



SEVILLA, SEPTIEMBRE DE 2015

PAPEL DE PTPL1 Y PTTG1 EN LA PROGRESIÓN
TUMORAL Y LA APOPTOSIS INDUCIDA POR
QUIMIOTERAPIA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

CAROLINA CASTILLA RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Carmen y Miguel, por el apoyo en todos estos años difíciles pero también productivos.

A mi tutor Paco Ramos, por facilitarme todos los trámites.

A Paco Romero y María Tortolero por lo bien que me habéis tratado siempre, por tener siempre un rato para mí, por facilitarme todos los reactivos que he necesitado, por todas las conversaciones que hemos tenido, por tener esa pasión por la ciencia. Y también a la gente que ha trabajado con vosotros, Ana, Cristina y en especial a Mar, Joaquín y Servando, que también se ha portado siempre genial (creo que eso emana de vuestro laboratorio, junto con la buena ciencia). Muchas gracias de verdad.

A todos los compañeros (y más que compañeros) con los que he trabajado en el laboratorio a lo largo del tiempo y en especial a David Ch., por estar ahí en todos los buenos y malos momentos, por hacer que los malos sean más llevaderos, por las tardes tan buenas que hemos pasado a pesar de las inmundas complicadas y últimamente por toda la ayuda con las valoraciones y los cafés con zumo; Marieta, por las charlas entre experimentos; M Luz, por ser tan buenísima compañera, por estar ahí en los momentos de todo tipo que hemos pasado estos años; M Ángeles Poveda, por ayudarme siempre, a cualquier hora, por tarde que fuese, por cansada que estuviera, por todo ese trabajo que hacía que yo pudiera entrar en cultivo con todo preparado, por ser tan incondicional y tan entrañable.

A mis compañeras del laboratorio de Inmunohistoquímica M Carmen Pérez, M Ángeles Prieto y en especial a Lolai, por todos los años que hemos pasado compartiendo tanto tiempo, espacio y momentos.

A toda la gente de AP, y en especial a David C., Lourdes, M Ángeles López, Begoña, Juanjo, Eloy, David M., M del Mar, Dolores, Ana Galera, Reyes, Rocío, Teresa, por estar ahí a lo largo de estos años, y seguir estando, para echarme una mano en cualquier momento.

A mis compañeros del laboratorio de Molecular, Michele, Jose, Ana, Ángela, por el apoyo y la ayuda, y en especial a Fer, por aguantar estoicamente conversaciones sobre

paclitaxel o sustancias similares y por todos los buenos momentos que pasamos y seguimos pasando juntos.

A mis amigos Carmen, Marta, Pilar y en especial Concheta; Joaquín, Elena N., Carla, Jose Luis, María, Vicky, Emilio, Patri, Pablo, Javi, Marta, Manuel, Migue, Isa, Elena D. y en especial Sara y Carlos, por el ánimo expandido a lo largo de los años por las conversaciones sobre ciencia en bares con esquemas en servilletas o en lo que hubiera, por aportarme siempre cosas buenas.

A mis padres, a mi hermana, a mi abuela y a mis tíos, por estar siempre ahí para lo que sea, por el apoyo de todo tipo y siempre incondicional.

Y a todos también por todo lo demás, por lo que no se puede enumerar ni medir. Es un honor y una suerte teneros conmigo. GRACIAS.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Akt: “Ak” en Akt es el nombre de clasificación de una cepa de ratones que desarrollaron espontáneamente timomas. La “t” procede de timoma.

Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1): Factor activador de proteasas apoptóticas-1

APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome): Complejo promotor de la anaphase/ciclosoma

Bad: Bcl-2 antagonist of cell death

Bak: Bcl-2 antagonist killer 1

Bax: Bcl-2-associated x protein

Bcl-x_L: B-cell lymphoma extra large

Bcl-w: Bcl-2-like-2

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor): Factor de crecimiento fibroblástico básico

Bfk: Bcl-2 family kin

Bfl-1/A1 o Bcl2A1: Bcl-2 related protein A1

Bcl-g_L o Bcl2L14: Apoptosis facilitator Bcl-2-like protein 14

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bid: Bcl-2 interacting domain death agonist

Bik: Bcl-2 interacting killer

Bim: Bcl-2 interacting mediator of cell death

Bmf: Bcl-2 modifying factor

BubR1: Budding uninhibited by benzimidazoles R1

Bub1: Budding uninhibited by benzimidazoles 1

Bub3: Budding uninhibited by benzimidazoles 3

CARD (Caspase Recruitment Domain): Dominio de reclutamiento de caspasas

Cdc20: Cell-division cycle 20

Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1): Quinasa dependiente de ciclina 1

Dapi (4',6-diamidino-2-phenylindole): 4',6-diamidino-2-fenilindol

D-box (Destruction box): Caja de destrucción

DD (Death Domain): Dominio de muerte

DED (Death Effector Domain): Dominio efector de muerte

DISC (Death-Inducing Signaling Complex): Complejo señalizador de inducción de muerte

Dominio FERM (Four point one/Ezrin/Radixin/Moesin): Banda cuatro punto uno/Ezrina/Radixina/Moesina

Dominio KIND (Kinase non-catalytic C-lobe): Dominio no catalítico homólogo a los dominios quinasa

Dominio PDZ (PSD-95/*Drosophila* discs large/Zonula occludens): Proteína de densidad postsináptica-95/*Drosophila* disco grande/Zonula occludens

Dominio SH3(Src Homology 3): Dominio con homología al dominio 3 de Src

ECM (Extracellular matrix): Matriz extracelular

EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid): Ácido etilendiaminotetraacético

EGF (Epidermal Growth Factor): Factor de crecimiento epidérmico

ErbB2:Erythroblastic leukemia oncogene homolog 2

ESEFT (Ewing's Sarcoma Family of Tumors): Familia de tumores del sarcoma de Ewing

FADD (Fas-Associated Death Domain): Dominio de muerte asociado a Fas

Fas (Apoptosis stimulating fragment): Fragmento estimulador de la apoptosis

FasL: Fas ligando

FITC (Fluorescein isothiocyanate): Isotiocianato de fluoresceína

FLICE (FADD-Like Interleukin-1 β -Converting Enzyme): Enzima convertidora de interleucina 1 β similar a FADD

FLIP_{LS}(FLICE Inhibitory Protein _{Long/Short}): Proteína inhibidora de FLICE _{Larga /Corta}

FOXO:Forkhead box O

Hrk: Harakiri

HPV16 (Human Papilloma Virus 16): Virus del papiloma humano 16

IAP (Inhibitor of Apoptosis): Inhibidor de la apoptosis

I κ B α (Inhibitor of kappa B alpha/nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha): Inhibidor de kappa B alfa

IGF-IR (Insulin-like Growth Factor Receptor type 1): Receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1

IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1): Sustrato 1 del receptor de insulina

KEN-box: Caja KEN (lisina, ácido glutámico, asparagina)

LEF (Lymphoid enhancer factor): Factor potenciador linfoide

Mad1:Mitotic arrest deficient 1

Mad2:Mitotic arrest deficient 2

Mcl-1_L:Myeloid cell leukemia sequence 1 large

MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization): Permeabilización de la membrana mitocondrial externa

NF- κ B (Nuclear Factor kappa B/nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): Factor nuclear kappa B

NGF (Nerve Growth Factor): Factor de crecimiento nervioso

Noxa: daño en latín

PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor type-1): Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1

PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase): Poli (ADP-ribosa) polimerasa

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen): Antígeno nuclear de células proliferativas

PEITC (Phenyl-ethyl isothiocyanate): Fenil-etil isotiocianato

PET (Polyethylene terephthalate): Tereftalato de polietileno

PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase): Fosfatidilinositol 3 quinasa

Pik-1 (Polo-like kinase-1): Quinasa similar a Polo

PTPL1 (Protein Tyrosine Phosphatase L1): Proteína tirosina fosfatasa L1

PTTG1 (Pituitary tumor transforming gene): Gen transformante de tumores pituitarios

p75^{NTR} (p75 neurotrophin receptor): Receptor de neurotrofinas p75

PSA (Prostatic Specific Antigen): Antígeno prostático específico

Puma: p53 up-regulated modulator of apoptosis

RA: Receptor androgénico

RPL13A (Ribosomal Protein L13A): Proteína ribosómica L13A

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

SAC (Spindle Assembly Checkpoint): Punto de control de ensamblaje del huso

Scc: Sister chromatid cohesion protein

siRNA (Small interfering RNA): RNA de interferencia pequeño

Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low PI): Segundo activador de caspasas derivado de la mitochondria / Proteína de unión directa a IAP con bajo PI

Smc: Structural Maintenance of Chromosomes

TCF (T-cell factor): Factor de células T

TNF (Tumoral Necrosis Factor): Factor de necrosis tumoral

tPA (tissue-type Plasminogen Activator): Activador del plasminógeno tipo tejido

TRAMP (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate): Adenocarcinoma transgénico de la próstata de ratón

TRPM2 (Transient Receptor Potential M2): Receptor de potencial transitorio M2

uPA (urokinase-type Plasminogen Activator): Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

uPAR (urokinase-type Plasminogen Activator Receptor): Receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa

Wnt (Wingless-related integration site): Sitio de integración relacionado con "Wingless"

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
1. GENERALIDADES SOBRE EL CÁNCER DE PRÓSTATA.....	10
2. APOPTOSIS.....	15
2.1. Ruta de receptores de muerte	
2.2. Vía mitocondrial	
2.2.1. Familia Bcl-2	
2.3 PEITC	
3. PTPL1.....	24
4. PTTG1, la securina humana.....	28
4.1 SAC y paclitaxel	
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	51
1. PAPEL DE PTPL1 EN APOPTOSIS.....	52
1.1. El PEITC sensibiliza a las células PC3 a la apoptosis inducida por anti-Fas	
1.2. El silenciamiento de PTPL1 produce una disminución de la sensibilidad apoptótica en células PC3	
1.3. PKC δ está implicada en la ruta de transducción de señales mediada/regulada por PTPL1	
1.4. La sobreexpresión PTPL1 o PKC δ potencia la inducción de apoptosis en células PC3	
1.5. El silenciamiento de PTPL1 y PKC δ induce resistencia a apoptosis en células LNCaP	

- 1.6. Expresión de PTPL1 y PKC δ en cánceres de próstata humanos

2. PAPEL DE PTPL1 EN INVASIÓN Y CICLO CELULAR.....70
 - 2.1. El silenciamiento de PTPL1 induce un fenotipo más invasivo en células PC3
 - 2.2. El silenciamiento de PTPL1 en células PC3 y DU145 induce un aumento de expresión de genes y proteínas relacionados con la invasión
 - 2.3. Las células PC3 silenciadas para PTPL1 muestran cambios en el perfil de ciclo celular
 - 2.4. El silenciamiento de PTPL1 produce una disminución de la apoptosis y el deslizamiento tras tratamiento con paclitaxel, en células PC3

3. PAPEL DE PTTG1 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PACLITAXEL Y SU RELACIÓN CON LA PARADA O DESLIZAMIENTO DEL CICLO CELULAR.....81
 - 3.1. Las células LNCaP tratadas con paclitaxel sufren apoptosis durante la mitosis, pero las células PC3, menos sensibles, mueren principalmente después de sufrir deslizamiento
 - 3.2. El silenciamiento de PTTG1 disminuye la apoptosis inducida por paclitaxel por inhibición del deslizamiento en células PC3
 - 3.3. El silenciamiento de PTTG1 dificulta la progresión de las células LNCaP a través del ciclo celular y disminuye su sensibilidad a la apoptosis inducida por paclitaxel
 - 3.4. La sobreexpresión de PTTG1 aumenta la parada en mitosis inducida por paclitaxel en células PC3 y LNCaP, con efectos opuestos sobre la apoptosis
 - 3.5. El silenciamiento simultáneo de PTTG1 y Mcl-1 tiene un efecto proapoptótico sobre las células PC3 durante la mitosis
 - 3.6. La línea celular PC3 resistente a paclitaxel (PC3 PTXR) muestra una disminución de la apoptosis asociada a un incremento de mitosis y niveles elevados de Mcl-1_L después del tratamiento con paclitaxel

DISCUSIÓN.....	96
CONCLUSIONES.....	112
REFERENCIAS.....	116
ANEXO.....	133

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES SOBRE EL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata es el segundo cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en hombres y el cuarto cáncer más común en general. Casi tres cuartas partes de los casos registrados se dan en países desarrollados, debido a que la detección del antígeno prostático específico (PSA) y la biopsia posterior están ampliamente extendidas en estos países. El cáncer de próstata es la quinta causa de muerte por cáncer en hombres (*Ferlay et al., 2013*).

El pronóstico y la elección de terapia para el cáncer de próstata se basan principalmente en tres parámetros que se obtienen al diagnóstico: nivel de PSA en sangre prequirúrgico, estadio clínico y puntuación de Gleason. El PSA es una proteasa de serina, que se produce en las secreciones normales de la próstata, pero se libera a la sangre como consecuencia de la disrupción de la arquitectura normal de la próstata. El estadio clínico se obtiene de parámetros del tumor primario, que puede estar confinado en el órgano o ser invasivo (T1-4), con o sin afectación de los ganglios linfáticos (N1 o 0), y por la presencia y el grado de metástasis a distancia (M0 o 1 a-c) (*Shen & Abate-Shen, 2010*).

El sistema de puntuación de Gleason, basado en la arquitectura microscópica del tumor, consiste en cinco patrones histológicos que sitúan a los cánceres en distintas categorías, según exhiban características que van desde bien diferenciados (patrón 1) a pobremente diferenciados (patrón 5) (*Gleason & Mellinger, 1974*).



Figura 1: Patrones histológicos del sistema de puntuación de Gleason. Adaptado de Gleason & Mellinger, 1974.

Se asigna un número del 1 al 5 al patrón más prevalente y un segundo número, también del 1 al 5, al segundo patrón más prevalente. La puntuación de Gleason, que es la suma de estos dos números, tiene un valor entre 2 y 10 (True *et al.*, 2006; Delahunt *et al.*, 2012).

El cáncer de próstata es una enfermedad heterogénea con diferente evolución y curso clínico. En sus estadios iniciales, cuando está confinado en la cápsula prostática (localizado), el carcinoma de próstata es esencialmente curable mediante intervención quirúrgica (prostatectomía radical) y/o radioterapia (externa o braquiterapia). De hecho, la mayor parte de los casos de carcinoma de próstata son relativamente indolentes y la mayoría de hombres diagnosticados con cáncer de próstata morirá por otras causas. Sin embargo, si no se detecta pronto o en las formas más agresivas de la enfermedad, el cáncer puede avanzar a estadios en los que se extiende fuera de los límites de la cápsula prostática (localmente avanzado), hacia las vesículas seminales, seguido de metástasis a hueso predominantemente. Esta transición a enfermedad metastásica está acompañada generalmente por un cambio de andrógeno-sensibilidad a andrógeno-

resistencia, a menudo provocado por la terapia de ablación androgénica (Uzgaré & Isaacs, 2005).

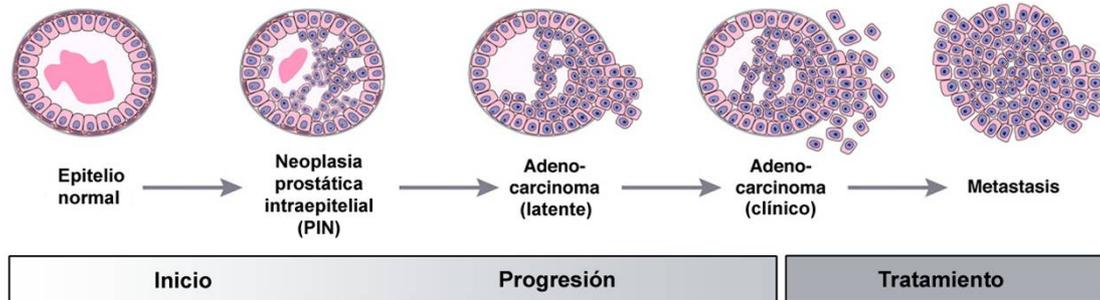


Figura 2: Ruta de progresión del cáncer de próstata humano. Adaptado de Shen & Abate-Shen, 2010.

Los andrógenos circulantes, mediante su interacción con el receptor androgénico (RA), son esenciales para el desarrollo normal de la próstata, así como en el inicio, crecimiento y respuesta a la terapia de ablación androgénica del cáncer de próstata. La dependencia hormonal del cáncer de próstata fue demostrada por Huggins & Hodges (1941), al observar que la retirada de andrógenos mediante castración quirúrgica o química conduce a la regresión del cáncer de próstata. Esta observación sentó las bases para el tratamiento de los cánceres de próstata localmente avanzados mediante ablación androgénica.

El andrógeno más abundante es la testosterona, que es sintetizada en los testículos y se convierte en el metabolito activo 5-dihidrotestosterona (DHT) en el tejido prostático, por la acción de la enzima 5 α -reductasa. Además, las glándulas adrenales sintetizan otros andrógenos minoritarios, como androstendiona y dehidroepiandrosterona, que también pueden convertirse en testosterona. La unión de DHT al RA activa al receptor, que junto a co-activadores y co-represores, regula la transcripción de genes con elementos de respuesta a andrógenos en sus promotores (Isaacs & Isaacs, 2004).

La terapia de ablación androgénica se puede realizar quirúrgicamente (orquiectomía) o bien químicamente, mediante la administración de análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas, con el fin de reducir los niveles de testosterona en sangre. Muy a menudo, esta terapia se combina con antiandrógenos esteroideos (acetato de ciproterona) o no esteroideos (flutamida o bicalutamida), para evitar la actividad transcripcional del RA; por ejemplo, en respuesta a andrógenos adrenales que no se eliminan mediante la castración (Culig *et al.*, 2002; Shen & Abate-Shen, 2010). El fallo en la terapia de ablación androgénica puede deberse a distintas causas. En relación con el RA, diversos estudios han demostrado que éste se expresa en tumores resistentes a castración y que la señalización mediada por el RA permanece intacta, como demuestra la expresión de uno de sus genes diana, PSA. Se ha observado que los cánceres de próstata presentan una variedad de alteraciones en el RA que no se encuentran en tumores no tratados mediante ablación androgénica o que se encuentran con una frecuencia menor. Estos cambios incluyen amplificación o mutaciones puntuales en el RA, así como cambios en la expresión de proteínas correguladoras del RA. Estos cambios producen un “súper RA” que puede responder a concentraciones bajas de andrógenos o a una variedad más amplia de ligandos agonistas. También se van acumulando evidencias que indican que el RA se puede activar de forma independiente de ligando por compuestos como factores de crecimiento o citoquinas, independientemente o en combinación. Estos factores de crecimiento, a través de rutas mediadas por receptores tirosina quinasa, pueden promover la activación del RA y el crecimiento en entornos con bajos niveles de andrógenos (Taplin & Balk, 2004; Shen & Abate-Shen, 2010).

Otra causa del fallo de la terapia de ablación androgénica la constituye el desarrollo de mecanismos de resistencia a apoptosis. Algunas de las proteínas implicadas en ellos son las siguientes:

NF- κ B: NF- κ B regula la susceptibilidad apoptótica en varios tipos celulares mediante el control que ejerce, a nivel transcripcional, sobre distintos genes antiapoptóticos,

como Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1/A1, XIAP, c-IAP1, c-IAP2, etc. La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas controlada por los miembros de la familia NF- κ B se considera un elemento clave en la resistencia a drogas de una amplia variedad de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de próstata. La activación constitutiva de NF- κ B en células de cáncer de próstata independientes de andrógenos puede explicar que estas células sean marcadamente resistentes a agentes terapéuticos que inducen vías apoptóticas (Uzzo *et al.*, 2008).

Bcl-2 y Bcl-xL: Ambas proteínas son miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Bcl-2 se encuentra sobreexpresado en tumores hormonorrefractarios localmente avanzados o metastáticos (Colombel *et al.*, 1993). Bcl-xL también se encuentra sobreexpresado en tumores con alta puntuación de Gleason y su expresión elevada se asocia, de manera estadísticamente significativa, con un inicio más temprano de la enfermedad hormonorrefractaria (Castilla *et al.*, 2006).

Caspasas: Las caspasas constituyen una familia de proteasas esenciales en el proceso apoptótico. En este sentido, se ha descrito que los niveles de expresión de las caspasas 1 y 3 se encuentran disminuidos en muestras de pacientes con cáncer de próstata, comparado con la próstata normal (Winter *et al.*, 2001).

La terapia de ablación androgénica continua siendo el tratamiento más ampliamente extendido para el cáncer de próstata localmente avanzado, y aunque es inicialmente efectivo ya que induce eficientemente la regresión tumoral (Santen, 1992), este tratamiento no elimina el tumor completamente y después de un periodo variable de tiempo (9-30 meses) la terapia fracasa, lo que conduce a un estado letal resistente a drogas llamado enfermedad hormonorrefractaria (Uzgare & Isaacs, 2005). La ablación androgénica reduce el crecimiento tumoral por disminución de la proliferación celular y la inducción de apoptosis. La progresión de cánceres localizados hormonodependientes a enfermedad metastásica hormonorrefractaria también está asociada a la

desregulación del ciclo celular y de los mecanismos apoptóticos normales (Bruckheimer & Kyprianou, 2000; Abate-Shen & Shen, 2000; Shen & Abate-Shen, 2010). En la enfermedad hormonorrefractaria, otras estrategias antitumorales convencionales son también pobremente efectivas, por lo que es necesario el desarrollo de regímenes terapéuticos más eficaces para la enfermedad avanzada. Además, los mecanismos responsables de la resistencia a la apoptosis inducida por quimioterapia de las células hormonorrefractarias no se conocen todavía completamente. Un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de la muerte celular en respuesta a las estrategias terapéuticas puede ayudar a evitar regímenes de tratamiento inefectivos y puede proporcionar las bases moleculares para nuevas modalidades terapéuticas dirigidas a las formas resistentes a apoptosis del cáncer de próstata.

2. APOPTOSIS

Los organismos metazoos han desarrollado un mecanismo de suicidio celular llamado apoptosis¹ para eliminar células redundantes, dañadas o infectadas (Kerr *et al.*, 1972). Este programa genético es vital para el desarrollo normal y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Por tanto, su desregulación está implicada en numerosas condiciones patológicas, desde desórdenes degenerativos hasta autoinmunidad y cáncer (Adams, 2003).

El significado terapéutico de la apoptosis en el tratamiento del cáncer de próstata surge de evidencias que demuestran que, al igual que las células epiteliales de la próstata normal, las células tumorales de cánceres andrógeno-dependientes sufren apoptosis en respuesta a la ablación androgénica. Las drogas quimioterapéuticas o la radiación ionizante pueden activar una ruta apoptótica similar de destrucción celular en

¹La palabra apoptosis (ἀπόπτωση) procede del griego y se usa para describir la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles (Kerr *et al.*, 1972).

células tumorales de próstata andrógeno-independientes. Por tanto, el perfil apoptótico de las células tumorales prostáticas constituye una característica importante de la patología del tumor, que puede influir en el pronóstico, la respuesta terapéutica y la progresión de la enfermedad (Bruckheimer & Kyprianou, 2000).

Las ejecutoras principales del proceso apoptótico, responsables de la destrucción de la célula, son un grupo de cisteína proteasas, las caspasas. Todas las caspasas conocidas tienen una cisteína en el sitio activo y cortan después de ciertos residuos de aspartato. Se han identificado alrededor de una docena de caspasas en humanos y varios cientos de sustratos. Considerando su función, las caspasas humanas se pueden clasificar en dos grupos. Las caspasas 1, 4 y 5 pertenecen al grupo I (caspasas inflamatorias) y están implicadas en la maduración de citoquinas. La apoptosis está regulada por las caspasas del grupo II, que, a su vez, se dividen en dos clases: las caspasas iniciadoras o apicales (caspasas 2, 8, 9 y 10) y las efectoras o ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) (Olsson & Zhivotovsky, 2011). Se expresan en la mayoría de tipos celulares y se sintetizan como zimógenos para evitar una activación inadecuada.

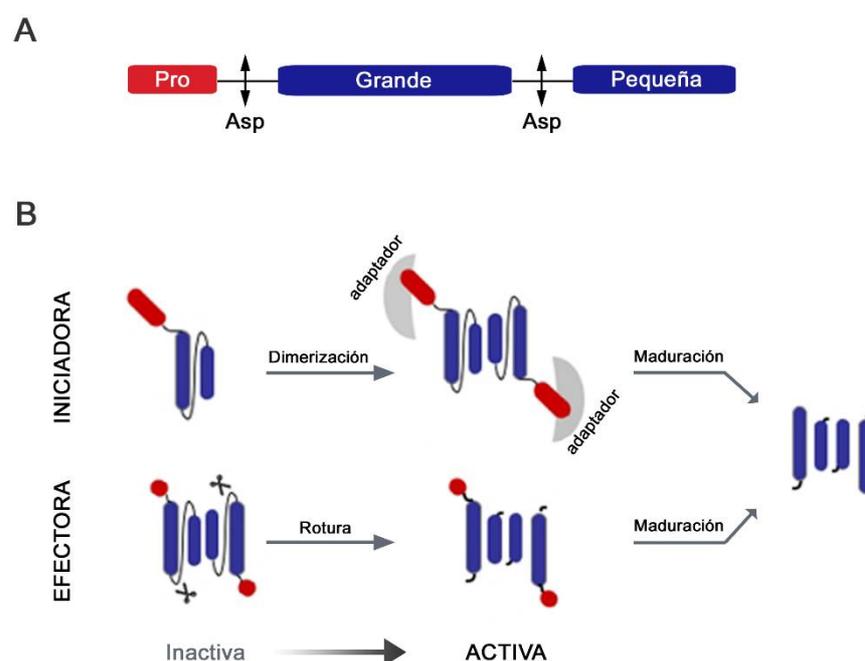


Figura 3: Organización de las caspasas. (A) Un prodominio precede al dominio catalítico, formado por dos subunidades unidas covalentemente. Se indican los sitios de (auto)proteolisis en residuos de aspartato (Asp) (B) Mecanismos de activación. Las caspasas iniciadoras son monómeros que se activan por dimerización mediada por el prodominio. Las caspasas ejecutoras son dímeros que se activan por la rotura de las uniones intersubunidad. Después de la activación, las caspasas maduran a formas más estables mediante eventos proteolíticos adicionales sujetos a regulación. Adaptado de Pop & Salvesen, 2009.

En la mayoría de los casos, la acción de las caspasas produce la inactivación de la proteína diana, pero también pueden activar proteínas directamente, cortando un dominio regulador negativo o indirectamente, inactivando una subunidad reguladora. Antes de que las caspasas ejecutoras puedan cortar sus sustratos celulares, sus zimógenos tienen que ser cortados proteolíticamente por caspasas iniciadoras (Adams, 2003; Hengartner, 2000).

Se han descrito dos vías principales de activación de caspasas en células de mamífero: la ruta de receptores de muerte y la ruta mitocondrial.

