previamente que las células LNCaP son capaces de adquirir características neuroendocrinas como consecuencia del silenciamiento de AR, hecho también comprobado por un aumento en los niveles proteicos de NSE [22].



Por tanto, poniendo en contexto esta evidencia, nuestros resultados podrían indicar que el silenciamiento de SHP-1 conllevaría una serie de modificaciones similares al silenciamiento de AR en LNCaP y por tanto nos estaría ayudando a dilucidar de manera preliminar que SHP-1 podría estar regulando la señalización de AR.

Figura 7.- Efecto del silenciamiento de SHP-1 en la diferenciación neuroendocrina. A) Imagen al microscopio de LNCaP px4 e In2; B) Comparación de los niveles proteicos de NSE entre el control y silenciamiento de las líneas celulares; C) Comparación de los niveles de expresión de NSE en las líneas celulares; D) Comparación de los niveles de expresión de NSE entre el control y silenciamiento de las líneas celulares.

El conjunto de los resultados obtenidos muestra que SHP-1 es necesaria para mejorar la eficacia del inhibidor de EZH2, GSK126 y está implicada en la actividad transcripcional de AR. Sin embargo, estos efectos solo son visibles en células sensibles a andrógenos no así en modelos de CRPC. Son necesarios nuevos estudios que permitan conocer en detalle los mecanismos por los que SHP-1 regula la actividad de EZH2 en CP sensible a andrógenos, pero sobre todo porque este efecto desaparece en la progresión a CRPC. Esto ayudará a mejorar la eficacia de las prometedoras estrategias terapéuticas que se están ensayando para el tratamiento del CRPC y que combinan antiandrógenos con GSK126.

Conclusiones

Durante el presente trabajo hemos determinado que los modelos de CRPC Abl y 22Rv1 son más sensibles a la inhibición de EZH2 que LNCaP, y que la disminución de la viabilidad producida por GSK126 se debe a un aumento de la apoptosis. El silenciamiento estable de SHP-1 ha puesto de manifiesto una serie de modificaciones en LNCaP no observadas en los modelos de CRPC, entre las que encontramos una menor efectividad de GSK126, una disminución en la expresión del gen regulado por AR, FKBP5, y por último la adquisición de un fenotipo neuroendocrino, característico de las fases más avanzadas de CRPC.

Referencias

1. Crawford, E.D. 2003. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*, 62(6, Supplement 1): 3-12.
2. Heinlein, C.A. and Chang, C. 2004. Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine reviews*, 25(2): 276-308.

3. Trewartha, D. and Carter, K. 2013. Advances in prostate cancer treatment. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(11): 823-824.
4. Litwin, M.S. and Tan, H. 2017. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 317(24): 2532-2542.
5. Huang, Y., Jiang, X., Liang, X., and Jiang, G. 2018. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncology Letters*, 15(5): 6063-6076.
6. Ngollo, M., Lebert, A., Dagdemir, A., Judes, G., Karsli-Ceppioglu, S., Daures, M., Kemeny, J., Penault Llorca, F., Boiteux, J., Bignon, Y., Guy, L. and Bernard- Gallon, D. 2014. The association between Histone 3 Lysine 27 Trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer: relationship with clinicopathological parameters. *BMC cancer*, 14(1): 994.
7. Yen, C., Huang, H., Shu, C., Hou, M., Yuan, S.F., Wang, H., Chang, Y., Farooqi, A.A., Tang, J. and Chang, H. 2016. DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers. *Cancer Letters*, 373(2): 185-192.
8. Yoo, K.H. and Hennighausen, L. 2011. EZH2 Methyltransferase and H3K27 Methylation in Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 8(1): 59-65.
9. Kim, K.H. and Roberts, C.W.M. 2016. Targeting EZH2 in cancer. *Nature Medicine*, 22(2): 128-134.
10. Xu, K., Wu, Z.J., Groner, A.C., He, H.H., Cai, C., Lis, R.T., Wu, X., Stack, E.C., Loda, M., Liu, T., Xu, H., Cato, L., Thornton, J.E., Gregory, R.I., Morrissey, C., Vessella, R.L., Montironi, R., Magi-Galluzzi, C., Kantoff, P.W., Balk, S.P., Liu, X.S. and Brown, M. 2012. EZH2 Oncogenic Activity in Castration Resistant Prostate Cancer Cells is Polycomb-Independent. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6113): 1465-1469.
11. Cavalli, G. 2012. EZH2 Goes Solo. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 338(6113):1430-1431.
12. O'Meara, M.M. and Simon, J.A. 2012. Inner workings and regulatory inputs that control Polycomb repressive complex 2. *Chromosoma*, 121(3): 221-234.
13. Evren, S., Wan, S., Ma, X., Fahim, S., Mody, N., Sakac, D., Jin, T. and Branch, D.R. 2013. Characterization of SHP-1 protein tyrosine phosphatase transcripts, protein isoforms and phosphatase activity in epithelial cancer cells. *Genomics*, 102(5-6): 491-499.
14. Tsui, F.W.L., Martin, A., Wang, J. and Tsui, H.W. 2006. Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1. *Immunologic Research*, 35(1-2): 127-136.
15. Rodríguez-Ubreva, F.J., Cariaga, A.E., Cortes, M.A., Romero de Pablos, M., Ropero, S., Lopez-Ruiz, P. and Colas, B. 2010. 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.
16. 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.
17. López-Ruiz, P., Rodríguez-Ubreva, J., Cariaga, A.E., Cortes, M.A. and Colás, B. 2011. SHP-1 in Cell-Cycle Regulation. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 11(1): 89-98.
18. Ciccacese, C., Santoni, M., Brunelli, M., Buti, S., Modena, A., Nabissi, M., Artibani, W., Martignoni, G., Montironi, R., Tortora, G. and Massari, F. 2016. AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection? *Cancer Treatment Reviews*, 43: 27-35.
19. Kim, K.H. and Roberts, C.W.M. 2016. Targeting EZH2 in cancer. *Nature Medicine*, 22(2): 128-134.
20. Cato, L., de Tribolet-Hardy, J., Lee, I., Rottenberg, J.T., Coleman, I., Melchers, D., Houtman, R., Xiao, T., Li, W., Uo, T., Sun, S., Kuznik, N.C., Göppert, B., Ozgun, F., van Royen, M.E., Houtsmuller, A.B., Vadhi, R., Rao, P.K., Li, L., Balk, S.P., Den, R.B., Trock, B.J., Karnes, R.J., Jenkins, R.B., Klein, E.A., Davicioni, E., Gruhl, F.J., Long, H.W., Liu, X.S., Cato, A.C.B., Lack, N.A., Nelson, P.S., Plymate, S.R., Groner, A.C. and Brown, M. 2019. ARv7 Represses Tumor-Suppressor Genes in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer cell*, 35(3):401-413.
21. Aggarwal, R.R., Feng, F.Y. and Small, E.J. 2017. Emerging Categories of Disease in Advanced Prostate Cancer and Their Therapeutic Implications. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 31(6): 467-474.

22. Wright, M.E., Tsai, M. and Aebersold, R. 2003. Androgen Receptor Represses the Neuroendocrine Transdifferentiation Process in Prostate Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 17(9): 1726-1737.