2.1. Ruta de receptores de muerte

Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), y se caracterizan por tener dominios extracelulares ricos en cisteína similares. Los receptores de muerte contienen además un dominio citoplásmico homólogo, rico en cisteína, de alrededor de 80 aminoácidos, llamado dominio de muerte (DD). Típicamente, los dominios de muerte median la transmisión de la señal entre los receptores de muerte y la maquinaria apoptótica de la célula. Algunas moléculas que transmiten señales de los receptores de muerte también contienen dominios de muerte. Se han identificado ocho receptores de muerte; se activan por la unión de sus ligandos correspondientes o de anticuerpos agonistas. Los ligandos, con la excepción de NGF, son moléculas estructuralmente relacionadas que pertenecen también a la superfamilia TNF (Ashkenazi & Dixit, 1998; Mahmood & Shukla, 2010).

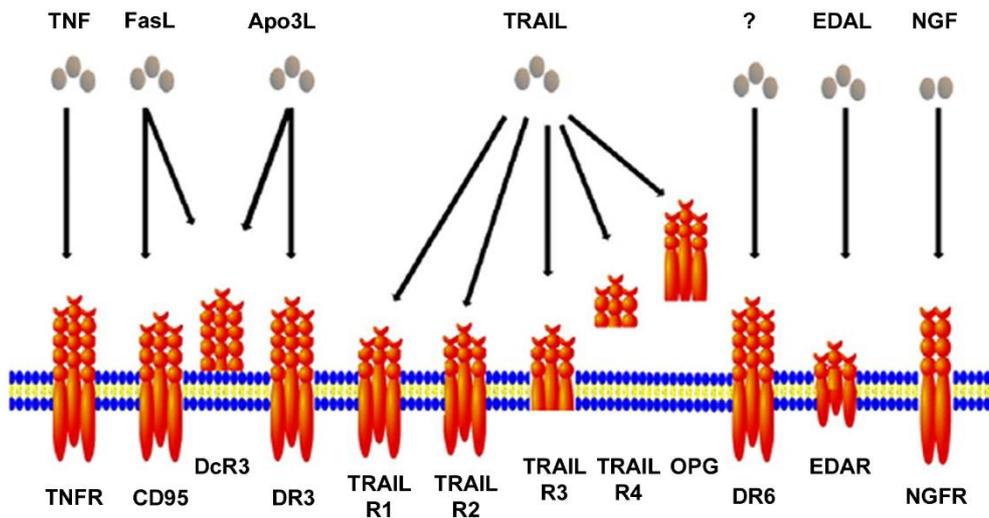


Figura 4: Receptores de muerte y sus ligandos. Los miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral poseen diversas estructuras primarias, pero todos contienen subdominios extracelulares ricos en cisteína que constituyen una característica estructural única para cada miembro individual, que les permite reconocer a sus ligandos con especificidad y exclusividad. Mahmood & Shukla, 2010.

Uno de los mejor caracterizados es Fas (también llamado CD95 o Apo1). Se identificó en 1989 como diana para anticuerpos que inducen apoptosis en células tumorales (Trauth *et al.*, 1989). Fas es un receptor transmembrana de tipo I que se expresa en linfocitos activados, en distintos tejidos de origen linfoide y no linfoide, así como en células tumorales. El ligando de Fas, FasL, es biológicamente un homotrímero y la unión de un trímero de FasL a tres moléculas de Fas de la superficie celular induce apoptosis. La señal iniciada por Fas/FasL se transmite mediante un complejo de señalización denominado DISC (complejo señalizador de inducción de muerte) formado por la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas), dos isoformas de la procaspasa8 (procaspasa 8/a y 8/b), la procaspasa10 y la proteína FLIP_{LS} (proteína inhibidora de FLICE *larga/corta*). Como los dominios de muerte tienen tendencia a asociarse unos con otros, la ligación de Fas conduce a la agrupación de los dominios de muerte de los receptores. La proteína FADD se une entonces, a través de su propio dominio de muerte, a los dominios de muerte agrupados de los receptores. FADD también contiene un dominio efector de muerte (DED) que se une a un dominio análogo

repetido en tándem en los zimógenos de las procaspasas 8/a y 8/b. El dominio efector de muerte es un ejemplo específico de un dominio de interacción homofílico más global denominado CARD (dominio de reclutamiento de caspasas), que se encuentra en varias caspasas con prodominios grandes como las caspasas 2, 8, 9 y 10. Se cree que la activación de la caspasa 8 sigue un modelo de proximidad inducida, en el que una alta concentración local de procaspasa 8 en el DISC conduce a su activación autoproteolítica, un proceso que resulta en la formación de un heterotetrámero de caspasa 8 que es liberado al citosol para propagar la señal apoptótica. La procaspasa 10 también puede activarse en el DISC, formándose un heterotetrámero activo. Sin embargo existe controversia sobre si la caspasa 10 puede disparar la muerte celular en ausencia de la caspasa 8 (Ashkenazi & Dixit, 1998; Mahmood & Shukla, 2010).

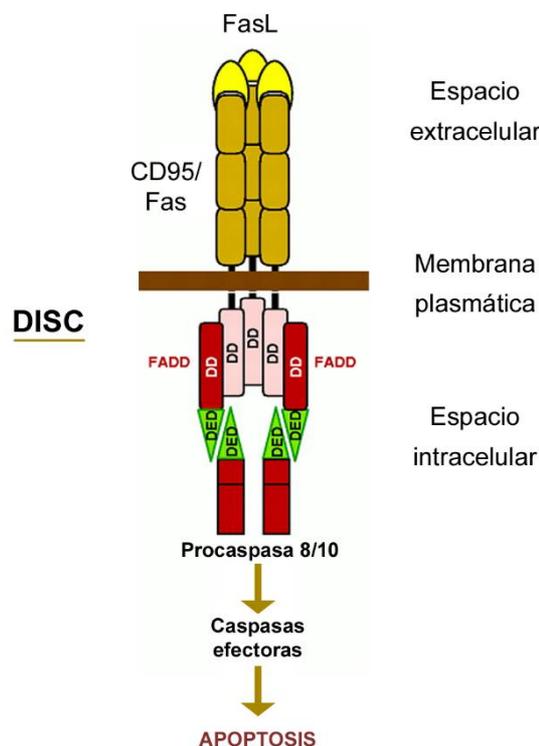


Figura 5: Señalización de la apoptosis mediada por el receptor Fas. DISC, complejo señalizador de inducción de muerte; DD, dominio de muerte; DED, dominio efector de muerte. Adaptado de Ashkenazi & Dixit, 1998.

2.2. Vía mitocondrial

La vía mitocondrial o vía intrínseca se activa por distintos tipos de estrés, que incluyen un aporte inadecuado de citoquinas y diversos tipos de daños intracelulares. En una fase temprana de la apoptosis inducida por estrés, la membrana mitocondrial se permeabiliza, produciéndose la liberación de citocromo *c* y otras proteínas promotoras de muerte. Este proceso está controlado por las proteínas de la familia de Bcl-2.

La ruta intrínseca, típicamente, activa a la caspasa 9 por medio de la proteína adaptadora Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas). La permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) produce la liberación de citocromo *c* del espacio intermembrana mitocondrial al citosol. El citocromo *c* se une a Apaf-1, produciéndole un cambio conformacional que le permite reclutar a la procaspasa 9. El complejo resultante, denominado apoptosoma, promueve la activación de la caspasa 9, que activa a las caspasas ejecutoras 3 y 7, que a su vez median la rotura de diversos sustratos, como laminina o PARP (Adams, 2003; Chipuk *et al.*, 2010). La rotura de estos sustratos se usa habitualmente como marcador de apoptosis (Pop & Salvesen, 2009).

2.2.1. Familia Bcl-2

Las primeras evidencias del papel de la apoptosis en el desarrollo tumoral se obtuvieron de análisis citogenéticos en los que se observó una fuerte correlación entre la traslocación cromosómica t(14;18) y los linfomas de células B humanos (Tsujiimoto *et al.*, 1984). Esta traslocación coloca al gen *bcl-2*, bajo el control del potenciador del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, E μ . El gen *bcl-2* fue clonado posteriormente, y se realizaron estudios funcionales en líneas celulares dependientes de citoquinas, que mostraron que la expresión forzada de Bcl-2 inhibía la muerte inducida por privación de factores de crecimiento, pero no potenciaba su proliferación (Vaux *et al.*, 1988). Estos resultados mostraron que los mecanismos moleculares que controlan la supervivencia y la proliferación celular en respuesta a la estimulación por citoquinas debían ser distintos, y demostraron, por primera vez, que los defectos en

el control de la muerte celular podían causar cáncer. El descubrimiento de Bcl-2 estableció un nuevo paradigma en la biología del cáncer, que los defectos en apoptosis proporcionan a las células una ventaja selectiva para la supervivencia, que después, combinado con mutaciones que facilitan una proliferación no restringida (como, por ejemplo, una expresión desregulada de c-myc) pueden promover la transformación maligna (Kelly & Strasser, 2011).

La familia de proteínas Bcl-2 incluye miembros proapoptóticos y antiapoptóticos y se clasifican en tres grupos que comparten al menos uno de cuatro dominios de homología con Bcl-2 (BH1-4). Las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1 y Mcl-1_L) contienen los cuatro dominios BH y pueden estar en el citosol o integradas en la membrana mitocondrial externa o en la membrana del retículo endoplásmico. Estas proteínas preservan la integridad de la membrana mitocondrial externa inhibiendo directamente a las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2. Las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 se dividen en proteínas efectoras y proteínas “sólo BH3” (BH3 only). Las proteínas efectoras Bax y Bak también contienen cuatro dominios BH. Cuando se activan, Bax y Bak homo-oligomerizan para formar poros proteolipídicos en la membrana mitocondrial externa para promover su permeabilización. Las proteínas “sólo BH3” se subdividen en base a su capacidad de interactuar con proteínas antiapoptóticas o con proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas efectoras. Las proteínas “sólo BH3” que únicamente se unen a proteínas antiapoptóticas se denominan sensibilizadoras o desrepresoras; a este grupo pertenecen Bad y Noxa. Bid y Bim interactúan con proteínas antiapoptóticas así como con proteínas proapoptóticas efectoras, y pueden inducir directamente la oligomerización de Bax y Bak y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Estas proteínas se denominan activadores directos (Chipuk *et al.*, 2010).

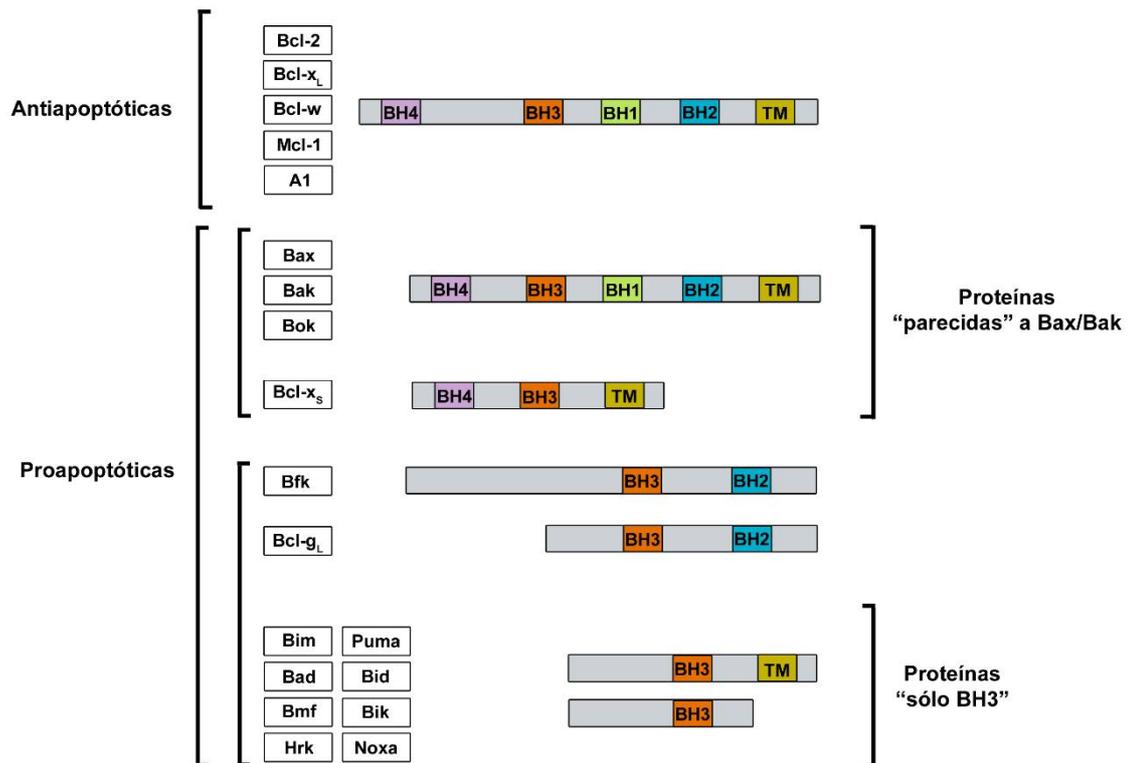


Figura 6: Familia de proteínas Bcl-2 de mamíferos. Los miembros de la familia Bcl-2 comparten regiones de homología llamadas dominios de homología con Bcl-2 (BH) y pueden presentar un dominio transmembrana (TM) que media la inserción en la membrana mitocondrial externa o el retículo endoplásmico. Las proteínas antiapoptóticas comparten cuatro dominios BH y una región TM. Las proteínas proapoptóticas se pueden subdividir en dos grupos: las proteínas multidominio BH y las proteínas "sólo BH3". Las proteínas multidominio BH contienen hasta cuatro dominios BH (y algunas también tienen una región TM) e incluyen Bax, Bak, Bok, Bcl-x_S, Bcl-g_L y Bfk. Las proteínas "sólo BH3" contienen sólo el dominio BH3, como indica su nombre. Algunas también contienen una región TM. Adaptado de Kelly & Strasser, 2011.

Según la señalización mediada por Fas, las células pueden clasificarse en tipo I y tipo II (Scaffidi *et al.*, 1998). En células tipo I, la unión de Fas ligando o anticuerpos agonistas al receptor Fas, induce unos altos niveles de formación de DISC y una gran cantidad de caspasa 8 activa, que conduce directamente a la activación de caspasas efectoras. La acción de estas caspasas es suficiente para ejecutar la apoptosis inducida por Fas, porque Bcl-2 no protege de la apoptosis inducida por Fas en este contexto. En las células tipo II, como las células de cáncer de próstata PC3 (Guseva *et al.*, 2002), hay niveles más bajos de formación de DISC y, por tanto, de caspasa 8 activa. En este caso,

la caspasa 8 activa corta a Bid para generar Bid truncado (tBid), con la subsiguiente liberación de citocromo *c* de la mitocondria mediada por tBid. Esto conduce a la formación del apoptosoma, seguido de la activación de la procaspasa 9, que a su vez activa a caspasas efectoras. En las células tipo II, la apoptosis inducida por Fas puede bloquearse por miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bcl-2 y Bcl-X_L (Mahmood & Shukla, 2010). Por tanto, dependiendo del tipo celular, la apoptosis mediada por Fas puede ser dependiente o independiente de la vía mitocondrial.

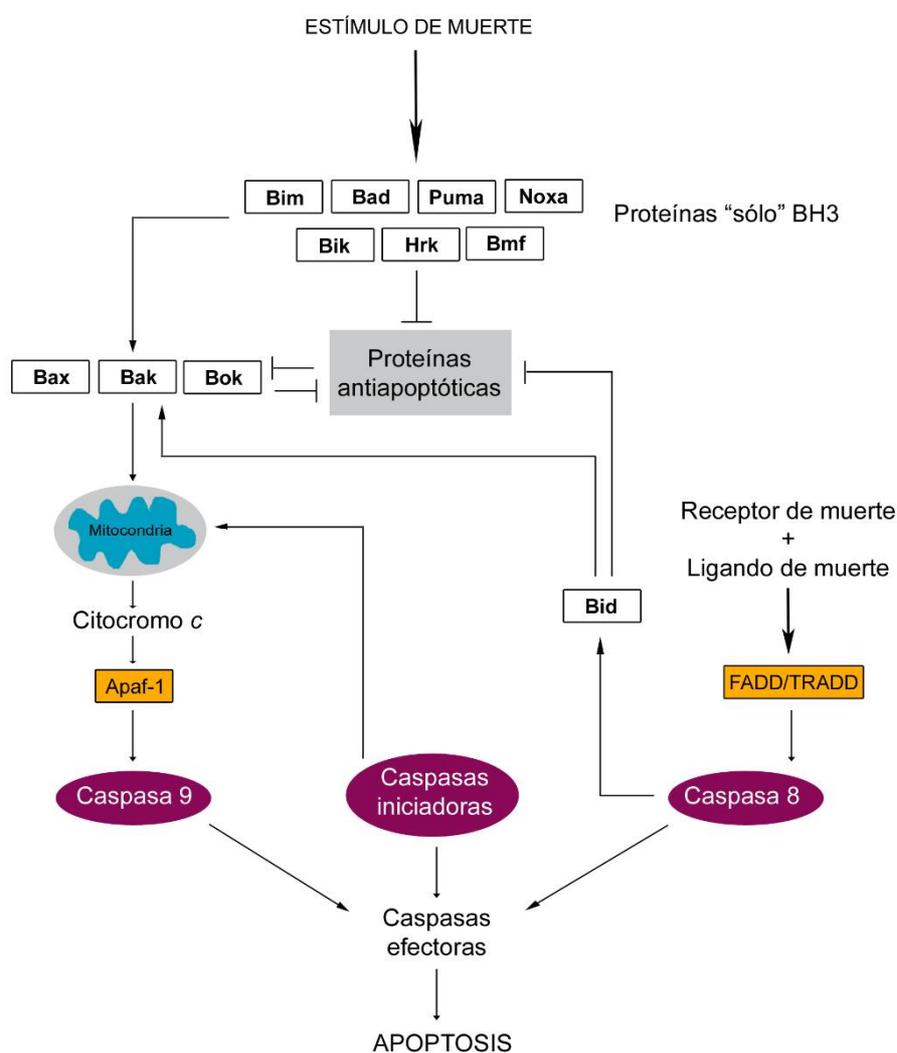


Figura 7: Los mamíferos poseen dos rutas distintas de apoptosis que pueden converger. La señalización vía receptores de muerte se indica a la derecha. La ruta de los receptores de muerte se activa mediante la estimulación de receptores de muerte extracelulares (como Fas) por sus ligandos de muerte (FasL). La proteína adaptadora FADD promueve el reclutamiento y la activación de la caspasa iniciadora, caspasa 8. La caspasa 8, a su vez, activa proteolíticamente a las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7). La activación proteolítica, mediada por la caspasa 8, de la proteína "sólo BH3" Bid, conecta la ruta de receptores de muerte con la ruta regulada por proteínas de la familia Bcl-2 y sirve para amplificar la cascada de apoptosis. Este mecanismo de amplificación es esencial para la apoptosis inducida por Fas en células

tipo II, pero es prescindible en células tipo I. La ruta intrínseca, regulada por proteínas de la familia Bcl-2, se indica a la izquierda y se activa en respuesta a un amplio rango de daños celulares, como la privación de factores de crecimiento o las drogas utilizadas en quimioterapia. Las proteínas proapoptóticas "sólo BH3" funcionan como sensores moleculares para iniciar la apoptosis en respuesta a estos daños celulares. Su capacidad para matar a las células depende de los miembros proapoptóticos multidominio BH de la familia Bcl-2 parecidos a Bax y Bak. Las proteínas "sólo BH3" activan a Bax y Bak de forma directa, o indirectamente liberándolas de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Independientemente del modo de activación, Bax/Bak activados producen la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, con la consiguiente liberación de factores apoptogénicos (como citocromo *c* o Smac/DIABLO). Junto con la proteína adaptadora Apaf-1, el citocromo *c* promueve la activación de la caspasa iniciadora, caspasa 9, lo que conduce a la activación de las caspasas efectoras y a la "demolición" celular. Adaptado de Kelly & Strasser, 2011.

2.3. Feniletil isotiocianato, PEITC

El feniletil isotiocianato (PEITC) es una sustancia presente en plantas crucíferas (Fahey *et al.*, 2001). Existen varios estudios que indican que puede inhibir el crecimiento de células tumorales de cáncer de próstata, inducir apoptosis y retardar el crecimiento de xenoinjertos de células tumorales de próstata *in vivo* (Xiao & Singh, 2002; Xiao *et al.*, 2004 y 2006). La inducción de apoptosis por PEITC se ha correlacionado con cambios en los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 en células PC3 y en líneas celulares derivadas de ratones TRAMP (transgenic adenocarcinoma mouse prostate) (Xiao *et al.*, 2004, 2005 y 2006). Concretamente, se ha demostrado que la expresión ectópica de Bcl-xL en células PC3 confiere protección parcial contra la apoptosis inducida por PEITC (Xiao *et al.*, 2006). También se ha propuesto que el PEITC inhibe la fosforilación de I κ B α y, por tanto, su degradación y la translocación al núcleo de la subunidad p65 de NF- κ B en células PC3 transfectadas establemente con una construcción NF- κ B-luciferasa (Xu *et al.*, 2005). En células de cáncer de vejiga T24, se ha demostrado que el PEITC sensibiliza a la apoptosis inducida por anti-Fas (Pullar *et al.*, 2004).

3. LA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA PTPL1

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales más importantes para regular la actividad, la capacidad de interacción y la localización

subcelular de las proteínas y, concretamente, la fosforilación de tirosinas se ha identificado como un regulador central de la transducción de señales en eucariotas superiores. La familia de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) se divide principalmente en dos subtipos: el subtipo “parecido” a receptor y el no receptor. La proteína tirosina fosfatasa L1 (también conocida como PTPN13, FAP-1, PTP-BAS o hPTP1E) es una proteína fosfatasa de tipo no receptor. PTPL1 contiene un dominio KIND (kinase non-catalytic C-lobe) amino terminal, un dominio FERM (Four point one/ezrin/radixin/moesin) importante en la conexión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, cinco dominios PDZ (PSD-95/*Drosophila* discs large/Zonula occludens) de interacción proteína-proteína y un dominio catalítico tirosina fosfatasa en su extremo carboxilo terminal (Erdmann, 2003).

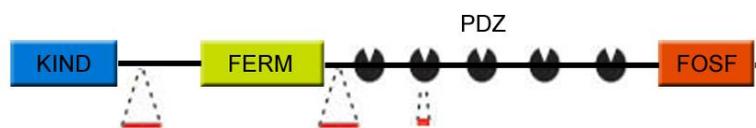


Figura 8: Estructura modular de PTPL1. La fosfatasa PTPL1 está formada por un dominio KIND amino terminal, seguido de un dominio FERM. El núcleo de la proteína comprende cinco dominios PDZ diferentes. El dominio tirosina fosfatasa (FOSF) se localiza en el extremo carboxilo. Las principales regiones de procesamiento alternativo se indican mediante líneas discontinuas y barras rojas. Adaptado de Erdmann, 2003.

Los datos disponibles indican que PTPL1 podría actuar como supresor o promotor tumoral. No existen evidencias directas de que PTPL1 sea un oncogén *per se*, pero podría estar implicado en la oncogénesis vía modulación del crecimiento celular y de las respuestas al estrés. PTPL1 es una diana transcripcional directa del oncogén ESEFT (familia de tumores del sarcoma de Ewing), EWS-FLI1. La interacción de PTPL1 con p75^{NTR} (receptor de neurotrofinas p75) o TRPM2 (receptor de potencial transitorio

M2) también puede facilitar la supervivencia de las células tumorales bajo condiciones de estrés (Erdmann, 2003; Abaan & Toretsky, 2008). En relación a su función como supresor tumoral, un estudio del fosfatoma de tirosinas en cánceres colorrectales ha identificado el gen *PTPN13* como una de las fosfatasa de tirosina mutadas con más frecuencia (Wang *et al.*, 2004). El promotor de *PTPL1* se encuentra hipermetilado, un mecanismo común de inactivación de genes supresores tumorales clásicos, en distintas líneas celulares de linfoma Hodgkin y no Hodgkin y carcinoma gástrico, mamario y hepatocelular (Ying *et al.*, 2006). Además, en tejidos de pacientes con carcinoma hepatocelular se ha detectado una disminución de la expresión de *PTPL1*, a nivel de RNA mensajero, en aproximadamente un 50% de los casos, debido a hipermetilación del promotor o pérdida alélica (Yeh *et al.*, 2006).

La función de *PTPL1* en apoptosis también se debate actualmente en la literatura (Abaan & Toretsky, 2008). Distintos grupos han documentado una función antiapoptótica de *PTPL1*, principalmente por inhibición de la apoptosis mediada por Fas (Sato *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2000; Ungefroren *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2004), mientras que otros han documentado una función proapoptótica. Entre estos últimos, se han realizado estudios con líneas tumorales de cáncer de mama, células HeLa y células HEK293 que muestran que *PTPL1* desfosforila a IRS-1 e induce apoptosis al menos por inhibición de la vía IGF-IR/IRS-1/PI3K/Akt (Bompard *et al.*, 2002; Dromard *et al.*, 2007). En células de cáncer de colon SW480, la sobreexpresión de *PTPL1* aumenta la susceptibilidad a la apoptosis mediada por Fas (Miyazaki *et al.*, 2006).

La muerte en el cáncer de próstata se debe principalmente a las metástasis en sitios distales, predominantemente en hueso (Morrissey & Vessella, 2007). El proceso metastásico consiste en la separación de células tumorales del tumor primario, la adhesión a la matriz extracelular y su degradación para infiltrar el tejido circundante, la invasión de vasos sanguíneos y linfáticos, y finalmente, el establecimiento de metástasis en sitios secundarios (Wittekind & Neid, 2005). Un prerrequisito para invadir el tejido circundante es un cambio en la maquinaria celular que controla estos procesos, y la

fosforilación de residuos de tirosina es habitualmente un paso crítico para regular las actividades de ciertas proteínas y, por tanto, la activación o desactivación de sus rutas de señalización. Hay varios estudios que documentan la función de PTPL1 en este proceso. En células de carcinoma de ovario SKOV3, el silenciamiento de PTPL1 induce un aumento de la fosforilación de ErbB2 inducida por EGF y del potencial invasivo. PTPL1 inhibe la actividad de ErbB2 mediante la desfosforilación de su dominio de señalización y atenúa la invasividad y el establecimiento de metástasis de células tumorales que sobreexpresan ErbB2 (Zhu *et al.*, 2008). Otro estudio utilizando la misma línea celular, ha mostrado que la sobreexpresión de PTPL1 reduce la migración celular inducida por el ácido lisofosfatídico y que la supresión de la expresión endógena de PTPL1 potencia significativamente la migración inducida por ácido lisofosfatídico (Lai *et al.*, 2007). También se ha descrito que la pérdida de PTPL1 mediada por el virus del papiloma humano VPH16 hace sinergia con la actividad de ErbB2 durante el crecimiento invasivo en los cánceres de cabeza y cuello relacionados con VPH (Hoover *et al.*, 2009). Recientemente, se ha publicado otro artículo en el que se documenta la función de PTPL1 en invasión en células de cáncer de mama MCF7. En este contexto, el silenciamiento de PTPL1 aumenta el crecimiento tumoral en ratones atímicos y también potencia varios parámetros relacionados con la progresión tumoral, como la proliferación celular sobre componentes de la matriz extracelular y la invasión (Glondou-Lassis *et al.*, 2010). Los datos relativos a PTPL1 y el ciclo celular son escasos. Herrmann *et al.* (2003), demostraron que PTPL1 es capaz de interactuar con los microtúbulos de la zona media del huso, que su localización está regulada de forma dependiente de ciclo y que tiene una función en la regulación de la citocinesis. También se ha demostrado que PTPL1 está implicado en la regulación de la meiosis en oocitos de *Xenopus* (Nedachi & Conti, 2004).

4. PTTG1, LA SECURINA HUMANA

PTTG1 (Pituitary tumor-transforming gene 1) es el producto del gen humano homólogo del gen *Securina* de *Xenopus*, y está implicado en la separación de cromátidas hermanas durante la mitosis (Domínguez *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1999). Su nivel de expresión es máximo en G₂/M, momento en el que es fosforilado por Cdk1 (Ramos-Morales *et al.*, 2000). La inyección subcutánea de células transfectadas con PTTG1 induce la formación de tumores en ratones atímicos y se ha documentado la sobreexpresión de PTTG1 en distintos tipos de tumores, entre ellos, adenomas de hipófisis, cáncer de colon, esófago, pulmón, tiroides, testículo, ovario y mama, y carcinoma hepatocelular (Vlotides *et al.*, 2007; Sáez *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Heaney *et al.*, 2000; Puri *et al.*, 2001; Sáez *et al.*, 2002; Boelaert *et al.*, 2003; Solbach *et al.*, 2004; Sáez *et al.*, 2006). PTTG1 está implicado en varios procesos celulares, incluyendo división celular, reparación de daños en el DNA (Romero *et al.*, 2001), apoptosis y angiogénesis e interacciona con distintas proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*. También posee capacidad transactivadora e induce aumentos de expresión de varios genes, especialmente del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y c-myc (Salehi *et al.*, 2008).

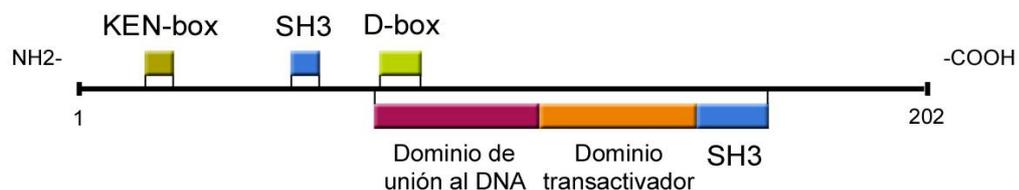


Figura 9: Representación esquemática de la proteína PTTG1 de mamíferos. La proteína comprende un dominio amino terminal principalmente regulador y un dominio carboxilo terminal funcional. Se indican las cajas KEN y D, ambas implicadas en la degradación de PTTG1, así como los sitios de unión SH3. Adaptado de Vlotides *et al.*, 2007.

Aquí nos centraremos en su función como regulador del ciclo celular. La progresión del ciclo celular de mamíferos está controlada por diversas actividades enzimáticas, que incluyen proteína quinasas. Entre ellas, las quinasas dependientes de ciclina (Cdk) son proteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad catalítica, llamada Cdk, y una subunidad reguladora, conocida como ciclina. Estos complejos se activan secuencialmente para conducir a las células a través del ciclo celular (Manchado *et al.*, 2012). Las señales mitogénicas son sensadas por ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3), que se unen y activan preferentemente a Cdk4 y Cdk6 durante G_1 , la fase del ciclo en la que las células se preparan para la síntesis de DNA. Después empiezan a expresarse las ciclinas de tipo E (E1 y E2), que se unen y activan a Cdk2. La disponibilidad de las ciclinas de tipo E durante el ciclo celular está muy controlada y restringida a las fases tempranas de la síntesis de DNA, por lo que el complejo Cdk2-ciclina E es esencial para conducir la transición G_1/S . Cdk2 es activada posteriormente por la ciclina A2 durante la fase tardía de replicación del DNA, para conducir la transición de S a mitosis, un periodo conocido como fase G_2 . Finalmente, Cdk1 es activada por ciclinas de tipo A al final de la interfase para facilitar la entrada en mitosis. Después de la rotura de la envuelta nuclear, las ciclinas de tipo A son degradadas, facilitando la formación de los complejos Cdk1-ciclina B, responsables de conducir a las células a través de mitosis (Malumbres & Barbacid, 2009).

Durante la mitosis, el material genético duplicado y los centrosomas se distribuyen equitativamente entre las dos células hijas. Los cambios morfológicos que se producen en este proceso se han usado tradicionalmente para definir los diferentes estadios de la mitosis. En profase, la cromatina se condensa para formar los cromosomas y la envuelta nuclear se rompe. Durante la prometafase, una reorganización masiva del citoesqueleto resulta en la generación de un huso bipolar donde se unen los cromosomas. Para organizar este huso bipolar, los centrosomas han tenido que duplicarse previamente en “el ciclo de los centrosomas”, que ocurre en paralelo al “ciclo de la cromatina”, e incluye la duplicación (durante la fase S), la

segregación y la maduración (durante la transición G₂/M) de los centrosomas. Estos centrosomas funcionan como un par de centros organizadores de microtúbulos, que migran hacia polos opuestos de la célula y son esenciales para una formación apropiada del huso mitótico. En metafase, los cromosomas se unen al extremo “más” de los microtúbulos a través de los cinetocoros y se alinean en la placa metafásica, en el centro del huso mitótico (Pérez de Castro *et al.*, 2007). Durante la metafase, las cromátidas hermanas se mantienen unidas por el complejo cohesina (formado por las subunidades Smc1, Smc3, Scc1 y Scc3), un proceso esencial para la biorientación de los cromosomas en el huso mitótico y para evitar una separación prematura de las cromátidas (Wong, 2010). En células de mamífero, la disociación de los complejos cohesina de los cromosomas durante la mitosis requiere dos etapas. La primera etapa comienza durante la profase y requiere la fosforilación de las subunidades Scc3 por la quinasa Plk1 (Polo-like kinase 1). La segunda etapa tiene lugar durante la transición metafase-anafase e implica la proteólisis de Scc1 por una proteasa llamada Separasa. Durante la mayor parte del ciclo celular, PTTG1 está unida a la Separasa, inhibiendo por tanto su actividad proteolítica. En vertebrados existe además otro mecanismo adicional de inhibición de la Separasa: su fosforilación dependiente del complejo Cdk1-ciclina B. En la transición metafase-anafase, cuando los cromosomas están orientados correctamente, ciclina B y PTTG1 son degradados por la ligasa de ubiquitina APC/C^{Cdc20} (complejo promotor de anafase/ciclosoma). La destrucción de estas proteínas hace que la Separasa pueda activarse y mediar la degradación del complejo cohesina y la separación de las cromátidas hermanas (Vlotides *et al.*, 2007). La segregación de los dos juegos de cromosomas se produce durante la anafase, después de la pérdida de cohesión de las cromátidas hermanas. Finalmente, en telofase, los cromosomas se descondensan y se forman los dos núcleos, después de la reconstrucción de las envueltas nucleares. Una vez que los dos núcleos están separados, la célula sufre la citocinesis para dividir el citoplasma y dar lugar a las dos células hijas.

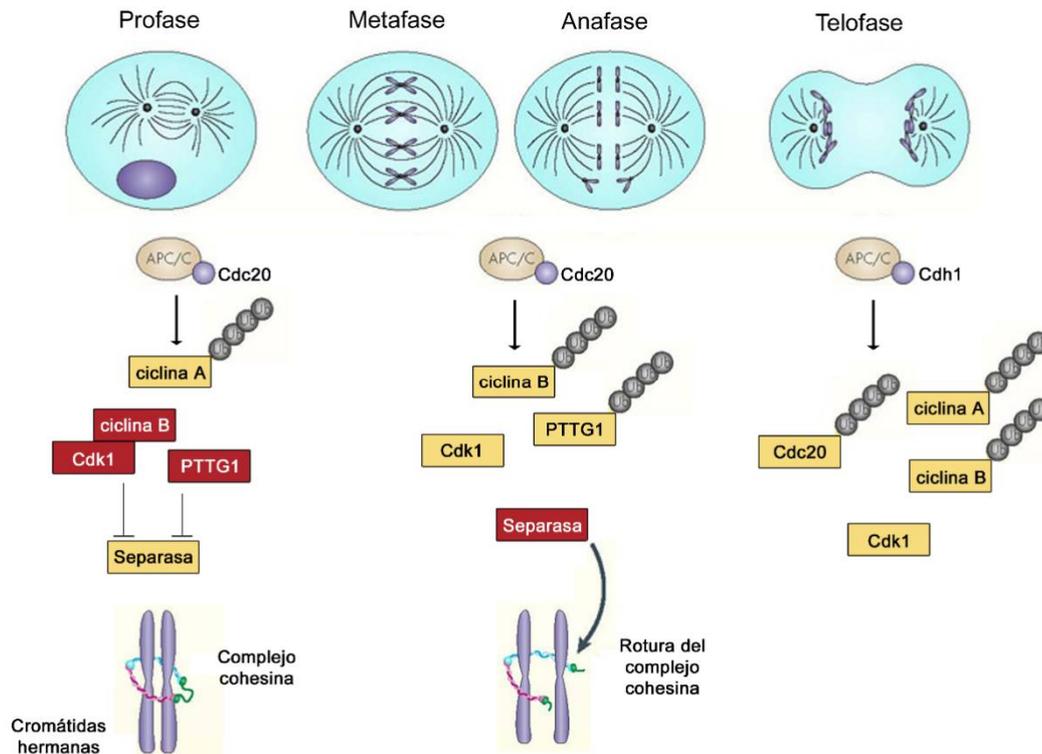


Figura 10: Esquema de las moléculas clave implicadas en la progresión mitótica. En profase, la ciclina A es ubiquitinada por APC/C-Cdc20 para su degradación. En presencia de cromosomas no alineados, PTTG1 y Cdk1-ciclina B mantienen inactiva a la separasa. Cuando todos los cromosomas están alineados, la degradación dependiente de ubiquitinación de PTTG1 y ciclina B conduce a la activación de la separasa, que, a su vez, rompe el complejo cohesina y libera a las cromátidas hermanas, facilitando la transición metafase-anafase. APC/C-Cdh1 también ubiquitina a las ciclinas A y B después de la anafase para mantener una actividad baja de Cdk1 durante la salida de mitosis y la fase G₁ posterior. Las proteínas activas están representadas en rojo. Adaptado de Malumbres & Barbacid, 2009.

En relación a los efectos de PTTG1 sobre el ciclo celular, existe controversia en la literatura. De hecho, todavía no está claro si la sobreexpresión de PTTG1 aumenta o disminuye la proliferación celular, ya que existen estudios que aportan datos en los dos sentidos (revisado en Vlotides *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha publicado que la sobreexpresión de PTTG1 bloquea la progresión de la mitosis a anafase, pero no aumenta la síntesis de DNA (Yu *et al.*, 2003). Por otra parte, también se ha publicado que la sobreexpresión de PTTG1 aumenta la acumulación de células en fase S, por aumento de expresión de la ciclina D3, regulando en este contexto la transición G₁/S.

Por el contrario, el silenciamiento de PTTG1 produce un aumento de células en G₁ y una disminución de células en fase S (Tong *et al.*, 2007).

La función de PTTG1 en apoptosis, también se debate actualmente, ya que se ha publicado que la sobreexpresión de PTTG1 promueve o inhibe la apoptosis respectivamente (Vlotides *et al.*, 2007). Concretamente, hay datos que indican que la sobreexpresión de PTTG1 induce apoptosis de forma dependiente e independiente de p53, en células de cáncer de mama MCF7 (p53 tipo silvestre) y células de osteosarcoma MG63 (deficientes en p53) (Yu *et al.*, 2000). También se ha publicado que PTTG1 induce la activación del promotor de p53, a través de c-myc, en células MCF7 y que la sobreexpresión de PTTG1 estimula la expresión del miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, Bax, una diana de p53 (Hamid & Kakar, 2004). Por el contrario, se ha descrito que PTTG1 interacciona con p53 *in vitro* e *in vivo* y que esta interacción bloquea la unión específica de p53 al DNA e inhibe su actividad transcripcional. En este contexto, la actividad del promotor de Bax disminuye debido a la interacción PTTG1-p53, conduciendo a una disminución de la apoptosis (Bernal *et al.*, 2002). También se ha observado en líneas celulares de hepatoma que la sobreexpresión de PTTG1 atenúa la apoptosis inducida por p53 (Cho-Rok *et al.*, 2006).

4.1. SAC y paclitaxel

El paclitaxel es una droga utilizada en quimioterapia perteneciente al grupo de los taxanos. Interacciona con la β -tubulina, interfiriendo en la dinámica de los microtúbulos, y dispara la parada del ciclo celular en mitosis, bloqueando el ensamblaje normal del huso mitótico y la división celular (Gascoigne & Taylor, 2009).

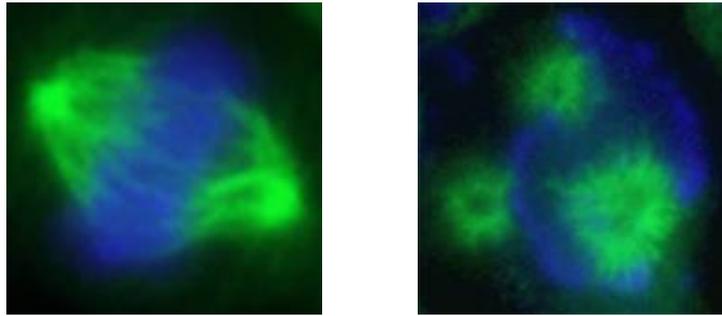


Figura 11: Efecto del paclitaxel sobre los microtúbulos. La inmunofluorescencia de la izquierda muestra un huso mitótico normal en una célula PC3. La de la derecha muestra un huso mitótico aberrante, multipolar, en una célula PC3 tratada con paclitaxel. Verde: β -tubulina; azul: cromatina.

La interrupción de la formación normal del huso mitótico dispara el punto de control de ensamblaje del huso (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) (Bhalla, 2003; Gascoigne & Taylor, 2008). El SAC actúa para retrasar la segregación cromosómica hasta que todas las cromátidas hermanas duplicadas estén unidas y orientadas en el huso mitótico. Este punto de control se encarga de generar una señal inhibitoria de la anafase; concretamente, la principal diana del SAC es Cdc20, uno de los cofactores del APC/C. El SAC regula negativamente la capacidad de Cdc20 para activar la poliubiquitinación mediada por el APC/C de dos sustratos clave, ciclina B y PTTG1, evitando por tanto su degradación por el proteasoma 26S. Se han identificado distintos componentes del SAC, entre los que se incluyen Cdc20, Mad1, Mad2, BubR1/Mad3, Bub1, Bub3 y Aurora-B (Ciliberto & Shah, 2009; Musacchio & Salmon, 2007).

Durante una mitosis normal, la salida de mitosis se dispara por la rápida degradación de la ciclina B1. La degradación de la ciclina B1 se evita por la actividad del SAC, hasta que todos los cromosomas están alineados correctamente. Pero, existen evidencias que indican que, en células de mamífero expuestas a drogas antimitóticas, la ciclina B1 todavía es capaz de degradarse a pesar de la activación crónica del SAC (Brito & Rieder, 2006; Gascoigne & Taylor, 2008). Eventualmente, la cantidad de ciclina B1 cae por debajo del umbral requerido para mantener el estado mitótico y la célula sale

de mitosis, un proceso conocido como “deslizamiento mitótico” (mitotic slippage). Se ha propuesto un modelo en el que el destino celular está determinado por dos redes que compiten; una que implica la activación de las rutas de muerte y otra que controla la degradación de la ciclina B1 y, por tanto, la salida de mitosis (Gascoigne & Taylor, 2009). Estas dos redes trabajan en direcciones opuestas durante una parada en mitosis: mientras las señales de muerte se van haciendo más fuertes, los niveles de ciclina B1 caen. Ambas redes tienen umbrales, por tanto, si los niveles de ciclina B1 caen por debajo del umbral de salida de mitosis primero, se produce el deslizamiento. Si el umbral de muerte se alcanza primero, la célula muere en mitosis.

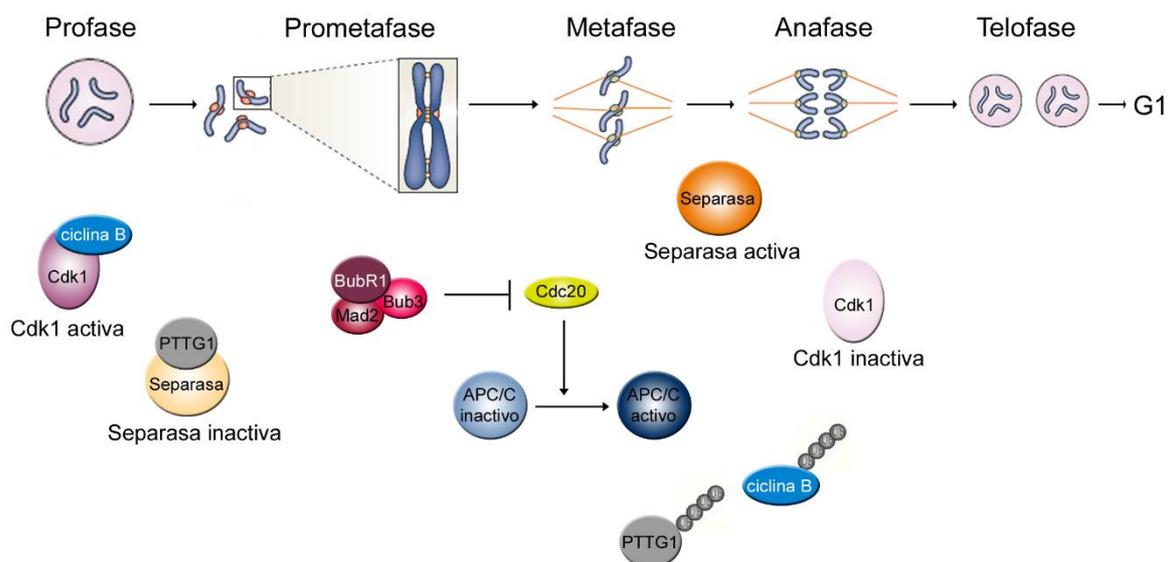


Figura 12: Relación entre el SAC y la maquinaria de ciclo. En prometafase, la presencia de cinetocoros no unidos a microtúbulos, produce la activación del SAC (representado por algunas de las proteínas del SAC como BubR1, Mad2 y Bub3), que inhibe la capacidad de Cdc20 para activar al APC/C. La unión de los microtúbulos cinetocóricos a todos los cinetocoros y la biorientación de las cromátidas hermanas, regula negativamente la señal del SAC. Esto produce la liberación de Cdc20, que ahora puede activar al APC/C. Esta activación conduce a la poliubiquitinación de sustratos de anafase como ciclina B y PTTG1 y a su destrucción proteolítica por el proteasoma. La activación de la Separasa y la inactivación de Cdk1 inician la separación de las cromátidas hermanas, la citocinesis y la salida de mitosis. En condiciones ideales, el SAC permanece activo hasta que todos los cromosomas están biorientados, la única condición que asegura una segregación correcta en anafase. La adición de drogas que interfieren con los microtúbulos durante este proceso, detiene inmediatamente la proteólisis de ciclina B y PTTG1 y bloquea el inicio de la anafase de forma dependiente del SAC. Adaptado de Musacchio & Salmon, 2007.

En resumen, después de una parada en mitosis prolongada, las células tumorales mueren durante la mitosis, o salen de mitosis por deslizamiento hacia un estado G_1 tetraploide, desde el que pueden morir, parar en G_1 o iniciar una nueva ronda de ciclo celular (Bhalla, 2003; Gascoigne & Taylor, 2008; Gascoigne & Taylor, 2009).

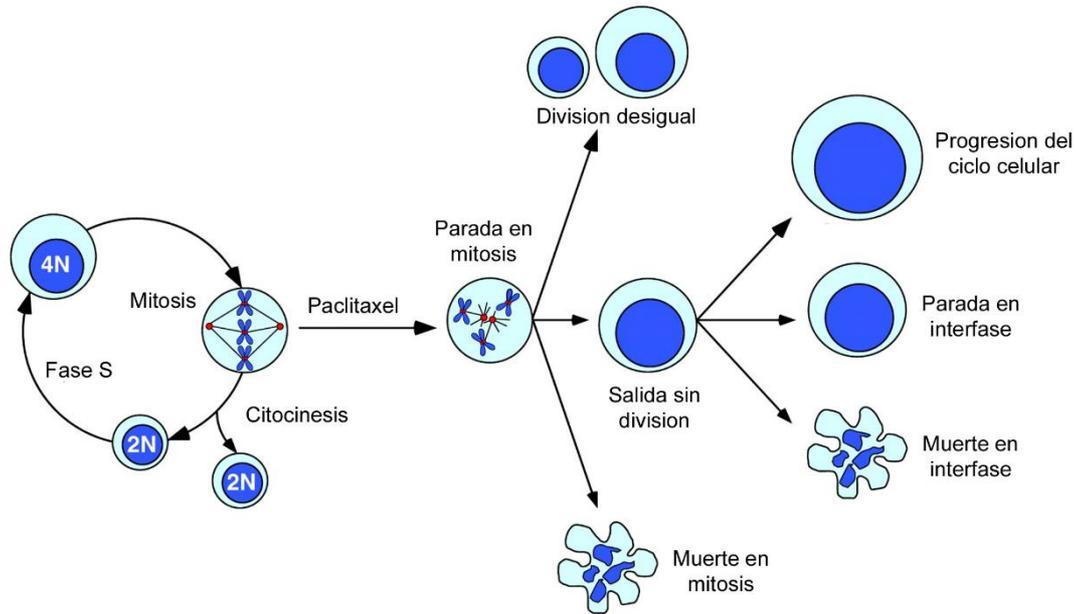


Figura 13: Posibles destinos de las células en respuesta al tratamiento con drogas antimitóticas. Cuando las células son expuestas a agentes antimitóticos como el paclitaxel, se paran en mitosis debido a la activación crónica del SAC. Después pueden seguir distintos destinos. Las células pueden morir directamente en mitosis o dividirse asimétricamente para producir células hijas aneuploides. Alternativamente, las células pueden salir de la mitosis sin dividirse. En este caso, las células pueden morir en interfase, parar en interfase indefinidamente o entrar en ciclos celulares adicionales en ausencia de división. Adaptado de Gascoigne & Taylor, 2009.

Estas diferentes posibilidades indican que el bloqueo de la división celular evita la proliferación, pero no mata necesariamente a las células. La relación entre la parada en mitosis inducida por paclitaxel y la muerte o supervivencia de las células todavía no se entiende completamente. Cuando tiene lugar, la muerte se produce principalmente por la vía intrínseca de apoptosis (Bhalla, 2003).

En este sentido, se ha publicado que el bloqueo mitótico inducido por el paclitaxel está asociado a la fosforilación de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L (Haldar *et*

al., 1996; Poruchynsky *et al.*, 1998). Además, varios estudios han demostrado que el paclitaxel produce apoptosis en células tumorales de mama y ovario induciendo la localización nuclear de los factores de transcripción FOXO y el aumento de expresión de su gen diana *Bim* (Sunters *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2008). También se ha publicado que el paclitaxel y su análogo semisintético, el docetaxel, producen un efecto inhibitor sobre el receptor androgénico mediado por FOXO1 (Gan *et al.*, 2009).

El paclitaxel y el docetaxel se usan actualmente para inducir regresión en el cáncer de próstata hormonorrefractario después del fallo de la terapia de ablación androgénica (Gan *et al.*, 2009), es decir, el tratamiento en primera línea del cáncer de próstata hormonorrefractario es principalmente la quimioterapia basada en taxanos (Gan *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2011). Aunque este tratamiento mejora la supervivencia de los pacientes, la mayoría de ellos desarrolla resistencia a las drogas (Berry & Eisenberger, 2005; Jeske *et al.*, 2011), por lo que el estudio de nuevas drogas o de nuevas combinaciones, así como la investigación de los mecanismos que conducen a la adquisición de resistencia y la forma de evitarla, constituyen elementos importantes que pueden contribuir a la mejora de las opciones terapéuticas.

OBJETIVOS

1. Estudio del papel de PTPL1 en la inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer de próstata, en respuesta al tratamiento con PEITC, anti-Fas (por separado o en combinación) y paclitaxel, y las rutas de señalización implicadas en el proceso.
2. Estudio del efecto del silenciamiento de PTPL1 sobre la invasión y el ciclo celular en líneas celulares de cáncer de próstata, así como la identificación de dianas relacionadas con invasión inducidas tras el silenciamiento de PTPL1.
3. Estudio de la influencia de PTTG1 sobre la eficacia del paclitaxel en la inducción de la parada del ciclo celular y la apoptosis en células de cáncer de próstata tratadas con la droga.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. BACTERIAS

Para producir DNA plasmídico se utilizó la estirpe DH5 α de *Escherichia Coli*. Las bacterias se cultivaron en medio rico no definido LB². La selección de bacterias transformadas con cada plásmido se realizó suplementando el medio con el antibiótico correspondiente a la resistencia aportada por el plásmido. El genotipo de la estirpe DH5 α de *Escherichia Coli* es *sup E44 Δ lacU169(Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares humanas de cáncer de próstata adherentes PC3, LNCaP y DU145 se obtuvieron de la “Interlab Cell Line Collection” (Genova, Italia) También se generó una línea PC3 resistente a paclitaxel (PC3PTXR) en el laboratorio. Las células PC3 parentales se trataron con paclitaxel 1 μ M durante 3 días; posteriormente, la droga se retiró del medio y se permitió que las células supervivientes crecieran. Estas células se sometieron de nuevo al mismo tratamiento, y las células resultantes, resistentes a paclitaxel, se utilizaron en los experimentos. Las líneas celulares se cultivaron de forma rutinaria en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, tampón HEPES 10 mM, glutamina 1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 μ g/ml, en un incubador humidificado a 37°C y CO₂ al 5%. Los cultivos se diluyeron periódicamente, para evitar que estuvieran confluentes, mediante tripsinización. Para ello, las células se lavaron con PBS y se les añadió una solución de tripsina-EDTA al 0,05% y se dejaron durante 2-3 minutos en el incubador. Una vez despegadas, se neutralizó la tripsina añadiendo 4 veces el volumen de tripsina de medio completo, se centrifugaron, se diluyeron y se sembraron de nuevo. Las células procedentes de los experimentos también se recogieron mediante tripsinización.

² LB son las siglas de “Lisogeny Broth” (Bertani, 2004), pero el acrónimo se ha interpretado incorrectamente como Luria Bertani, Luria Broth o Lennox Broth.

3. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Para la congelación de un cultivo de células, se utilizaron 5×10^6 células por criotubo. Las células se alimentaron como máximo 24 horas antes de la congelación, se tripsinizaron y se resuspendieron en 1,5 ml de medio de congelación por criotubo. Los criotubos se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C, de 24 a 48 horas a -80°C y finalmente se guardaron en nitrógeno líquido. Para la descongelación, los criotubos se incubaron en un baño a 37°C hasta la total descongelación de las células. Seguidamente, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron.

Medio de congelación: Medio completo con suero fetal bovino al 40% y DMSO al 10%. Alicuotado y guardado a -20°C.

4. RNA DE INTERFERENCIA PEQUEÑO (siRNA)

Los silenciamientos con RNAs de interferencia pequeños (siRNAs) se realizaron utilizando el reactivo DharmaFect (Thermo Fisher Dharmacon), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El siRNA específico para PTPL1 y el siRNA control negativo son de Qiagen. Algunos experimentos se comprobaron con otro siRNA PTPL1 adicional de Dharmacon. Los siRNAs específicos para PKC δ y PTTG1, así como el siRNA control negativo son de Dharmacon. Todos los siRNAs se usaron a una concentración de 100 nM. Los diferentes tratamientos se aplicaron a las células 24 ó 48 horas después del silenciamiento. La eficiencia de transfección se midió utilizando un siRNA específico para PTPL1 marcado con Alexa Fluor 488 (Qiagen). Después de 24 y 72 horas de silenciamiento, el porcentaje de células transfectadas fue 61,7% y 26,7%, respectivamente.

5. PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES

Plásmidos utilizados:

- pCDNA3 (Invitrogen)
- pEF/*hSec-KAA-DM*: El DNAC de PTTG1/Securina se mutó en las cajas de destrucción KEN y D y se clonó en el plásmido pEF. Este plásmido fue cedido por el Dr. Michael Brandeis, del Departamento de Genética del Instituto Silberman de Ciencias de la Vida de la Universidad hebrea de Jerusalén, Israel (Zur & Brandeis, 2001).
- pCMV6-XL4-PTPL1 (Origene)
- pCMV6-XL5-PKC δ (Origene)

Las transfecciones transitorias se realizaron utilizando el reactivo FuGENE (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se sometieron a los distintos tratamientos 24 ó 48 horas después de la transfección.

6. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN WESTERN BLOT

Anti-PARP	Monoclonal	Ratón	1:250	BD Biosciences
Caspasa 3 activa	Policlonal	Conejo	1:200	Abcam
Caspasa 7 activa (Asp 198)	Policlonal	Conejo	1:1000	Calbiochem
Caspasa 9 activa (Asp 315)	Policlonal	Conejo	1:500	Calbiochem
Caspasa 9 activa (Asp 315)	Policlonal	Conejo	1:500	Cell Signaling
Anti- β -actina	Monoclonal	Ratón	1:20000	Sigma
Anti-Bax	Policlonal	Conejo	1:1000	BD Biosciences

Anti-Bak	Policlonal	Conejo	1:2000	BD Biosciences
Anti- Bcl-x _L	Monoclonal	Ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PTPL1	Policlonal	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ciclina B1	Policlonal	Conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Mcl-1	Policlonal	Conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-uPA	Policlonal	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-integrina α6	Policlonal	Conejo	1:500	Cell Signaling
Anti-fosfohistona H3 (S10)	Policlonal	Conejo	1:800	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PKCδ	Policlonal	Conejo	1:200	Cell Signaling
Anti-fosfo-PKCδ (T505)	Policlonal	Conejo	1:150	Cell Signaling
Anti-fosfo-Akt (S473)	Policlonal	Conejo	1:400	Cell Signaling
Anti-fosfo-IκBα (S32/36)	Policlonal	Conejo	1:300	Abcam
Anti-fosfo-IκBα (Y42)	Policlonal	Conejo	1:200	Abcam
Anti- IκBα	Policlonal	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-fosfo-NFκBp65 (S276)	Policlonal	Conejo	1:500	Abcam
Anti-NFκBp65	Policlonal	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ciclina E	Monoclonal	Ratón	1:100	Monosan
Anti-β-catenina activa (clon 8E7) desfosforilada	Monoclonal	Ratón	1:300	Millipore
Anti-PCNA	Monoclonal	Ratón	1:10000	Dako
Anti-PTTG1	Policlonal	Conejo	1:1000	(Domínguez <i>et al.</i> , 1998)
Anti-BubR1	Policlonal	Conejo	1:3000	Bethyl Laboratories
Anti-osteopontina	Policlonal	Conejo	1:100	Neomarkers

7. WESTERN BLOT

Las células se lisaron en buffer de lisis Nonidet-P40 (NP-40), suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma) y fosfatasas (Roche), utilizando homogenizadores de plástico Eppendorf. Los lisados se incubaron durante una hora a 4°C y se centrifugaron a 12.000 rpm, 30 minutos, a 4°C. La concentración de proteínas se determinó utilizando el método BCA (Pierce). Posteriormente, las proteínas se desnaturalizaron añadiéndoles tampón de carga de Laemmli 1x y calentando durante 2 minutos a 98°C.

Se separaron cantidades iguales de proteína total mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), con gradiente del 4 al 20% (Invitrogen), utilizando como electrolito tampón Tris-glicina 1x. Las proteínas del gel se electro transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare), utilizando tampón de transferencia y aplicando un voltaje constante de 100 V durante 1,5-2 horas. Las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con Ponceau S, para comprobar que las cantidades de proteína eran comparables, y se destiñeron con agua. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron en tampón de bloqueo durante, al menos, 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave, para bloquear sitios de unión inespecíficos. Después se incubaron con el anticuerpo primario preparado a la dilución apropiada en tampón de bloqueo durante toda la noche, a 4°C, en un rotor (Miltenyi). A continuación, las membranas se lavaron durante 30 minutos con tampón TBS-Tween 20 (3 lavados de 10 minutos cada uno) y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (cabra anti-ratón, 1:20,000 ó cabra anti-conejo, 1:20,000 (GE Healthcare)) en tampón de bloqueo durante una hora, a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras la incubación, las membranas se lavaron durante 30 minutos con TBS-Tween 20 (3 lavados de 10 minutos cada uno) y se les aplicó ECL⁺ (Enhanced ChemoLuminescent, GE Healthcare), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las densitometrías se realizaron con el programa QuantiScan (Biosoft). Se utilizó β -actina como control de carga.

Tampón NP-40: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol al 10% (v/v) y NP40 al 1% (v/v). Conservado a 4°C.

Tampón de carga de Laemmli 5x: Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol al 25% (v/v), SDS al 2%, β-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol al 0,1% (p/v). Conservado a -20°C.

Tampón Tris-glicina 1x: Trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%. Conservado a temperatura ambiente.

Tampón de transferencia: Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% (v/v). Conservado a 4°C.

Solución Ponceau S 1x: Ponceau S al 0,2% (p/v) y ácido acético al 10% (p/v). Conservado a temperatura ambiente.

Tampón de bloqueo: Bloqueante (Roche) al 1%, Tween 20 al 0,05% en tampón Tris 0,05M. Conservado a 4°C.

Tampón Tris 0,05 M: Trizma-HCl 132 g, Trizma base 19,4 g, agua bidestilada hasta 20l. Conservado a temperatura ambiente.

Tampón TBS-Tween 20 1x: Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05% (v/v). Comprobar el pH (7,5). Conservado a 4°C.

8. INMUNOHISTOQUÍMICA

La matriz de tejidos de cáncer de próstata comprende 76 tumores primarios de próstata, fijados en formol e incluidos en parafina, seleccionados de prostatectomías radicales diagnósticas de pacientes del Hospital Virgen del Rocío, con la aprobación del comité ético. Dos patólogos independientes evaluaron la puntuación de Gleason de acuerdo con los criterios convencionales (López-Beltrán *et al.*, 2006). Secciones de 5 µm del bloque de parafina se desparafinaron y rehidrataron. Las secciones se sumergieron en una solución acuosa de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) al 3% para agotar la actividad peroxidasa endógena y luego se cubrieron con tampón de bloqueo, para bloquear los sitios de unión inespecíficos. La recuperación antigénica para el anticuerpo anti-PTPL1 (policlonal, conejo, Santa Cruz) se realizó en microondas utilizando EDTA 1 mM pH 9,0 y para el anticuerpo anti-PKCδ (policlonal, conejo, Abcam), con tripsina 1 mg/ml, 15 minutos a 37°C. Las secciones se incubaron con los anticuerpos indicados diluidos en tampón de bloqueo durante toda la noche, a 4°C, en cámara húmeda. Después de lavar con tampón Tris 0,05M, se aplicaron los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y el sustrato

cromogénico 3,3'-diaminobenzidina para desarrollar la inmunoreactividad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (EnVision, Dako). Las secciones se contratiñeron ligeramente con hematoxilina y se montaron en DPX (BDH Laboratories). Como controles negativos se utilizaron secciones incubadas con suero normal de conejo en lugar de anticuerpo primario. La inmunotinción fue evaluada independientemente por dos observadores en, al menos, 10 campos a una magnificación 200x, y se puntuó positivamente si más del 25% de las células tumorales estaban teñidas intensamente.

9. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (en el caso de la inmunofluorescencia anti- β -catenina) o metanol (en el caso de la inmunofluorescencia anti-NF κ B), se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,05% en tampón Tris durante 5 minutos y se bloquearon con tampón de bloqueo sin Tween 20 durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron con anti- β -catenina (conejo, policlonal, Neomarkers) a una dilución 1/800 o con anti-NF κ B (conejo, policlonal, Sta. Cruz Biotechnology) a una dilución 1/500 en tampón de bloqueo sin Tween 20, durante toda la noche, a 4°C. Después de lavar con tampón Tris, se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con FITC, durante 1 hora, en oscuridad, a temperatura ambiente. Tras lavar con tampón Tris, los núcleos se contratiñeron con Dapi (Vysis) en el caso de la inmunofluorescencia anti- β -catenina y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros apropiados y una cámara digital (Leica).

10. ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Las soluciones de PEITC (Sigma) y paclitaxel (Calbiochem) se prepararon a 10mM en DMSO (dimetil sulfóxido) y se guardaron a -20°C. El anticuerpo monoclonal anti-Fas, clon CH11, es de Beckman Coulter. La inducción de apoptosis se midió mediante un ensayo de unión de anexina V, que detecta uno de los eventos más tempranos en la apoptosis: la

externalización del fosfolípido fosfatidilserina. Se resuspendió un millón de células en 100 µl de tampón de unión de anexina-V (R&D Systems), y se añadió yoduro de propidio (PI) 5 µg/ml y anexina-V-FITC 0,5 µg/ml. Las células se incubaron durante 15 minutos, a temperatura ambiente, en oscuridad y se diluyeron en 400 µl de tampón de unión de anexina-V. La fluorescencia se midió con un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences), en menos de una hora.

Se identificaron cuatro poblaciones celulares (células viables: anexina V y PI negativas, cuadrante inferior izquierdo; células en apoptosis temprana: anexina V positivas y PI negativas, cuadrante inferior derecho; células en apoptosis tardía o necróticas: anexina V positivas y PI positivas, cuadrante superior derecho; células muertas: anexina V negativas y PI positivas, cuadrante superior izquierdo), midiendo la fluorescencia en los canales FL1 y FL2.

11. TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y PCR CUANTITATIVA

El RNA total se extrajo utilizando el kit Purescript® (Gentra), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 0,5 µg de RNA total se sometieron a digestión con DNasa I (Invitrogen) y fueron procesados a cDNA mediante transcripción inversa con el kit First Strand cDNA Synthesis (Roche), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µl, en un aparato de PCR a tiempo real SmartCycler II (Cepheid), utilizando el kit QuantiMix Easy SyG (Biotools) y los oligonucleótidos cebadores específicos a 500 nM. Los niveles de los genes diana y del gen de mantenimiento en cada muestra se cuantificaron midiendo los valores Ct (threshold cycle) por duplicado. Estos valores Ct medios se transformaron en cantidades utilizando el método delta-Ct (Pfaffl, 2001). A la muestra con la cantidad más baja se le asignó el valor 1. La cantidad de transcrito del gen diana se dividió entre la cantidad del gen de mantenimiento para obtener un valor normalizado.

Oligonucleótidos cebadores utilizados en las PCRs:

RPL13A F	5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3'
RPL13A R	5'-TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3'
PTPL1 F	5'-CCCAACATCCTAGGCAAAAC-3'
PTPL1 R	5'-AAATATGGCGCACCTCTCTG-3'
uPA F	5'-TGTGAGATCACTGGCTTTGG-3'
uPA R	5'-GCCTTACCGAGGTTGTGTGT-3'
uPAR F	5'-CATCCAGGCACTGTTCTTCA-3'
uPAR R	5'-TGTTGCAGCATTTTCAGGAAG-3'
tPA F	5'-GAGATCCCGCCTCTTCTTCT-3'
tPA R	5'-TGCACTCTTCCCTCTCCTGT-3'
PAI-1 F	5'-CCCTTTGCAGGATGGAATA-3'
PAI-1 R	5'-TGGCAGGCAGTACAAGAGTG-3'
ITGA6 F	5'-TCATGGATCTGCAAATGGAA-3'
ITGA6 R	5'-AGGGAACCAACAGCAACATC-3'
OPN F	5'-CGTGGGAAGGACAGTTATGAA-3'
OPN R	5'-ATCAATCACATCGGAATGCTC-3'

12. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Esta técnica se basa en la tinción de una muestra de células con un reactivo fluorescente (yoduro de propidio) que se intercala estequiométricamente en el DNA. La suspensión celular se pasa entonces por el citómetro de flujo y la fluorescencia emitida es proporcional al contenido en DNA de cada célula. Las células que se encuentran en fase G_1 , tienen una copia de DNA y una intensidad de fluorescencia 1x. Las células en fases G_2 y M (G_2/M) tienen dos copias de DNA y por tanto, una intensidad 2x. Las células que están sintetizando DNA (fase S) tendrán valores de fluorescencia comprendidos entre 1x y 2x. Así, el histograma resultante consiste en dos picos, las poblaciones G_1 y G_2/M , con la población en fase S comprendida entre ambos.

En la práctica, las células se recogieron mediante tripsinización tras los distintos tratamientos y se fijaron con etanol al 70% a -20°C (aproximadamente 10^6 células/ml). Posteriormente se permeabilizaron y se trataron con RNAasa y yoduro de propidio según

las instrucciones del kit CycleTest Plus (BD Biosciences). El contenido en DNA se midió con un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences). La adquisición de datos se realizó con el programa CellQuest Pro (BD Biosciences) y el análisis con el programa ModFit LT2 (Verity Software).

13. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se silenciaron con siRNA control o siRNA PTPL1. Después de los tiempos indicados, las células se tripsinizaron y contaron utilizando un hemocitómetro.

14. ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE BrdU

La población de células en fase S se analizó mediante un método inmunofluorométrico (BrdU labeling and detection kit I, Roche). Las células se cultivaron durante 2 horas en presencia de un análogo de la timidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) 10 μ M. Este análogo se incorpora al DNA de las células que están replicando su DNA (proliferativas). Después del tiempo de incubación, las células se tripsinizaron y se fijaron en glicina:etanol (3:7), a 4°C. Posteriormente, se desnaturalizó el DNA con ácido clorhídrico y la BrdU se marcó con un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína, según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se midió por citometría de flujo. La adquisición y el análisis de los datos se realizó con el programa CellQuest Pro.

15. ENSAYO DE CIERRE DE LA HERIDA

Las células se sembraron, cercanas a la confluencia, en una placa de 24 pocillos. Después de silenciar durante 24h, se hizo una herida en la monocapa celular utilizando una punta de pipeta de 200 μ l estéril. La monocapa se lavó dos veces y se incubó durante 36 horas más. Las células se fotografiaron a 0 horas y 36 horas, utilizando un microscopio invertido

Zeiss con óptica Nomarski y un objetivo 16×. Las áreas de las heridas se midieron con el programa ImageJ (Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011).

16. ENSAYO DE INVASIÓN

La cámara de invasión consiste en una placa de 24 pocillos, con insertos control que contienen una membrana de tereftalato de polietileno (PET) con poros de 8 μm e insertos Matrigel (BD Biosciences) que contienen una membrana de PET con poros de 8 μm cubierta por un fina capa de matriz extracelular (ECM). Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 libre de suero y se añadieron a la cámara superior (2 x 10⁴ cells/inserto). La cámara inferior se llenó con medio con suero al 5% como quimioatrayente. Después de 48 horas de cultivo, la parte superior de los insertos se limpió con algodón y los insertos se tiñeron con panóptico rápido (QCA). Las células que migraron a través del Matrigel y de la membrana de PET hacia la parte inferior del inserto se microfotografiaron y contaron utilizando el programa Image J. El porcentaje de invasión se calculó como el número de células que migra a través de la matriz de Matrigel en relación al número de células que migra a través de la membrana de PET.

17. MATRIZ DE cDNA

El RNA total de células PC3 siRNA control y siRNA PTPL1 se extrajo con el kit RNeasy® Mini (Qiagen). Tres microgramos de RNA total se marcaron con biotina utilizando el kit GEArray AmpoLabeling LPR (SABiosciences) y se usaron para hibridar una matriz de cDNA sobre membrana de nitrocelulosa de 96 genes (Human extracellular & adhesion molecules GEArrays, SABiosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal quimioluminiscente se detectó en películas BioMax light (Kodak, Rochester, NY), a diferentes tiempos de exposición. Las películas se escanearon para hacer el análisis densitométrico con el programa QuantiScan. Los valores densitométricos crudos se

corrigieron sustrayendo el fondo medio de los controles negativos. La normalización se completó dividiendo entre la media de las señales no saturadas de cuatro genes de mantenimiento diferentes.

18. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Se realizaron improntas de células cultivadas en portaobjetos silanizados, se fijaron en metanol/ácido acético glacial (3:1), a -20°C durante 10 minutos y se dejaron secar al aire. Posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en una solución SSC 2x/NP40 0,3%, a 37°C durante 30 minutos, se deshidrataron en etanoles de concentraciones crecientes y se dejaron secar al aire. El DNA celular y las sondas centroméricas para los cromosomas 8 (Spectrum red) y 17 (Spectrum aqua) de Vysis, se co-desnaturalizaron a 72°C durante 5 minutos y se hibridaron a 37°C durante toda la noche en una cámara húmeda. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron en una solución SSC 2x/NP40 0,3% a 72°C durante 5 minutos, se contratiñeron con Dapiy se visualizaron en un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros apropiados y una cámara digital.

SSC 20x: NaCl 3M, citrato trisódico 300 mM. Ajustar a pH 7 con HCl. Autoclavar. Conservado a temperatura ambiente. La concentración final del SSC 2x es NaCl 300 mM, citrato trisódico 30 mM.

19. ESTADÍSTICA

La asociación entre PKC δ o PTPL1 y el grado de Gleason se analizó mediante el test exacto de Fisher. Las diferencias entre dos condiciones se analizaron mediante el test *t* de Student pareado. Se consideró significativa una $P < 0,05$. Los cálculos se realizaron con los programas SPSS 16.0 y GraphPad Prism 4. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces.

RESULTADOS

1. PAPEL DE PTPL1 EN APOPTOSIS

1.1. El PEITC sensibiliza a las células PC3 a la apoptosis inducida por anti-Fas

De acuerdo con los datos publicados previamente (Xiao & Singh, 2002), las células PC3 son sensibles a la apoptosis inducida por PEITC (Figura 14). Los datos relativos a la sensibilidad a anti-Fas de las células PC3 son más controvertidos (Rokhlin *et al.*, 1997; Uslu *et al.*, 1997; Hedlund *et al.*, 1998), pero nuestros experimentos indican que son relativamente sensibles a la apoptosis mediada por anti-Fas, es decir, el tratamiento con anti-Fas 0,5 $\mu\text{g/ml}$ produce una ligera inducción de apoptosis, medida por la aparición, mediada por caspasas, del producto de rotura de la proteína PARP. Sin embargo, cuando las células se tratan con PEITC 10 μM durante 1 hora y después se añade anti-Fas 0,5 $\mu\text{g/ml}$ se observa una apoptosis mucho mayor que la observada con PEITC o anti-Fas por separado. La activación de la caspasa 7, medida por la aparición de su producto de rotura de 20 kDa, es también claramente más pronunciada en células PC3 tratadas con la combinación de PEITC y anti-Fas, seguida de las células tratadas con PEITC y finalmente de las células tratadas con anti-Fas, de acuerdo con los resultados obtenidos con PARP (Figura 14).

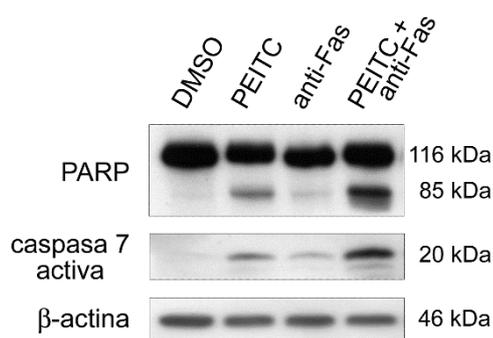


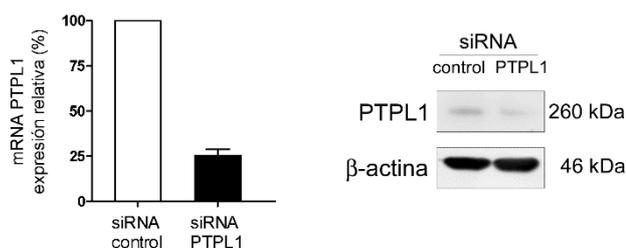
Figura 14: El PEITC sensibiliza a las células PC3 a la apoptosis inducida con anti-Fas. Las células PC3 subconfluentes se trataron con PEITC 10 μM o anti-Fas 0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 h y con PEITC 10 μM durante 1 h más anti-Fas 0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 16 h. La inducción de apoptosis se midió por la aparición de los productos de rotura de 85 y 20 kDa de las proteínas PARP y caspasa 7, respectivamente. β -actina se muestra como control de carga.

1.2. El silenciamiento de PTPL1 produce una disminución de la sensibilidad apoptótica en células PC3

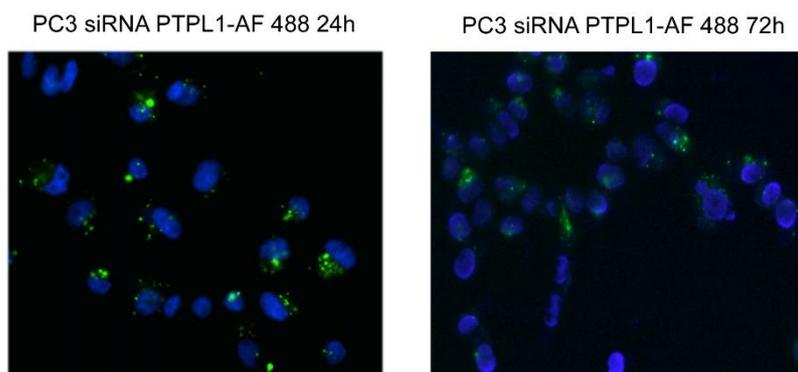
La figura 15 A muestra la disminución de la expresión de PTPL1 endógeno mediante RNA de interferencia pequeño (siRNA), tanto a nivel de RNA mensajero (mRNA) como de proteína. El porcentaje de células transfectadas, después de 24 y 72 h de silenciamiento fue 61,7% y 26,7%, respectivamente (figura 15 B).

Se observa, por la rotura de PARP, que las células PC3 silenciadas para PTPL1 muestran una menor sensibilidad a la apoptosis que las células siRNA control. Este efecto se ve tanto con PEITC o anti-Fas como con ambas drogas, pero es mucho más llamativo cuando se usan las dos drogas en combinación (Figura 15 C). También se examinó el nivel de expresión de varias proteínas implicadas en apoptosis (Figura 15 D). En células siRNA control tratadas con PEITC y anti-Fas se produce una mayor activación de las caspasas 3, 7 y 9 que en células siRNA PTPL1 tratadas de la misma forma. Las proteínas proapoptóticas multidominio Bax y Bak permanecen sin cambios en presencia o en ausencia de PTPL1; sin embargo, Bcl-x_L aumenta en células PC3 silenciadas para PTPL1 ($P < 0,05$, del test *t* de Student). También se observa un aumento de la forma corta proapoptótica de Mcl-1 (Mcl-1_S) en células siRNA control tratadas con PEITC y anti-Fas, y la aparición del producto proapoptótico de rotura de Mcl-1_L, de 24 kDa, también es más evidente en esta condición. Todos estos datos concuerdan con la mayor sensibilidad apoptótica de las células PC3 con expresión endógena de PTPL1.

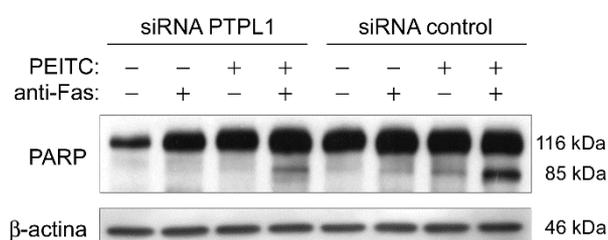
A



B



C



D

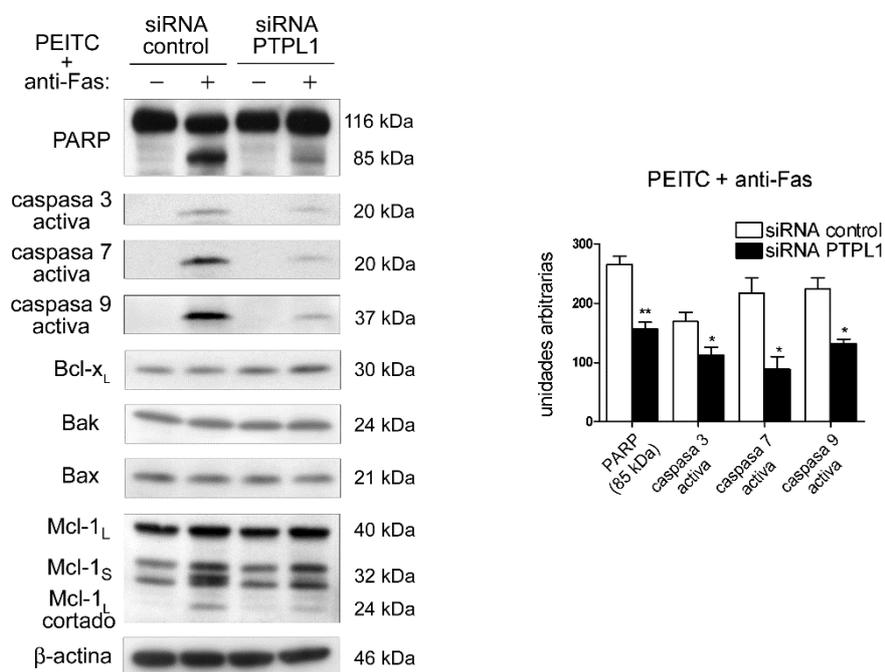
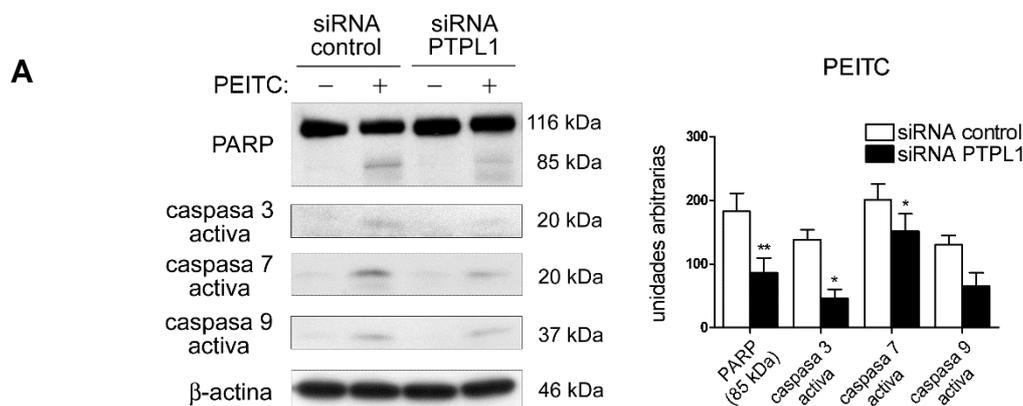


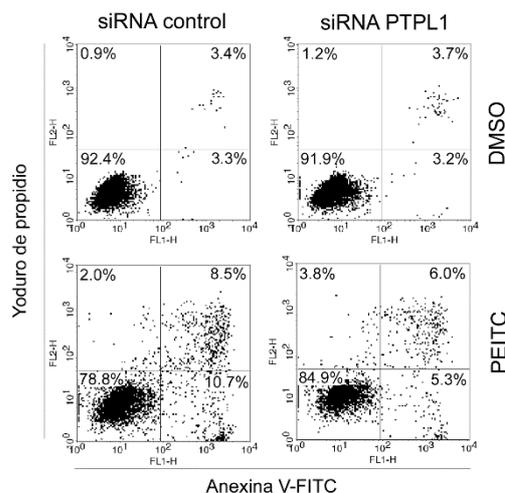
Figura 15: El silenciamiento de PTPL1 en células PC3 produce resistencia a la apoptosis inducida con PEITC y anti-Fas. (A) Silenciamiento de PTPL1 mediante siRNA. Después de 72 h de silenciamiento, la disminución de la expresión de PTPL1 se comprobó mediante western blot y RT-PCR. La cantidad de transcrito de PTPL1 se dividió entre la cantidad de RPL13A para obtener un valor normalizado. El histograma representala media de tres experimentos \pm S.E.M. (B) Las células PC3 se silenciaron con un siRNA PTPL1 marcado con Alexa Fluor 488 durante 24 h y 72 h, se fijaron, se contratiñeron con Dapi y se examinaron en un microscopio de fluorescencia para analizar la eficiencia de transfección. (C) Las células PC3 se silenciaron

para PTPL1 o con un siRNA control y se trataron con DMSO, PEITC 10 μ M o anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 48 h y con PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h. La inducción de apoptosis se detectó mediante western blot de PARP. **(D)** Las células PC3 se silenciaron para PTPL1 o con un siRNA control y se trataron con DMSO o PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h. Se muestran los análisis, mediante western blot, de PARP, caspasas activas 3, 7 y 9, Bcl-x_L, Bak, Bax y Mcl-1. Tanto en **(A)** como en **(C)** y **(D)**, β -actina se muestra como control de carga. El histograma muestra el análisis densitométrico de PARP (85 kDa) y las caspasas activas 3, 7 y 9 en células PC3 silenciadas para PTPL1 o con un siRNA control y tratadas con PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h. Los datos están presentados como la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ del test t de Student, comparando células siRNA control tratadas *versus* células siRNA PTPL1 tratadas.

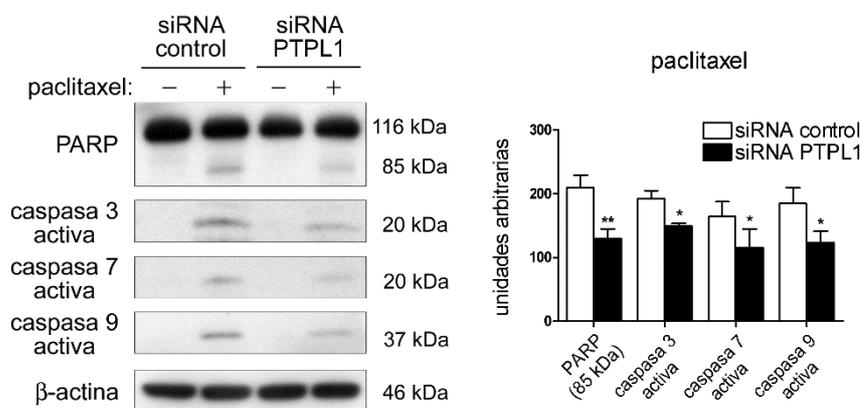
Como el uso del PEITC solo tiene posibles implicaciones terapéuticas, se evaluó el efecto de esta droga en la inducción de apoptosis en presencia o ausencia de PTPL1. Las células PC3 silenciadas para PTPL1 son más resistentes a la apoptosis inducida por PEITC que las células siRNA control, y la activación de las caspasas 3, 7 y 9 también es más evidente en esta última condición (Figura 16 A). Estos datos también se confirmaron mediante ensayos de anexina-V (Figura 16 B). Además, para determinar si la pérdida de sensibilidad apoptótica asociada a la ausencia de PTPL1 está restringida a la apoptosis en presencia de PEITC, se realizó el mismo experimento con una droga diferente como el paclitaxel. De nuevo, las células PC3 silenciadas para PTPL1 son más resistentes a la apoptosis inducida por paclitaxel y las formas activas de las caspasas 3, 7 y 9 son más evidentes en las células siRNA control tratadas con paclitaxel (Figura 16 C). Finalmente, los ensayos de unión de anexina-V (Figura 16 D) mostraron que el porcentaje de células apoptóticas es más alto en células siRNA control tratadas con paclitaxel que en células silenciadas para PTPL1 tratadas con paclitaxel. Todos estos datos indican una función proapoptótica de PTPL1 en células PC3, aunque la extensión de su efecto sobre la apoptosis depende del estímulo utilizado.



B



C



D

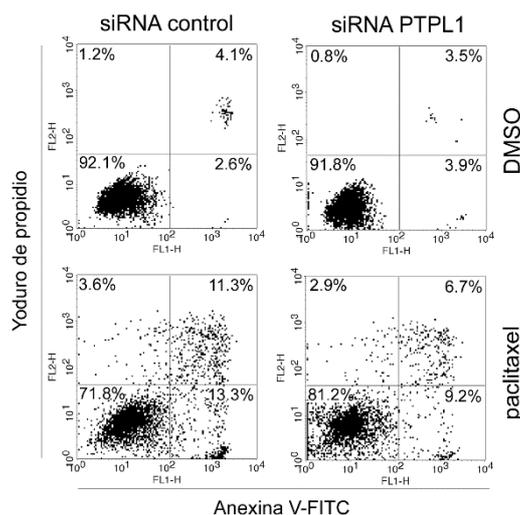


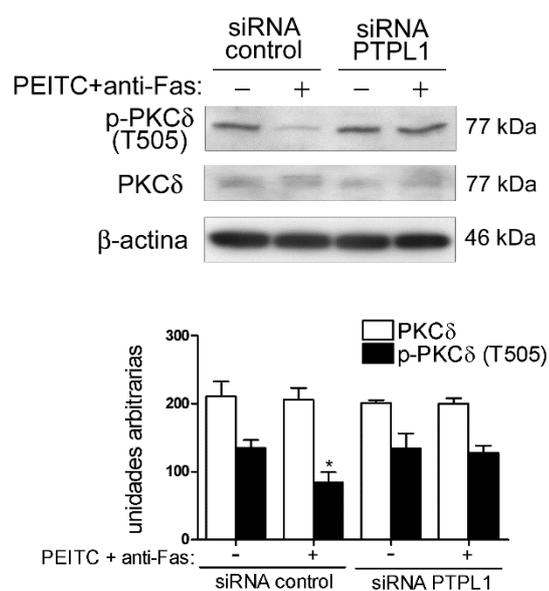
Figura 16: El silenciamiento de PTPL1 en células PC3 también produce resistencia a la apoptosis inducida con PEITC o paclitaxel. (A y B) Las células PC3 se silenciaron para PTPL1 o con un siRNA control y se trataron con PEITC 10 μ M durante 48 h. La inducción de apoptosis se detectó mediante western blot de PARP y caspasas activas 3, 7 y 9 (A) y mediante citometría de flujo de células marcadas con anexina V y yoduro de propidio (B). (C y D) Las células PC3 se silenciaron para PTPL1 o con un siRNA control y se trataron

con paclitaxel 2,5 μ M durante 48 h. La inducción de apoptosis se detectó mediante western blot de PARP y caspasas activas 3, 7 y 9 (C) y mediante citometría de flujo de células marcadas con anexina V y yoduro de propidio (D). Los histogramas en (A) y (C) muestran el análisis densitométrico de PARP (85 kDa) y caspasas activas 3, 7 y 9 en células PC3 silenciadas para PTPL1 o con un siRNA control y tratadas con PEITC 10 μ M (A) o paclitaxel 2,5 μ M (C) durante 48 h. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ del test t de Student, comparando células siRNA control tratadas *versus* células siRNA PTPL1 tratadas.

1.3. PKC δ está implicada en la ruta de transducción de señales mediada por PTPL1

Posteriormente, se examinó si la pérdida de sensibilidad apoptótica observada durante el silenciamiento de PTPL1 está relacionada con cambios en rutas de transducción de señales. Después de examinar varias quinasas clásicas, se observó una disminución de la fosforilación de PKC δ en la treonina 505 (T505, localizada en el sitio de activación de la quinasa) en células PC3 con expresión endógena de PTPL1, tratadas con PEITC y anti-Fas, que estaban sufriendo apoptosis. Por el contrario, las células silenciadas para PTPL1, tratadas de la misma forma, con la apoptosis reducida, mantienen el nivel basal de fosforilación de PKC δ T505. La disminución de la fosforilación se produce en células con expresión endógena de PTPL1, tratadas con PEITC y anti-Fas, PEITC o paclitaxel y no se debe a una disminución de la expresión de PKC δ (Figura 17 A y B).

A



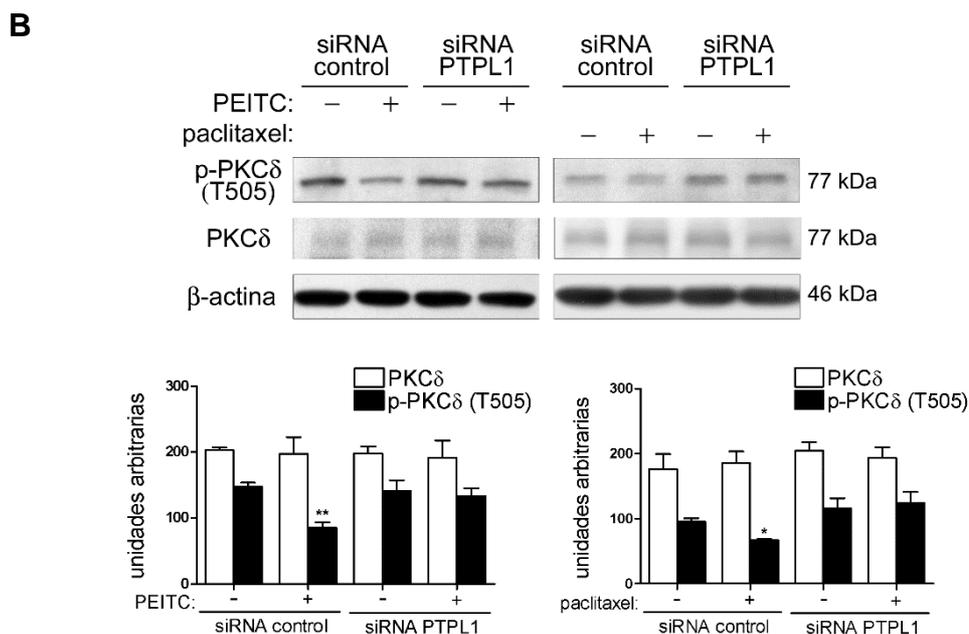


Figura 17: PTPL1 regula la fosforilación de PKC δ en la treonina 505. (A) Las células PC3 se silenciaron para PTPL1 o con un siRNA control y se trataron con DMSO o PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0.5 μ g/ml durante 16 h. Los niveles de expresión de PKC δ total y PKC δ fosforilada en T505 se estudiaron mediante western blot. (B) Las células PC3 se silenciaron para PTPL1 o con un siRNA control y se trataron con PEITC 10 μ M o paclitaxel 2,5 μ M durante 48 h. Los niveles de expresión de PKC δ total y PKC δ fosforilada en T505 se estudiaron mediante western blot. Los histogramas en (A) y (B) muestran el análisis mediante densitometría de PKC δ total y PKC δ fosforilada en T505 en células PC3 silenciadas para PTPL1 o con un siRNA control y tratadas como se indica en cada caso. Los datos representan la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ del test t de Student, comparando PKC δ fosforilada en T505 en células siRNA control y PTPL1 tratadas *versus* no tratadas.

Se ha publicado que PKC δ es una quinasa funcional incluso en ausencia de la fosforilación en T505 (Steinberg, 2004; Liu *et al.*, 2006) y para estudiar en más profundidad la implicación de la regulación de PKC δ dependiente de PTPL1 en apoptosis, se realizó una aproximación utilizando el silenciamiento simultáneo de PTPL1 y PKC δ .

En primer lugar se realizaron experimentos de citometría de flujo con células marcadas con anexina V y yoduro de propidio. Como se observa en la figura 18, el porcentaje de células apoptóticas es más elevado en las células siRNA control tratadas con PEITC y anti-Fas que en el resto de condiciones (45,2% en células siRNA control tratadas *versus* 26,7% en células siRNA PKC δ tratadas, 17,5% en células siRNA PTPL1 tratadas y 10,5% en células siRNA PKC δ y PTPL1 tratadas).

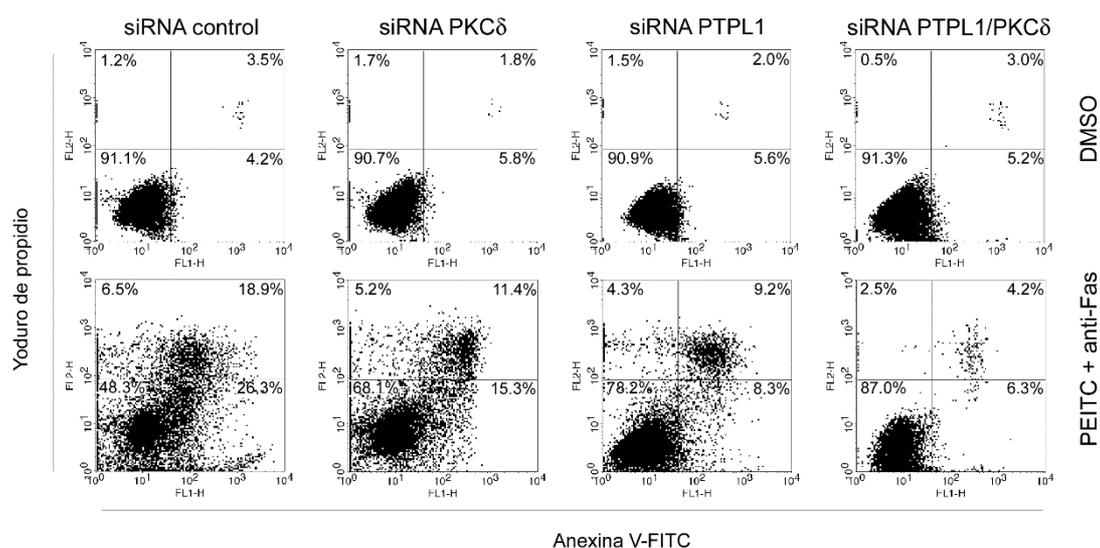


Figura 18: El silenciamiento de PTPL1, PKCδ o ambos disminuye la apoptosis inducida por PEITC y anti-Fas Detección de apoptosis mediante citometría de flujo de células marcadas con anexina V y yoduro de propidio. Las células PC3 se silenciaron con siRNA control, PTPL1, PKCδ y PTPL1/ PKCδ. Para asegurar la misma cantidad de siRNA en todas las condiciones, se añadió el siRNA control a una concentración de 100nM a los siRNAs control, PTPL1 y PKCδ individuales. Las células se trataron con DMSO o PEITC 10 μM durante 1 h más anti-Fas 0,5 μg/ml durante 16 h.

Estos datos también se confirmaron por la disminución de la rotura de PARP y de las caspasas 3, 7 y 9 (Figura 20). Por tanto, el silenciamiento de PKCδ, al igual que el de PTPL1, induce resistencia a la apoptosis tras tratamiento con PEITC y anti-Fas; además, el silenciamiento simultáneo de PTPL1 y PKCδ produce una mayor resistencia a la apoptosis que cualquiera de los dos por separado, como se observa por la rotura de PARP ($P < 0,05$) y en los ensayos de anexina V.

Para confirmar la resistencia a apoptosis obtenida en las células siRNA PKCδ tratadas con PEITC y anti-Fas, las células PC3 se silenciaron para PKCδ y se trataron con PEITC solo o con paclitaxel. Los ensayos de unión de anexina V mostraron una disminución de la apoptosis en las células siRNA PKCδ tras el tratamiento con ambas drogas (Figura 19).

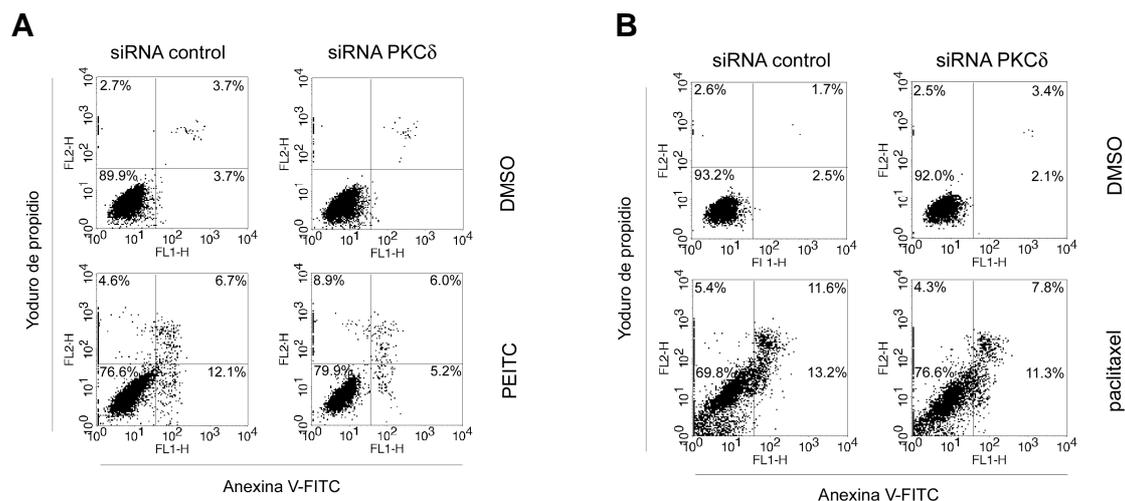
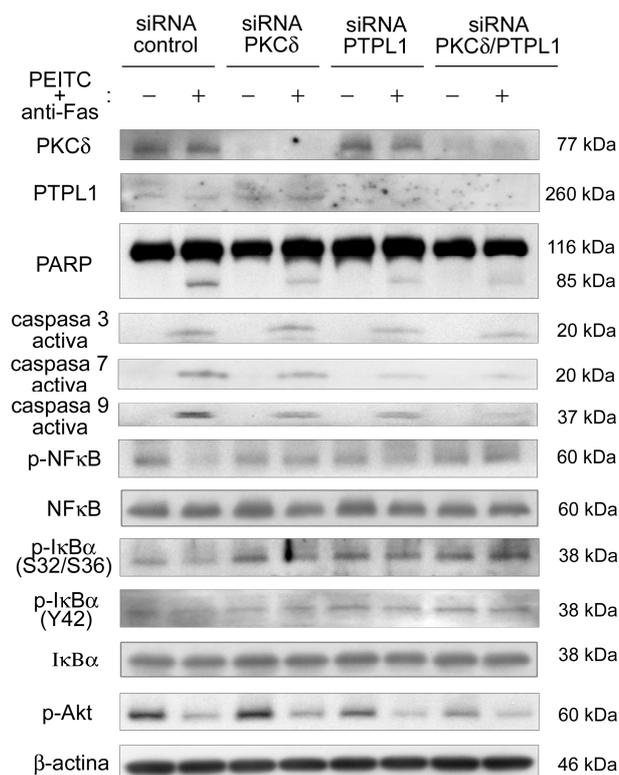


Figura 19: El silenciamiento de PKC δ disminuye la apoptosis inducida por PEITC o paclitaxel. Detección de apoptosis mediante citometría de flujo de células marcadas con anexina V y yoduro de propidio. Las células PC3 se silenciaron con siRNA control o siRNA PKC δ y se trataron con PEITC 10 μ M (A) o paclitaxel 2,5 μ M (B) durante 48 h.

Se ha demostrado que un mutante de PKC δ incapaz de fosforilarse en el sitio de activación, carece de la capacidad de inducir la activación de NF κ B en un ensayo reportero (Liu *et al.*, 2006), por lo que estudiamos el estado de activación de NF κ B, medido por la fosforilación de la serina 276 de la subunidad p65, una fosforilación importante para una actividad transactivadora óptima de NF κ B (Joo & Jetten, 2008). Las células PC3 silenciadas para PKC δ o para PTPL1 y PKC δ mantienen aproximadamente el mismo nivel de fosforilación de NF κ B en S276, tanto en células tratadas con PEITC y anti-Fas como en células no tratadas, mientras que la fosforilación muestra una ligera disminución en células tratadas silenciadas para PTPL1 y una disminución mucho más pronunciada en células tratadas que expresan PTPL1 y PKC δ endógenos (Figura 20). El nivel total de la proteína NF κ B permanece similar. Para comprobar si estos cambios en el estado de activación de NF κ B después del tratamiento con PEITC y anti-Fas estaban acompañados por cambios en la distribución subcelular de la proteína, se realizó una inmunofluorescencia (Figura 21). Las células siRNA control tratadas con PEITC y anti-Fas muestran un marcaje citosólico, mientras que las células siRNA PTPL1 y siRNA PKC δ tratadas de la misma forma muestran

una redistribución de la proteína del citosol al núcleo, de acuerdo con la mayor activación de NFκB detectada en esas condiciones en relación a las células siRNA control.

Después nos centramos en otro regulador de NFκB, IκBα. La fosforilación de IκBα en las serinas 32 y 36 produce su degradación proteolítica y la activación de NF-κB (Fan *et al.*, 2002). La Figura 20 muestra que la fosforilación de IκBα en S32 y 36 presenta la mayor disminución en células PC3 que expresan PTPL1 y PKCδ endógenos tratadas con PEITC y anti-Fas, en comparación con las células tratadas silenciadas para PTPL1, PKCδ o ambas. La fosforilación de IκBα en la tirosina 42 también conduce a su disociación de NFκB, pero sin degradación proteolítica (Fan *et al.*, 2002), por lo que también se evaluó su nivel de fosforilación en las condiciones anteriores. De nuevo, la fosforilación de IκBα en Y42 muestra la mayor disminución en células tratadas que expresan PTPL1 y PKCδ que en cualquier otra condición. Finalmente, el estado de fosforilación de Akt en la serina 473 (fosforilación activadora) también fue evaluado en este contexto. El silenciamiento de PTPL1 produce una disminución de la fosforilación de Akt, pero el tratamiento con PEITC y anti-Fas induce una disminución aún mayor en todas las condiciones, independientemente de la presencia o ausencia de PTPL1 y PKCδ (Figura 20).



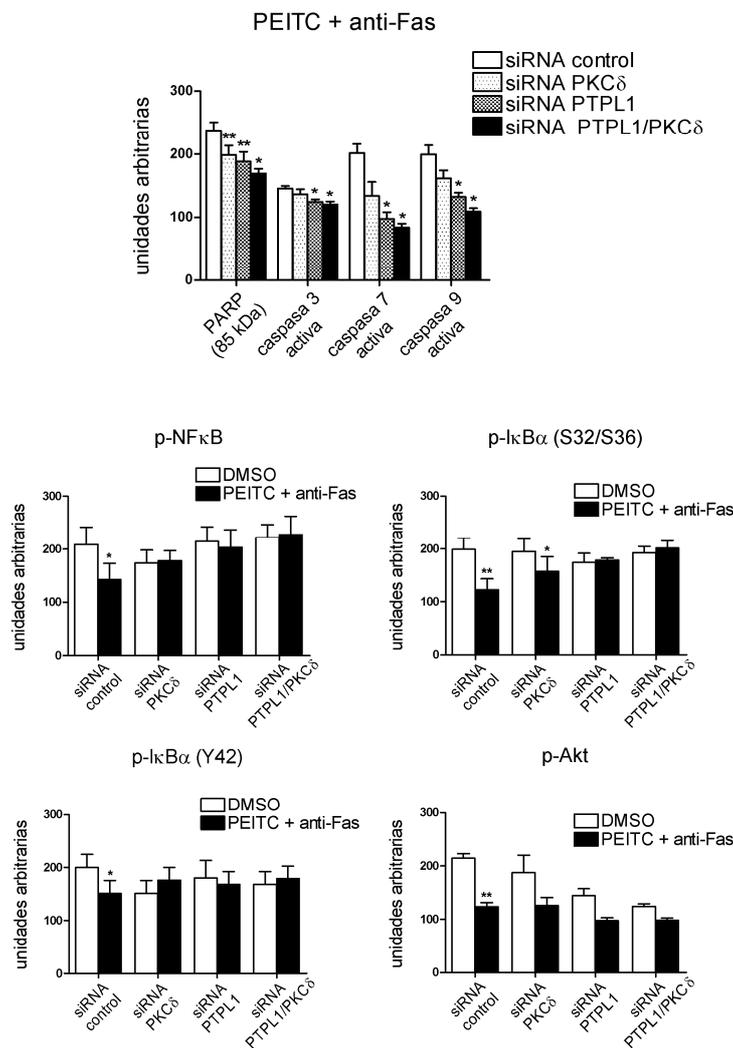


Figura 20: Ruta de transducción de señales regulada por PTPL1. Las células PC3 se silenciaron con siRNA control, PTPL1, PKC δ y PTPL1/ PKC δ , como se explica en la figura 19. Las células se trataron con DMSO o PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h. La detección de las proteínas indicadas se realizó mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico para cada proteína. Los datos representan la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ del test t de Student, comparando, en el caso de PARP (85 kDa) y de las caspasas activas, células tratadas para cada siRNA *versus* células siRNA control tratadas y, para el resto de proteínas, células tratadas *versus* no tratadas para cada condición de siRNA.

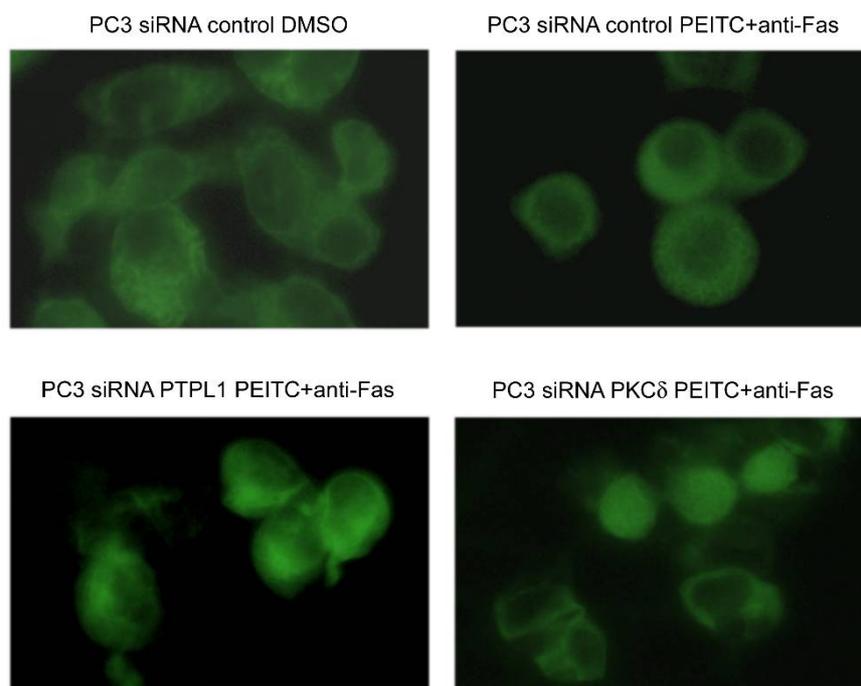


Figura 21: Influencia del silenciamiento de PTPL1 y PKC δ sobre la distribución subcelular de NF κ B. Las células PC3 se silenciaron con siRNA control, PTPL1, y PKC δ , y se trataron con DMSO o PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h. Posteriormente se fijaron con metanol y se realizó una inmunofluorescencia para NF κ B.

1.4. La sobreexpresión PTPL1 o PKC δ potencia la inducción de apoptosis en células PC3

Para confirmar la función en apoptosis de PTPL1 y PKC δ , las células PC3 se transfectaron transitoriamente con plásmidos que contenían PTPL1 o PKC δ y se trataron posteriormente con PEITC y anti-Fas. Los ensayos de unión de anexina V mostraron un aumento de las células apoptóticas tanto en células transfectadas con PTPL1 como con PKC δ (46,4% en células tratadas transfectadas con el vector vacío *versus* 54,9% en células tratadas transfectadas con PTPL1 y 65,6% en células tratadas transfectadas con PKC δ) (Figura 22).

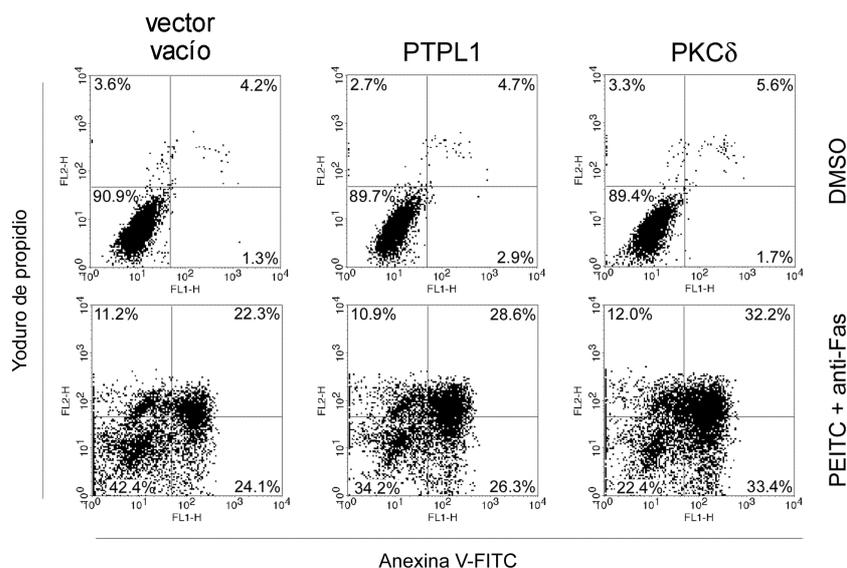
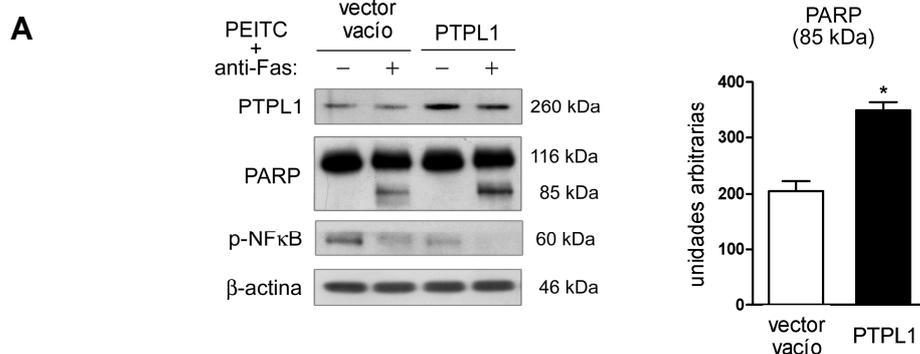


Figura 22: La sobreexpresión dePTPL1 y PKCδ aumenta la apoptosis inducida por PEITC y anti-Fas en células PC3. Detección de apoptosis, mediante citometría de flujo, de células marcadas con anexina V y yoduro de propidio. Las células PC3 se transfectaron transitoriamente con vector vacío, PTPL1 o PKCδ, y se trataron con DMSO o PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h.

De acuerdo con los resultados anteriores, el aumento en la expresión de PTPL1 aumenta la rotura de PARP tras tratamiento (Figura 23 A), de forma estadísticamente significativa ($P < 0,05$). Las células PC3 transfectadas con PKCδ y tratadas de la misma forma, también muestran más rotura de PARP que las células transfectadas con el vector vacío, de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (Figura 23 B). También se examinó la activación de NFκB en estas condiciones; NFκB fosforilado fue casi indetectable en células tratadas transfectadas con PTPL1 o PKCδ (Figura 23 A y B), de acuerdo con los resultados obtenidos en los silenciamientos.



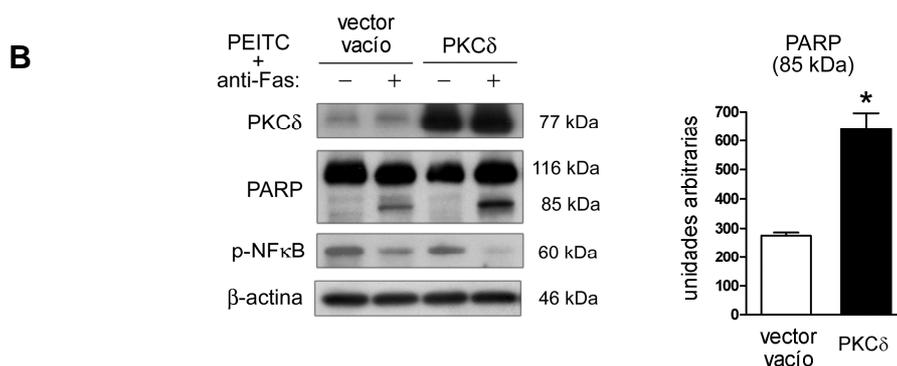


Figura 23: La sobreexpresión de PTPL1 o PKC δ sensibiliza a las células PC3 a la apoptosis inducida por PEITC más anti-Fas. Las células PC3 se transfectaron transitoriamente con vector vacío, PTPL1 (A) o PKC δ (B) y se trataron con DMSO o PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h. La detección de las proteínas indicadas se realizó mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. El histograma muestra el análisis densitométrico de la banda de 85 kDa de la proteína PARP. Los datos representan la media \pm S.E.M. (n = 3). * P < 0,05 del test t de Student.

Después, las células PC3 se transfectaron con PTPL1 y se silenciaron para PKC δ simultáneamente, y se trataron con PEITC y anti-Fas, para comprobar si el aumento en la apoptosis obtenido tras transfectar con PTPL1 revierte al silenciar PKC δ . Como se observa en la Figura 24, la rotura de PARP disminuye en células tratadas transfectadas con PTPL1 y silenciadas para PKC δ , comparado con las células transfectadas con PTPL1, ilustrando de nuevo la relevancia de PKC δ en la señalización mediada por PTPL1 en esta línea celular.

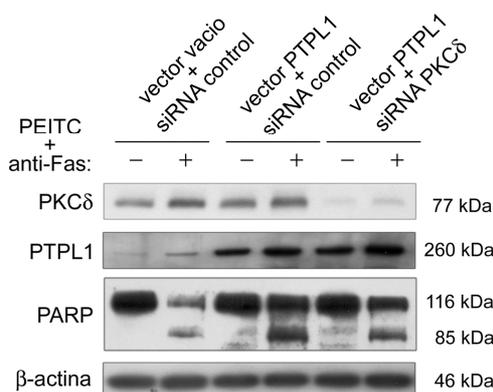


Figura 24: La sobreexpresión de PTPL1 y el silenciamiento simultáneo de PKC δ revierten parcialmente el aumento de apoptosis obtenido con la sobreexpresión de PTPL1. Las células PC3 se co-transfectaron transitoriamente con vector vacío y siRNA control, vector PTPL1 y siRNA control o vector PTPL1 y siRNA PKC δ , y se trataron con DMSO o PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h. La detección de las proteínas indicadas se realizó mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. El experimento se realizó tres veces.

Finalmente, para comprobar que el aumento en la inducción de apoptosis observado en células transfectadas con PTPL1 o PKC δ tratadas con PEITC y anti-Fas

también tiene lugar con otros estímulos, las células transfectadas se trataron con paclitaxel. Tanto las células transfectadas con PTPL1 como con PKC δ mostraron un aumento en la rotura de PARP después del tratamiento con la droga, de forma estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (Figura 25 A y B).

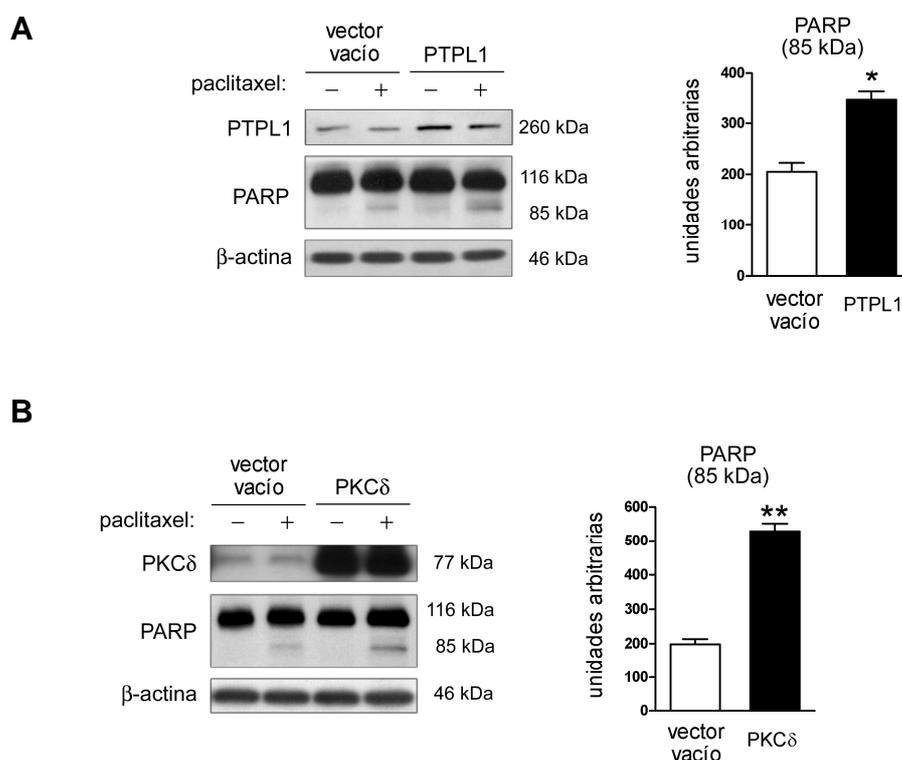


Figura 25: La sobreexpresión de PTPL1 o PKC δ sensibiliza a las células PC3 a la apoptosis inducida por paclitaxel. Las células PC3 se transfectaron transitoriamente con vector vacío, PTPL1 (A) o PKC δ (B) y se trataron con DMSO o paclitaxel 2,5 μ M durante 48 h. La detección de las proteínas indicadas se realizó mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de la banda de 85 kDa de la proteína PARP. Los datos representan la media \pm S.E.M. (n = 3). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ del test t de Student.

1.5. El silenciamiento de PTPL1 y PKC δ induce resistencia a apoptosis en células

LNCaP

Para estudiar si la función en apoptosis de PTPL1 y PKC δ observada en células PC3 se puede extender a otra línea celular de cáncer de próstata, PTPL1 y PKC δ se silenciaron mediante siRNA en células LNCaP. Las células silenciadas se trataron con PEITC y anti-Fas y se midió la inducción de apoptosis mediante la rotura de PARP (Figura 26). Tanto

las células LNCaP silenciadas para PTPL1, como para PKC δ , son más resistentes a la apoptosis inducida con el tratamiento que las células siRNA control, con diferencias en la rotura de PARP estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Figura 26). Después examinamos el estado de activación de NF κ B en este contexto, para comprobar si PTPL1 y PKC δ influyen en la señalización sobre NF κ B, como en el caso de las células PC3. La fosforilación de NF κ B disminuye tanto en células siRNA PTPL1 como en células siRNA PKC δ tratadas, de forma similar a lo que ocurre en células siRNA control tratadas (Figura 26); por tanto, PTPL1 y PKC δ no parecen influir sobre la fosforilación de NF κ B en esta línea celular.

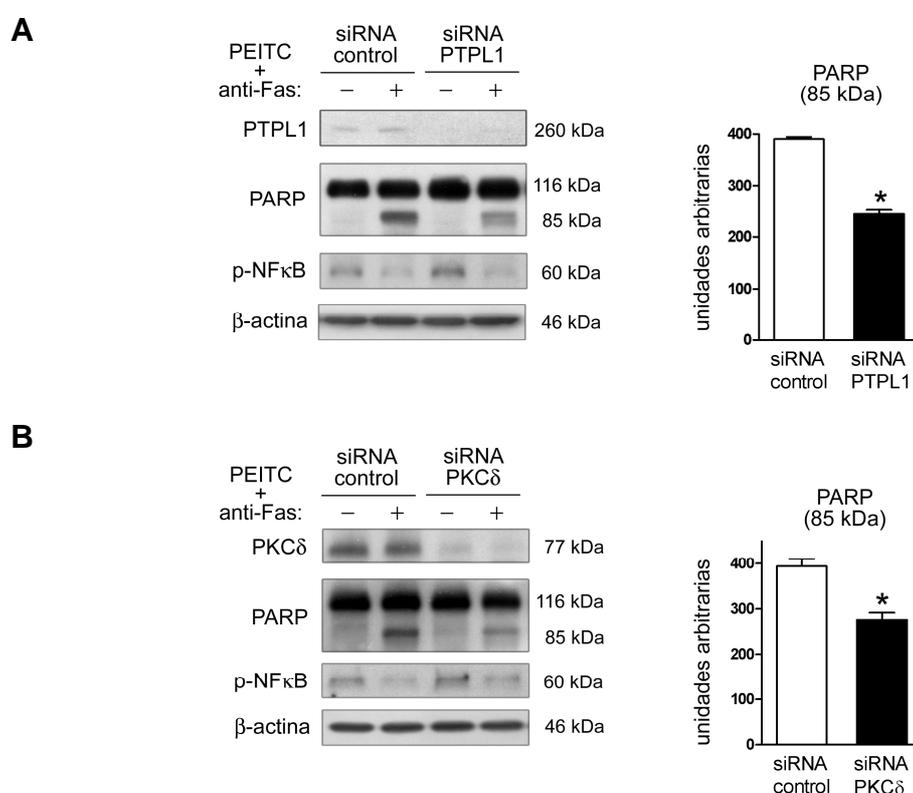


Figura 26: El silenciamiento de PTPL1 y/o PKC δ promueve resistencia a la apoptosis inducida por PEITC más anti-Fas en células LNCaP. Las células LNCaP se silenciaron con siRNA control, PTPL1 (A) o PKC δ (B) y se trataron con DMSO o PEITC 10 μ M durante 1 h más anti-Fas 0,5 μ g/ml durante 16 h. La detección de las proteínas indicadas se realizó mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de la banda de 85 kDa de la proteína PARP. Los datos representan la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ del test t de Student.

Posteriormente, se realizó la misma aproximación experimental indicada arriba pero utilizando paclitaxel como inductor de apoptosis. Tanto las células silenciadas para PTPL1 como para PKC δ tratadas con paclitaxel, mostraron una disminución en la rotura de PARP,

comparadas con las células siRNA control tratadas, pero las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en el caso de las células siRNA PKC δ ($P < 0,05$) (Figura 27).

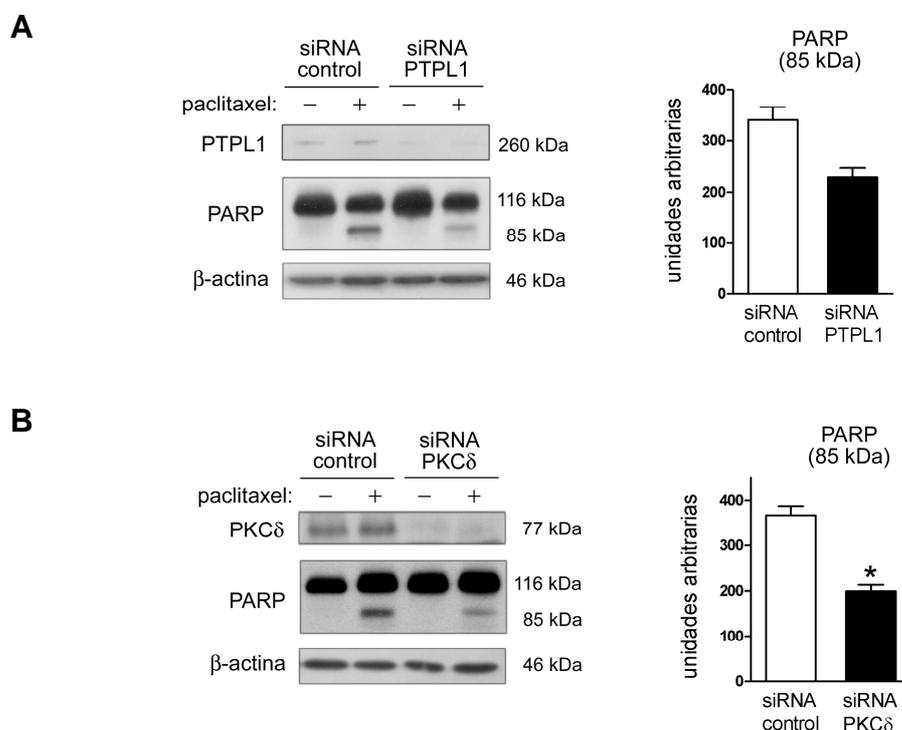


Figura 27: El silenciamiento de PTPL1 y/o PKC δ promueve resistencia a la apoptosis inducida por paclitaxel en células LNCaP. Las células LNCaP se silenciaron con siRNA control, PTPL1 (A) o PKC δ (B) y se trataron con DMSO o paclitaxel 2,5 μ M durante 48h. La detección de las proteínas indicadas se realizó mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de la banda de 85 kDa de la proteína PARP. Los datos representan la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ del test t de Student.

1.6. Expresión de PTPL1 y PKC δ en cánceres de próstata humanos

Finalmente, se realizó un análisis mediante inmunohistoquímica en 76 biopsias de cáncer de próstata agrupadas en una matriz de tejidos (Figura 28). El marcaje de PTPL1 es principalmente citoplasmático. Las glándulas neoplásicas muestran diferentes grados de inmunotinción positiva para PTPL1. Concretamente, los tumores bien diferenciados, con bajo grado de Gleason, presentan una fuerte positividad para PTPL1, mientras que los tumores pobremente diferenciados, de alto grado de Gleason, presentan un marcaje débil o nulo. Para verificar que estas diferencias son estadísticamente significativas, se realizó

un análisis estadístico que mostró una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la expresión inmunohistoquímica de PTPL1 y el grado de Gleason. La inmunotinción de PKC δ también es citoplásmica. Se aprecia un patrón de expresión similar al observado para PTPL1; los tumores bien diferenciados, con bajo grado de Gleason muestran un mayor nivel de expresión de PKC δ que los tumores pobremente diferenciados, de alto grado de Gleason, también de forma estadísticamente significativa ($P < 0,01$).

Grado de Gleason	Nº de pacientes	Expresión de PTPL1, n (%)		P^a
		Negativa/Baja	Alta	
3-6	26	8 (30,8)	18 (69,2)	<0,026
7-10	45	27 (60,0)	18 (40,0)	

Grado de Gleason	Nº de pacientes	Expresión de PKC δ , n (%)		P^a
		Negativa/Baja	Alta	
3-6	27	8 (29,6)	19 (70,4)	<0,0001
7-10	46	44 (95,7)	2 (4,3)	

^a P del test exacto de Fisher.

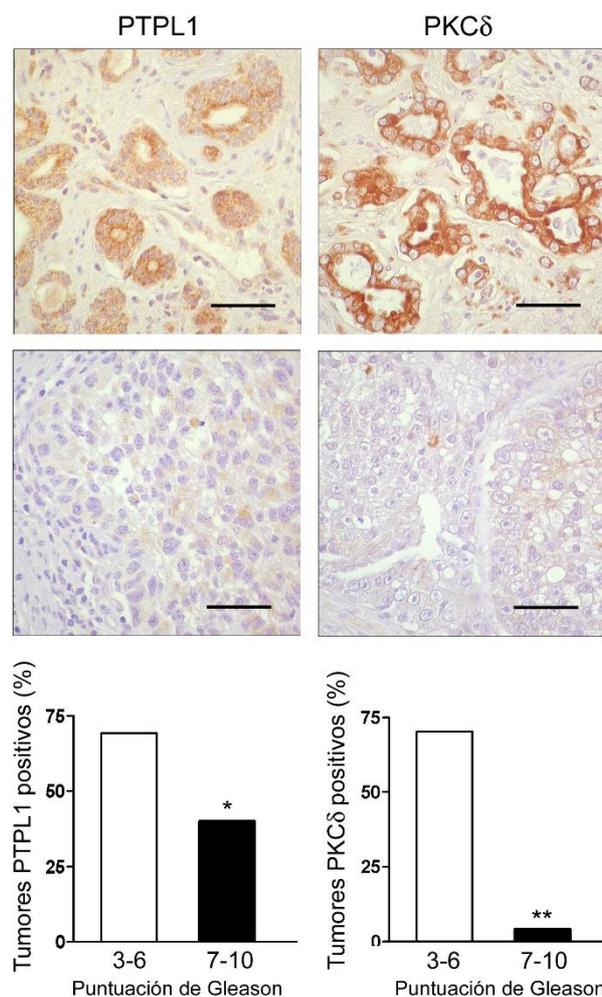


Figura 28: Expresión inmunohistoquímica de PTPL1 y PKCδ en cánceres de próstata humanos. Microfotografías representativas de la inmunotinción de PTPL1 y PKCδ en carcinomas prostáticos bien diferenciados, con bajo grado de Gleason (paneles superiores) y pobremente diferenciados, con alto grado de Gleason (paneles inferiores). Barras, 50 μ m. Los histogramas muestran los porcentajes de tumores positivos para PTPL1 y PKCδ con grado de Gleason 3-6 (bien diferenciados) y 7-10 (pobremente diferenciados). La asociación entre PTPL1 o PKCδ y el grado de Gleason se analizó mediante el test exacto de Fisher. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

2. PAPEL DE PTPL1 EN INVASIÓN Y CICLO CELULAR

2.1. El silenciamiento de PTPL1 induce un fenotipo más invasivo en células PC3

Primero, se realizó un ensayo de cierre de herida para probar el efecto del silenciamiento de PTPL1 sobre la migración celular. Como se observa en la Figura 29 A, las células silenciadas para PTPL1 muestran una disminución de la migración comparadas con las células siRNA control, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

Posteriormente, para evaluar la capacidad invasiva de las células PC3 silenciadas para PTPL1, se realizó un ensayo con Matrigel. Se dejó migrar a células PC3 siRNA control y siRNA PTPL1 a través de insertos cubiertos con Matrigel e insertos control. Las células que migraron hacia la superficie inferior de cada tipo de inserto se fotografiaron y contaron. El porcentaje de invasión se calculó como el número de células que migró a través del inserto cubierto con Matrigel (+ECM) relativo a la migración a través del inserto control (-ECM). Se observa que el silenciamiento de PTPL1 aumenta el porcentaje de invasión un 13,7% ($23,6\% \pm 6,1$ en células siRNA control *versus* $37,3\% \pm 4,2$ en células siRNA PTPL1), de forma estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (Figura 29 B). Por tanto, el silenciamiento de PTPL1 endógeno aumenta el potencial invasivo de las células PC3.

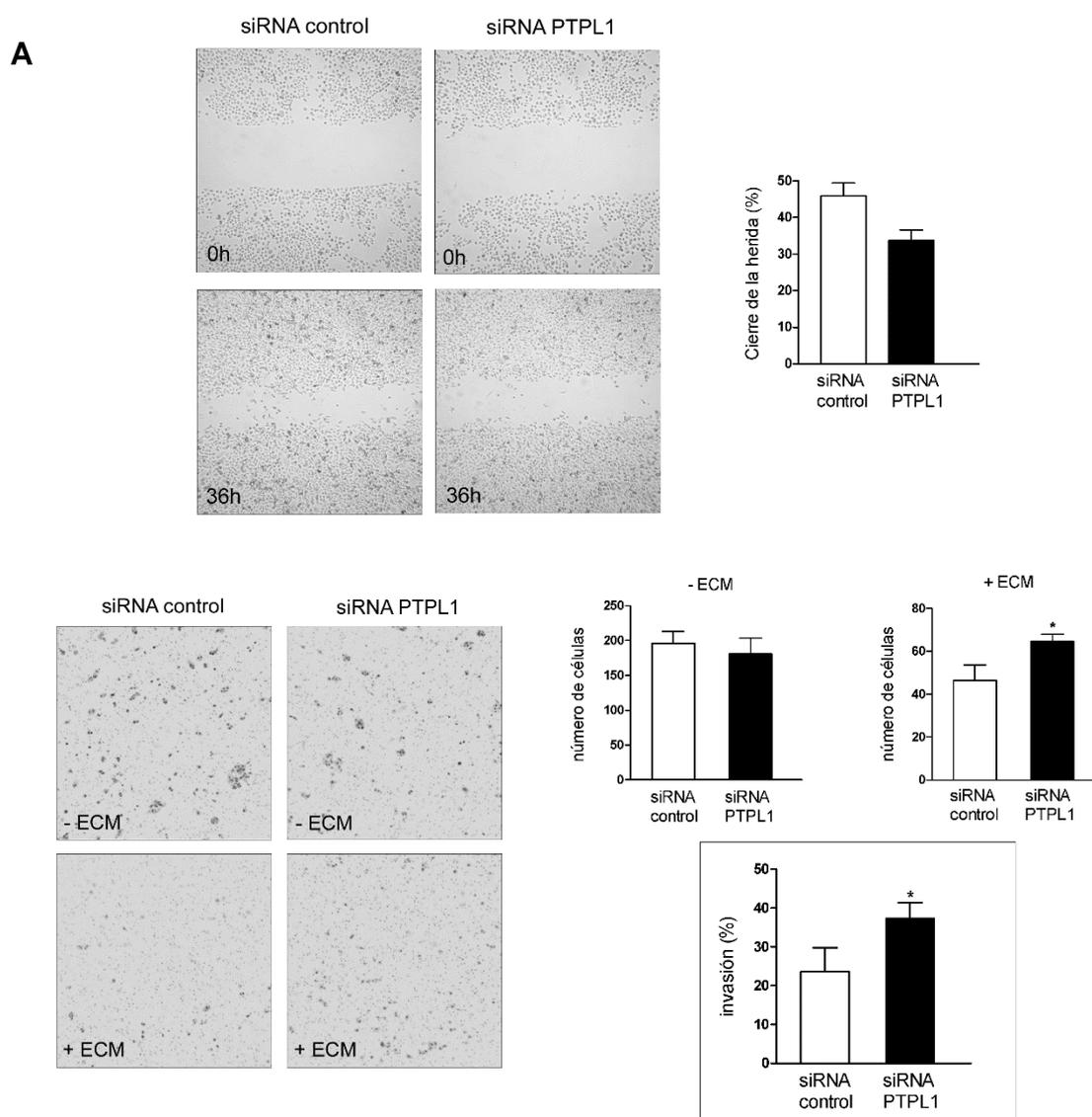


Figura 29: El silenciamiento de PTPL1 aumenta la capacidad invasiva de las células PC3 *in vitro*. (A) Se realizó un ensayo de cierre de la herida para determinar la motilidad de las células PC3 siRNA control y siRNA PTPL1. La cuantificación se realizó midiendo el área de la herida a 0 y 36 h, y calculando el porcentaje de cierre de la herida para cada condición. El experimento se realizó tres veces. (B) Ensayo de invasión. Las células PC3 se silenciaron con un siRNA control o con siRNA PTPL1 durante 24 h, se tripsinizaron, se resuspendieron en medio libre de suero y se añadieron a los insertos PET no cubiertos (-ECM) o cubiertos con Matrigel (+ECM). Se dejó invadir a las células durante 48h y los insertos se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. El experimento se realizó cinco veces con cada muestra por duplicado. Los datos representan la media \pm S.E.M. * $P < 0,05$ del test t de Student, comparando células siRNA control *versus* células silenciadas para PTPL1. Se muestran fotografías representativas.

2.2. El silenciamiento de PTPL1 en células PC3 y DU145 induce un aumento de expresión de genes y proteínas relacionados con la invasión

Para confirmar los resultados obtenidos con los ensayos de Matrigel, se realizó una matriz de cDNA de genes relacionados con la invasión. El patrón de expresión génica de las células PC3 silenciadas para PTPL1 comparado con el de las células siRNA control muestra un patrón de genes expresados diferencialmente. Los genes que presentaron un aumento de expresión fueron los siguientes (incremento entre paréntesis): *Osteopontina* (2,21), *integrina $\alpha 6$* (2,16), *PAI-1* (2,01), *integrina $\beta 5$* (1,95), *uPA* (1,74), *tPA* (1,73), *uPAR* (1,54) y *laminina $\gamma 1$* (1,51). Algunos de estos genes inducidos se validaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). La figura 30 A muestra el silenciamiento de PTPL1 a nivel de mRNA en células PC3. Los resultados de qPCR concuerdan completamente con los del array de cDNA. En células PC3 silenciadas para PTPL1, comparado con células siRNA control, se observa una inducción de *uPA*, *uPAR*, *tPA*, *PAI-1*, *integrina $\alpha 6$* y *osteopontina* (Figura 30 B). Este aumento de expresión fue estadísticamente significativo en el caso de los genes *uPA*, *uPAR*, *tPA*, *PAI-1* e *integrina $\alpha 6$* . Para examinar si los resultados obtenidos en células PC3 pueden extenderse a otra línea tumoral de cáncer de próstata, se estudió la expresión de los mismos genes en células DU145 siRNA control y siRNA PTPL1. El silenciamiento de PTPL1 a nivel de mRNA en células DU145 se muestra en la Figura 30 A. *uPA*, *uPAR*, *integrina $\alpha 6$* y *osteopontina* también se encuentran inducidos en células DU145 silenciadas para PTPL1, de forma estadísticamente significativa en el caso de *uPA*, *uPAR* e *integrina $\alpha 6$* . Sin embargo, se observa una disminución de la

expresión de *tPA* y *PAI-1* en esa misma condición, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 30 B).

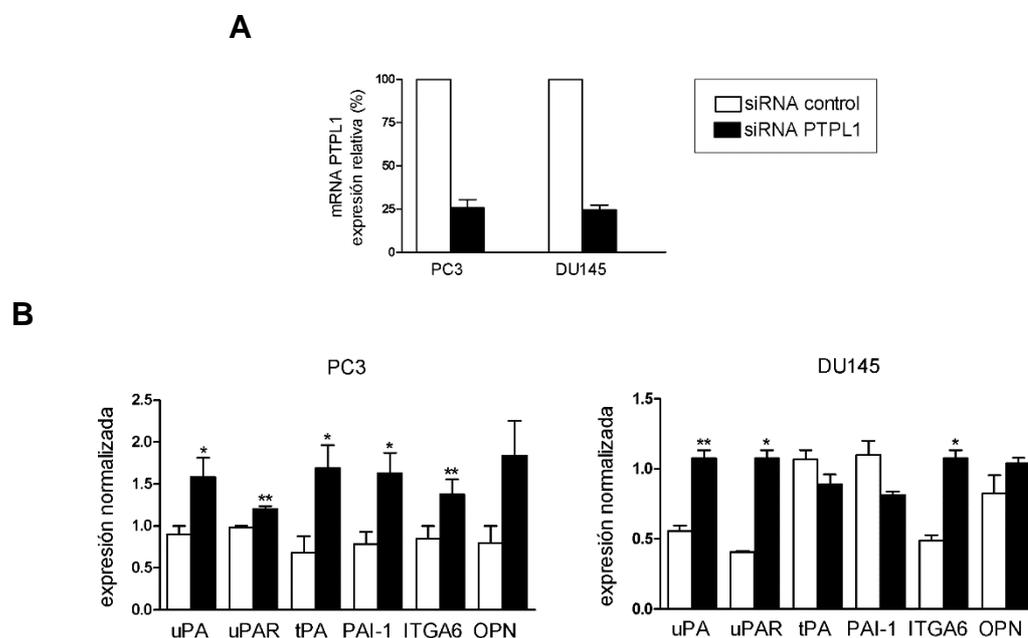


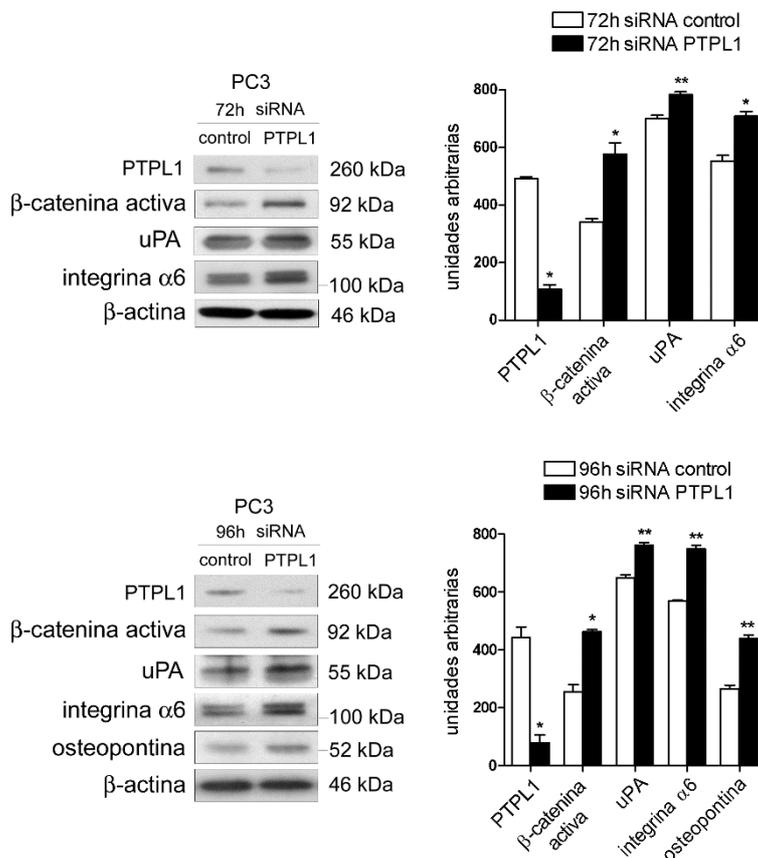
Figura 30: Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de *PTPL1* y genes relacionados con invasión en células PC3 y DU145 silenciadas con siRNA control o *PTPL1* durante 72h. (A) Disminución de la expresión de *PTPL1* en células PC3 y DU145. (B) Análisis de la expresión de *uPA*, *uPAR*, *tPA*, *PAI-1*, integrina $\alpha 6$ (*ITGA6*) y osteopontina (*OPN*) en células PC3 y DU145 siRNA control y *PTPL1*. (A y B) La cantidad de cada transcrito se dividió entre la cantidad de *HPRT1* para obtener un valor normalizado. Los histogramas representan la media de tres experimentos \pm S.E.M. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ del test *t* de Student, comparando células siRNA control versus células silenciadas para *PTPL1*.

Finalmente, para verificar los resultados obtenidos con la matriz de cDNA y la qPCR, se realizó un análisis mediante Western blot de las proteínas uPA, integrina $\alpha 6$ y osteopontina en células PC3 y DU145 siRNA control y silenciadas para *PTPL1*. También se examinó el nivel de expresión de β -catenina activa, otra proteína implicada en invasión y un regulador transcripcional de uPA y uPAR en el carcinoma colorrectal (Hiendlmeyer *et al.*, 2004; Wanget *et al.*, 2010).

Se observa un aumento de las proteínas uPA e integrina $\alpha 6$ tanto en células PC3 como en células DU145 silenciadas para *PTPL1* durante 72 y 96 h, confirmando los resultados previos. La activación de β -catenina también es mayor en ambas líneas

celulares silenciadas para PTPL1 a los dos tiempos (Figura 31). La expresión de osteopontina también se eleva en ambas líneas tras 96 h de silenciamiento (Figura 31).

A



B

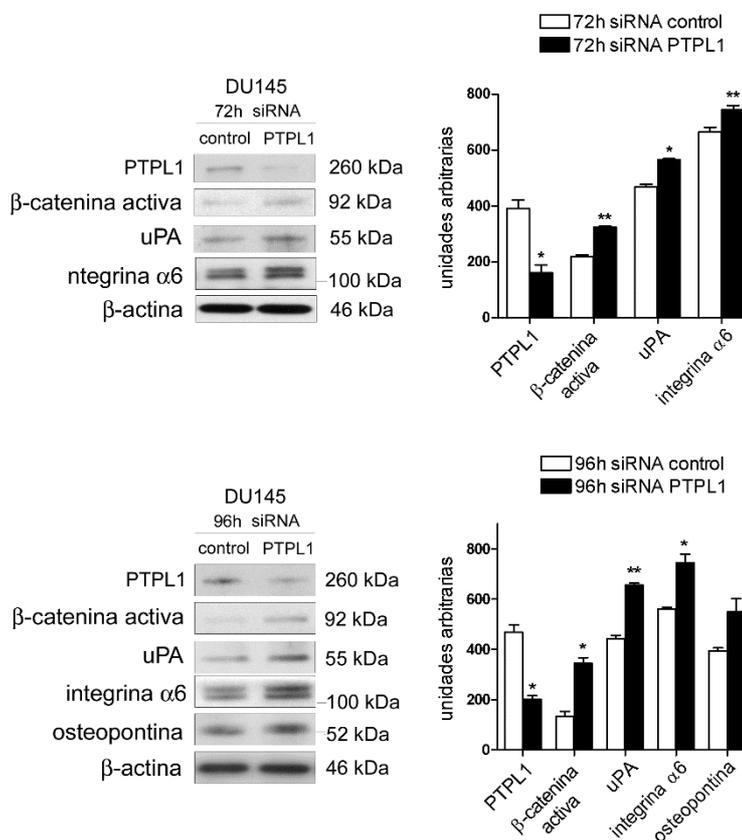
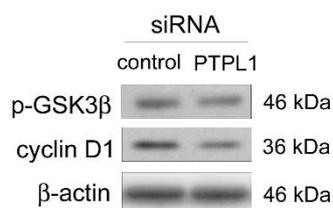


Figura 31: Análisis mediante western blot de PTPL1, β -catenina activa, uPA, integrina $\alpha 6$ y osteopontina en células PC3 (A) y DU145 (B) silenciadas con un siRNA control o PTPL1 durante 72 h y 96 h. El nivel de expresión de β -actina se utilizó para asegurar una carga similar. Los análisis densitométricos de las proteínas se muestran como histogramas. Las barras representan la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ del test t de Student.

Todos estos datos apuntan hacia un papel de PTPL1 en la regulación de la expresión de proteínas relacionadas con la invasión como uPA, integrina $\alpha 6$, osteopontina o β -catenina.

β -catenina es una proteína dual que puede regular la adhesión célula-célula y la activación génica. Cuando se activa la ruta canónica Wnt/ β -catenina, se bloquea la fosforilación de β -catenina por la caseína quinasa 1α y la glucógeno sintetasa 3β (GSK3 β). Esta inhibición impide su degradación y facilita la traslocación de β -catenina al núcleo, donde actúa como un coactivador transcripcional (Yokoyama *et al.*, 2014). Nos planteamos estudiar si la regulación que ejerce PTPL1 sobre β -catenina tiene efecto sobre su localización (adhesión celular) y/o sobre la expresión génica. Para ello, estudiamos la expresión de una de las quinasas que fosforila a β -catenina y promueve su degradación, GSK3 β , y de una de sus dianas transcripcionales conocidas, la ciclina D1. La figura 32 A muestra la disminución de la expresión de la ciclina D1 tras el silenciamiento de PTPL1 en células PC3, mientras que los niveles de GSK3 β fosforilada (inactiva) permanecen prácticamente sin cambios. El estudio de la localización de β -catenina se realizó mediante inmunofluorescencia en células PC3 siRNA control y PTPL1. En células siRNA control se observa marcaje en la membrana plasmática de la mayoría de células, sin embargo, este marcaje disminuye en membrana y aparece en citosol en células silenciadas para PTPL1 (Figura 32 B).

A



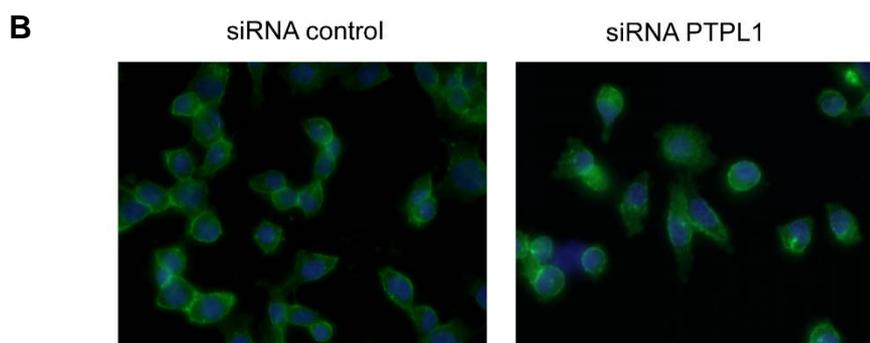
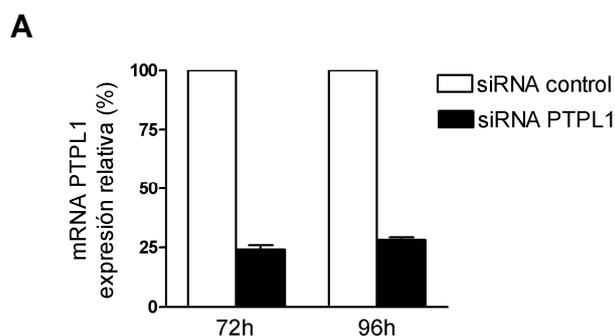


Figura 32: PTPL1 influye sobre la localización de β -catenina. Las células PC3 se silenciaron con un siRNA control o PTPL1 durante 72h. (A) Análisis mediante western blot de p-GSK3 (inactiva) y ciclina D1. (B) Inmunofluorescencia para β -catenina. Los núcleos se contratiñeron con Dapi.

2.3. Las células PC3 silenciadas para PTPL1 muestran cambios en el perfil de ciclo celular

Posteriormente, se estudió si el silenciamiento de PTPL1 podía modificar la distribución del ciclo celular en células PC3. Por tanto, se analizó el contenido en DNA de células PC3 siRNA control y PTPL1 marcadas con yoduro de propidio mediante citometría de flujo a dos tiempos y se cuantificó el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. Las células silenciadas para PTPL1 durante 72horas(Figura 33 A) mostraron un aumento del 10,1% de las células en fase G_0/G_1 y una disminución del 7,0% y del 3,1% de las células en fases S y G_2/M respectivamente, en relación a las células siRNA control (Figura 33 B). Además, la diferencia en el porcentaje de células en fase G_0/G_1 entre las células siRNA control y las células siRNA PTPL1 es estadísticamente significativa (Figura 33 B). De forma similar, las células silenciadas para PTPL1 durante 96 horas (Figura 33 A) muestran un aumento del 8,9% de las células en fase G_0/G_1 respecto a las células siRNA



control ($P < 0,05$) y una disminución del 6,6% y del 2,3% de las células en fases S y G_2/M respectivamente (Figura 33 B).

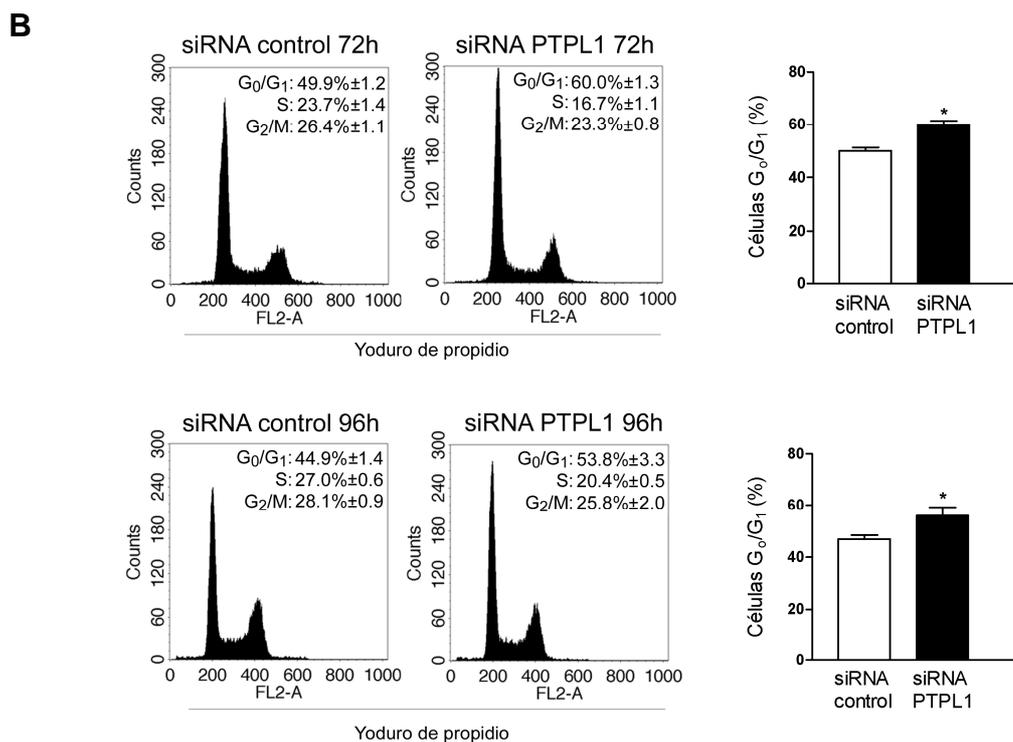


Figura 33: La disminución de la expresión de PTPL1 induce cambios en el ciclo celular. Las células PC3 se silenciaron con un siRNA control o PTPL1 durante 72 y 96 h. **(A)** La disminución de la expresión de PTPL1 se monitorizó mediante RT-PCR. La cantidad de transcrito de PTPL1 se dividió entre la cantidad de HPRT1 para obtener un valor normalizado. **(B)** Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. El porcentaje de células en las distintas fases del ciclo se cuantificó con el programa ModFit. Los histogramas representan la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ del test t de Student.

Para confirmar estos resultados, se realizó un ensayo de proliferación contando el número de células después de 24, 48, 72 y 96 horas de silenciamiento. En todos los tiempos, el número de células silenciadas para PTPL1 es menor que el número de células siRNA control y el tiempo de duplicación de 0 a 96 horas fue de 30,4 horas para las células siRNA control y de 38,2 horas para las células siRNA PTPL1. Además, la diferencia entre las células siRNA control y PTPL1 a 72 y 96 horas fue estadísticamente significativa (Figura 34 A). También se realizó otro ensayo de proliferación midiendo la incorporación de BrdU en células que están sintetizando DNA por citometría de flujo. De acuerdo con los resultados de ciclo, las células PC3 silenciadas para PTPL1 muestran una disminución del 8,3% en las células proliferativas, comparado con las células siRNA control ($20,5\% \pm 3,3$ versus $28,8\% \pm 4,0$) de forma estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (Figura 34 B).

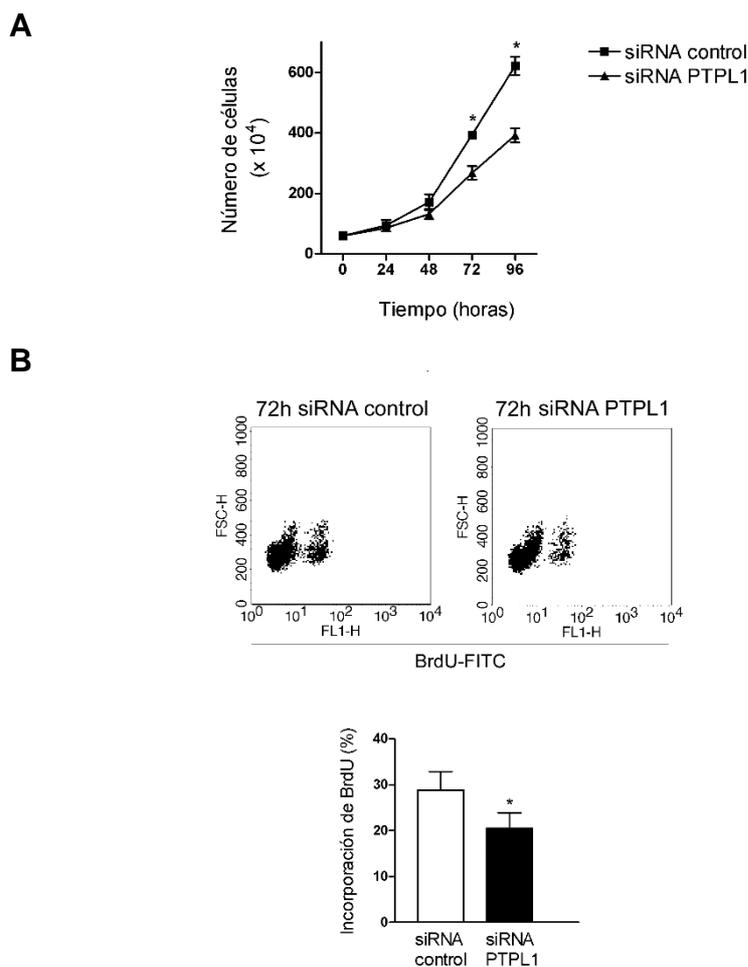


Figura 34: La disminución de la expresión de PTPL1 induce cambios en la proliferación. (A) Las células PC3 silenciadas con un siRNA control o PTPL1 se contaron después de 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de silenciamiento. (B) Análisis mediante citometría de flujo de la incorporación de BrdU después de 72 h de silenciamiento. Los datos se representan como la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ del test t de Student.

Finalmente, estos resultados también se confirmaron mediante Western blot de varias proteínas relacionadas con el ciclo celular. Como se observa en la figura 35, las células PC3 silenciadas para PTPL1 durante 72 y 96 horas muestran una disminución de los niveles de expresión de las ciclinas E y B1, PTTG1, histona H3 fosforilada y PCNA, de forma concordante con la disminución de la proliferación encontrada en esa condición.

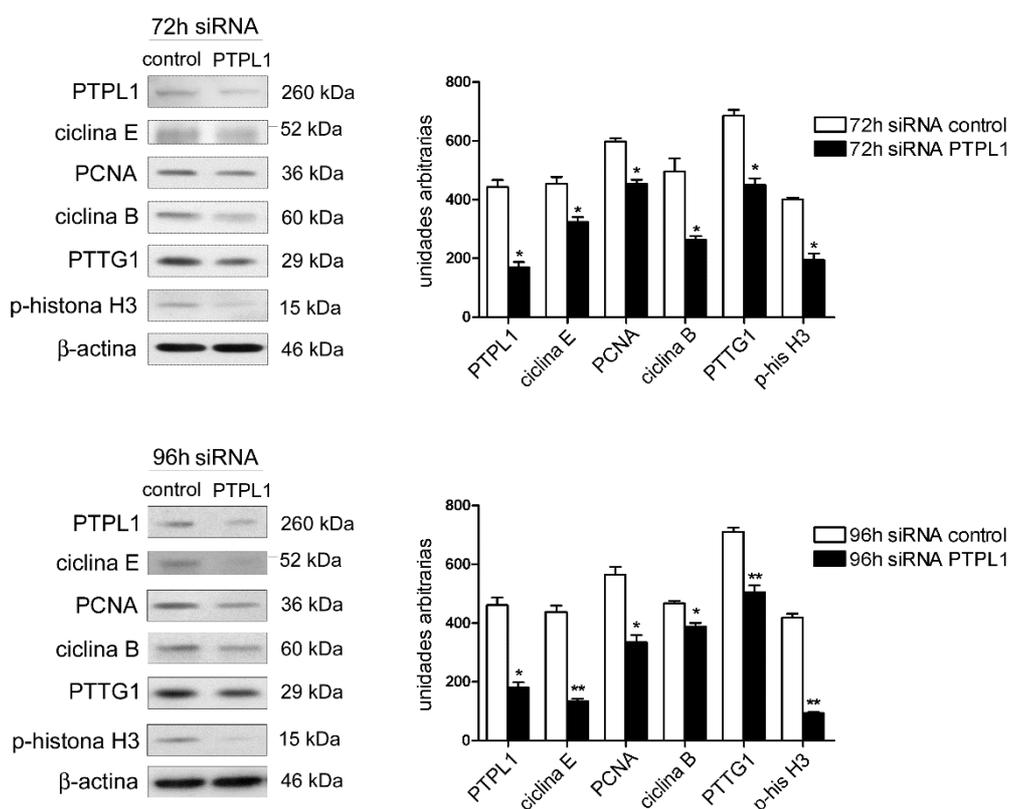


Figura 35: Análisis mediante western blot de las proteínas PTPL1, ciclina E, PCNA, ciclina B, PTTG1 y fosfo-histona H3 (p-histona H3). Los análisis densitométricos de los niveles de expresión de las proteínas estudiadas se muestran como histogramas. Las barras representan la media \pm S.E.M. ($n = 3$). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ del test t de Student.

2.4. El silenciamiento de PTPL1 produce una disminución de la apoptosis y del deslizamiento tras tratamiento con paclitaxel, en células PC3

Para estudiar con mayor profundidad los efectos del silenciamiento de PTPL1 sobre el ciclo celular y la apoptosis, las células PC3 siRNA control y siRNA PTPL1 se trataron con paclitaxel durante 24 y 48 horas. Se midió la apoptosis por rotura de PARP y se estudiaron varias proteínas implicadas en ciclo celular. A las 24 horas del tratamiento con paclitaxel, no se detecta apoptosis y, tanto las células siRNA control como las células siRNA PTPL1, muestran un aumento de los niveles de fosfo-histona H3, PTTG1 y ciclina B, indicativos de parada en mitosis. Sin embargo, a las 48 horas del tratamiento con paclitaxel, las células siRNA control muestran una disminución de los niveles de fosfo-histona H3, PTTG1 y

ciclina B, mientras que las células siRNA PTPL1 mantienen unos niveles de esas proteínas más elevados que las células siRNA control (Figura 36).

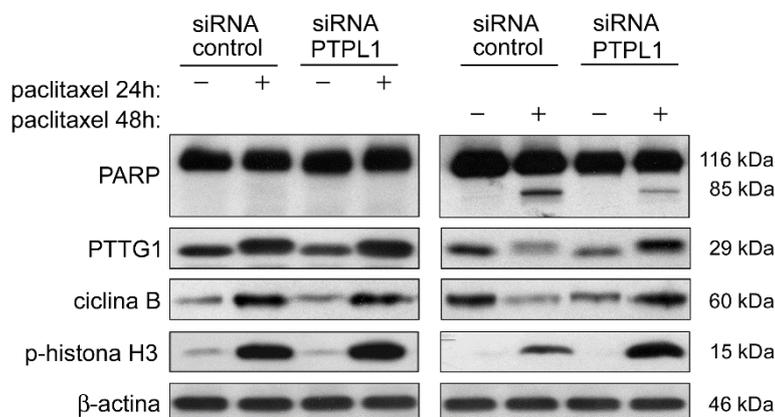


Figura 36: Efecto de PTPL1 sobre la mitosis y el deslizamiento. Las células PC3 se silenciaron para PTPL1 o con un siRNA control y se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 24 y 48 h. La inducción de apoptosis se detectó mediante western blot de PARP y la mitosis o el deslizamiento, mediante western blot de PTTG1, ciclina B y fosfo-histona H3. El experimento se realizó al menos tres veces.

Estos datos sugieren que el tratamiento con paclitaxel durante 48 horas induce un proceso de deslizamiento en las células siRNA control (asociado a la mayor inducción de apoptosis) y mantiene la parada en mitosis en las células siRNA PTPL1 (asociado a una disminución de la apoptosis). Para confirmar estos resultados, se realizó una FISH (Figura 37). El porcentaje de células siRNA control tratadas con paclitaxel, con ploidía superior a la normal fue de un 77,6%; sin embargo el porcentaje de células siRNA PTPL1 tratadas con la droga, con ploidía superior a la normal fue de un 62,6%, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante western blot.

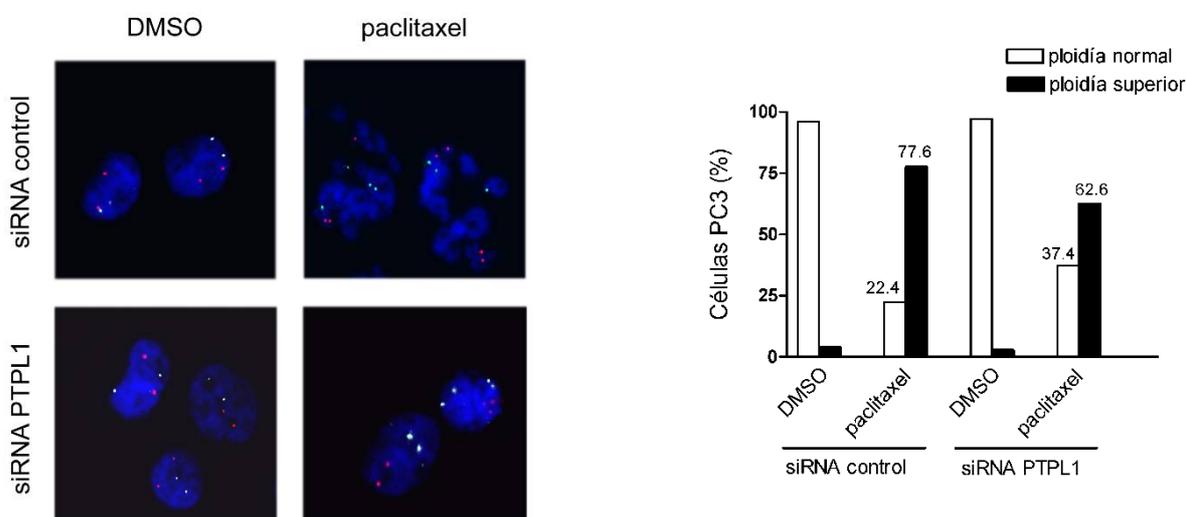


Figura 37: El silenciamiento de PTPL1 induce una inhibición del deslizamiento tras tratamiento con paclitaxel en células PC3. La figura muestra un análisis de ploidía mediante FISH. Las células PC3 se silenciaron para PTPL1 o con un siRNA control y se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 24 y 48 h. Se determinó el número de señales por célula para los cromosomas 8 y 17, en al menos 100 células. Se muestran fotografías representativas. Los histogramas representan el porcentaje de células con ploidía normal o superior para cada condición. El experimento se realizó al menos tres veces.

En conjunto, estos datos indican que el silenciamiento de PTPL1 induce resistencia a la apoptosis, asociada a una inhibición del deslizamiento tras tratamiento con paclitaxel. La identificación de estas dos situaciones en esta línea celular (deslizamiento asociado a apoptosis y bloqueo en mitosis asociado a resistencia a apoptosis) hizo que quisiéramos profundizar en la relación entre ciclo y resistencia o sensibilidad a la apoptosis. Para ello, estudiamos una proteína implicada en el SAC, PTTG1, en dos líneas de cáncer de próstata (PC3 y LNCaP) con distinta sensibilidad a la apoptosis inducida por paclitaxel.

3. PAPEL DE PTTG1 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PACLITAXEL Y SU RELACIÓN CON LA PARADA O DESLIZAMIENTO DE MITOSIS

3.1 Las células LNCaP tratadas con paclitaxel sufren apoptosis durante la mitosis, pero las células PC3, menos sensibles, mueren principalmente después de sufrir deslizamiento

Primero, se examinó la sensibilidad de las células PC3 y LNCaP a la apoptosis inducida por paclitaxel 2.5 μ M durante 24 y 48 horas. La apoptosis se midió por la aparición de la banda de 85 kDa de la proteína PARP y por la activación de la caspasa 9. Tanto la banda de 85 kDa de PARP como la caspasa 9 activa son claramente más evidentes en las células LNCaP que en las células PC3 tratadas con paclitaxel a ambos tiempos. Se observa un retraso entre las dos líneas celulares; a las 24 horas del tratamiento con la droga, hay una clara inducción de apoptosis en las células LNCaP, mientras que apenas es detectable en las células PC3. La apoptosis aumenta en las dos líneas después de 48 horas, pero continúa siendo más alta en células LNCaP que en PC3 (Figura 38). Posteriormente se

examinaron diversas proteínas relacionadas con el ciclo celular para determinar si las diferencias en la inducción de apoptosis estaban relacionadas con cambios en el ciclo. El comportamiento de estas proteínas fue similar en ambas líneas tras 24 horas de tratamiento con paclitaxel, pero es marcadamente diferente a 48 horas. La ciclina B1, PTTG1 y la histona H3 fosforilada aumentan en ambas líneas celulares tras 24 horas de tratamiento con paclitaxel. La proteína BubR1, indicadora de la activación del SAC, también aumenta en células LNCaP y permanece similar en células PC3 a ese tiempo. Tras 48 horas de tratamiento con paclitaxel, todas estas proteínas disminuyen en PC3 y permanecen similares (o incluso más altas en el caso de la histona H3 fosforilada) en células LNCaP. Se ha descrito que PTTG1 se fosforila en mitosis (Ramos-Morales *et al.*, 2000) y curiosamente, el tratamiento con paclitaxel induce la fosforilación de PTTG1 en ambas líneas celulares, pero la proteína disminuye en células PC3 y se acumula en células LNCaP (Figura 38). Estos datos sugieren que las células PC3 están llegando a mitosis y sufriendo deslizamiento posteriormente, mientras que las células LNCaP también llegan a mitosis pero permanecen completamente bloqueadas en esta fase del ciclo.

También se examinaron varias proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Como se ha descrito previamente (Bhalla, 2003), la proteína antiapoptótica Bcl-xL se fosforila en ambas líneas tratadas con paclitaxel, más marcadamente en células PC3. En el caso de estas células tratadas con paclitaxel durante 24 horas, Bcl-xL se encuentra predominantemente fosforilado, como se observa por la disminución de la banda no fosforilada de 30 kDa. Sin embargo, 48 horas después del tratamiento, hay una mezcla de Bcl-xL fosforilado y no fosforilado (Figura 38). En células LNCaP, Bcl-xL disminuye tras 48 horas de tratamiento con paclitaxel. El nivel de expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1_L disminuye en ambas líneas y a los dos tiempos después del tratamiento con paclitaxel, pero en células PC3, el nivel de Mcl-1_L permanece alto tras 24 horas de tratamiento comparado con la gran disminución observada a 48 h. Por el contrario, la expresión de Mcl-1_L después del tratamiento con paclitaxel es baja y similar a ambos tiempos en células

LNCaP. Las proteínas proapoptóticas Bax y Bak permanecen prácticamente sin cambios después del tratamiento con paclitaxel en ambas líneas celulares (Figura 38).

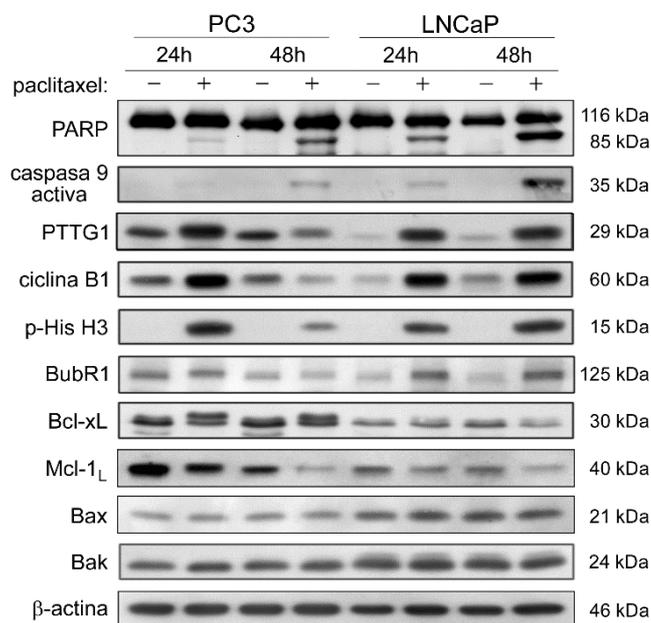


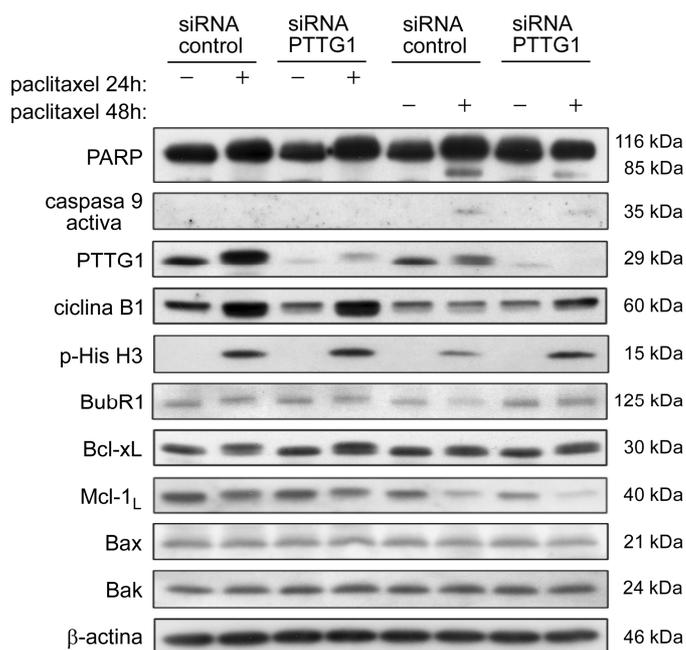
Figura 38: Efecto diferencial del paclitaxel sobre la apoptosis y el ciclo celular en células PC3 y LNCaP. Las células se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 24 y 48 h. Las proteínas PARP (intacta y rota), caspasa 9 activa, PTTG1, ciclina B1, fosfo-histona H3 (p-His-H3), BubR1, Bcl-xL, Mcl-1_L, Bax y Bak se detectaron mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. El experimento se realizó al menos tres veces.

3.2 El silenciamiento de PTTG1 disminuye la apoptosis inducida por paclitaxel por inhibición del deslizamiento en células PC3

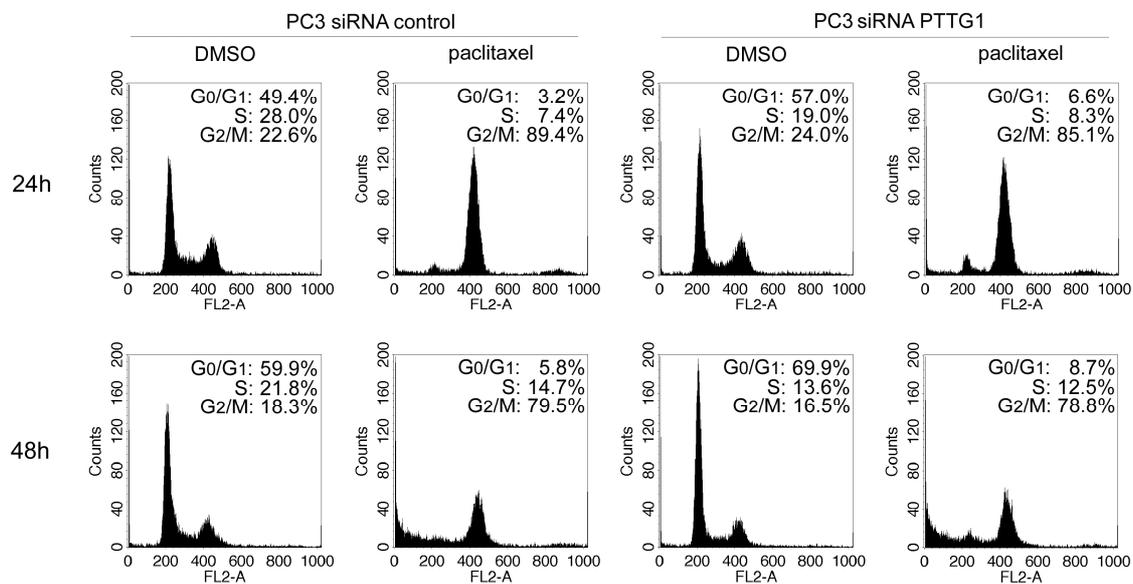
Para investigar el papel de PTTG1 en la respuesta al paclitaxel de las células PC3, PTTG1 endógeno se silenció mediante siRNA y las células se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 24 y 48 horas. Como se observa por la banda de 85 kDa de la proteína PARP y por la activación de la caspasa 9, el silenciamiento de PTTG1 disminuye la sensibilidad apoptótica de las células PC3 al tratamiento con paclitaxel. Tanto las células siRNA control como las células silenciadas para PTTG1 muestran un aumento en los niveles de histona H3 fosforilada y ciclina B1 después de 24 horas del tratamiento con paclitaxel, mientras que los niveles de BubR1 permanecen similares a los de las células siRNA control y siRNA PTTG1 tratadas con DMSO. Comparado con las 24 horas, el tratamiento con paclitaxel durante 48 horas induce una disminución en los niveles de histona H3 fosforilada, BubR1

y ciclina B1 en las células siRNA control, que es mucho menos evidente en las células silenciadas para PTTG1 (Figura 39 A). Los niveles de Mcl-1_L disminuyen tras el tratamiento con paclitaxel en todas las condiciones, pero de forma más marcada a 48 horas. Los niveles de Bcl-xL permanecen más altos en células silenciadas para PTTG1 y tratadas con paclitaxel durante 24 horas que en las células siRNA control tratadas de la misma forma. No se detectan cambios apreciables en las proteínas Bax y Bak (Figura 39 A). También se examinó el ciclo celular para estudiar con más profundidad el efecto del silenciamiento de PTTG1 en esta línea celular. Las células silenciadas para PTTG1 y tratadas con DMSO muestran un aumento en fase G₁ y una disminución en fase S, comparadas con las células siRNA control tratadas con DMSO (Figura 39 B). Los perfiles de ciclo son esencialmente similares en células siRNA control y siRNA PTTG1 tratadas con paclitaxel durante 24 y 48 horas, aunque el porcentaje de células siRNA PTTG1 tratadas con paclitaxel en fase G₁ es ligeramente más alto que en células siRNA control tratadas con paclitaxel (Figura 39 B). Puesto que, tanto las células siRNA control como las células silenciadas para PTTG1 tratadas con paclitaxel tienen un contenido en DNA correspondiente a las fases G₂/M y, dado que las células mitóticas y las que han sufrido deslizamiento son indistinguibles mediante esta técnica, se realizó una hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Las células control tratadas con paclitaxel durante 48 horas mostraron un 72,3% de células con una ploidía mayor que la normal, mientras que las células siRNA PTTG1 tratadas con paclitaxel mostraron una reducción del 28,0% en ese porcentaje (Figura 39 C). Todos estos datos apuntan hacia una inhibición del deslizamiento tras el silenciamiento de PTTG1.

A



B



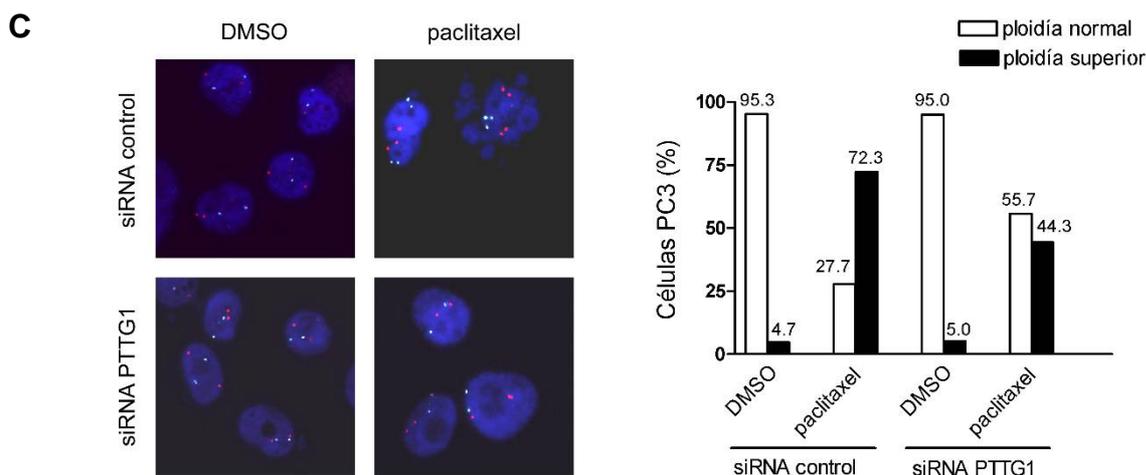


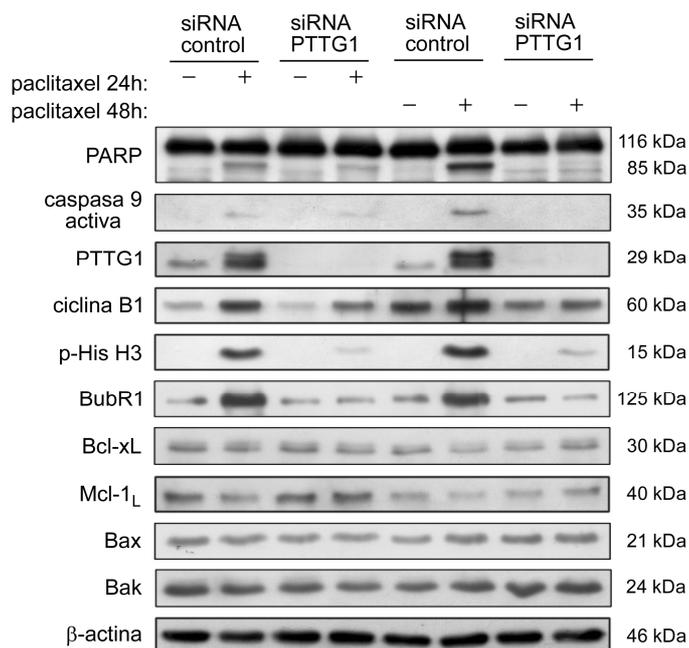
Figura 39: El silenciamiento de PTTG1 disminuye la apoptosis inducida por paclitaxel en células PC3. Las células se silenciaron con siRNA control o siRNA PTTG1 y se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 24 y 48 h. (A) Las proteínas indicadas se detectaron mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. (B) Análisis de ciclo celular, mediante citometría de flujo, de células marcadas con yoduro de propidio. El porcentaje de células en cada fase del ciclo se determinó con el programa ModFit. (C) Análisis de ploidía mediante FISH. Se determinó el número de señales por célula para los cromosomas 8 y 17, en al menos 100 células. Se muestran fotografías representativas. Los histogramas representan el porcentaje de células con ploidía normal o superior para cada condición. El experimento se realizó al menos tres veces.

3.3 El silenciamiento de PTTG1 dificulta la progresión de las células LNCaP a través del ciclo celular y disminuye su sensibilidad a la apoptosis inducida por paclitaxel

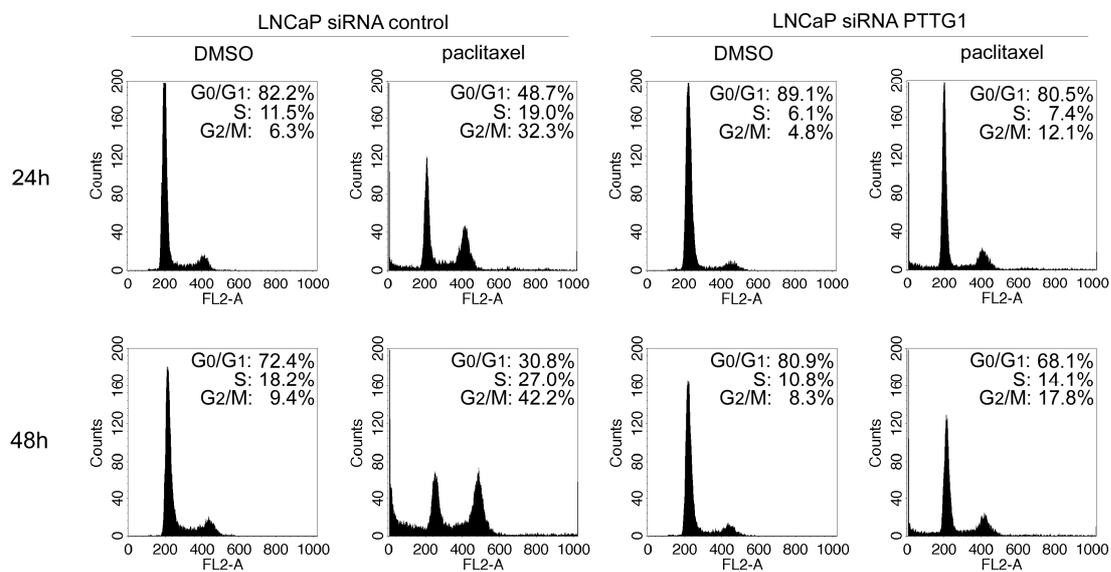
Se utilizó la misma aproximación experimental que en el resultado anterior pero con células LNCaP. Primero, se examinó la inducción de apoptosis en este contexto. Las células silenciadas para PTTG1 mostraron una clara disminución de la rotura de PARP y de la activación de la caspasa 9 tras tratamiento con paclitaxel, comparadas con las células siRNA control, tanto a 24 como a 48 horas (Figura 40 A). De nuevo es evidente la diferencia en los tiempos de inducción de apoptosis y la aparición de resistencia tras el silenciamiento de PTTG1 comparando ambas líneas celulares. Sin embargo, los cambios en las proteínas relacionadas con el ciclo celular delinean un escenario distinto en células LNCaP. La disminución en los niveles de histona H3 fosforilada, BubR1 y ciclina B1 en células silenciadas para PTTG1 y tratadas con paclitaxel en relación a las células siRNA control tratadas de la misma forma, tanto a 24 como a 48 horas, revelan una gran disminución de la mitosis cuando las células LNCaP carecen de PTTG1 (Figura 40 A). Los niveles de Bax

y Bak permanecen sin cambios, pero la disminución de los niveles de Mcl-1_L observada en las células siRNA control tratadas con paclitaxel en ambos tiempos desaparece en las células silenciadas para PTTG1 tratadas con la droga. De forma similar, la disminución de los niveles de Bcl-xL observada en las células siRNA control tratadas con paclitaxel durante 48 horas también desaparece tras el silenciamiento de PTTG1 (Figura 40 A). También se realizó un análisis del ciclo celular para estudiar si la disminución de la mitosis en las células silenciadas para PTTG1 tratadas con paclitaxel se debe a la aparición de deslizamiento o a que la transición hacia G₂/M se encuentra dificultada. Las células LNCaP silenciadas para PTTG1 y tratadas con DMSO exhiben un aumento en fase G₁ y una disminución en fases S y G₂/M respectivamente, comparadas con las células siRNA control tratadas con DMSO. El cambio en la distribución del ciclo es todavía más acusado tras el tratamiento con paclitaxel. Las células siRNA control se acumulan en S y G₂/M tras la exposición a paclitaxel, aunque el efecto es más marcado a 48 horas (Figura 40 B). Por el contrario, la proporción de células silenciadas para PTTG1 y tratadas con paclitaxel que se acumula en S y G₂/M es dramáticamente más baja en ambos puntos de tiempo (Figura 40 B). Finalmente, para comprobar que no hay cambios en la ploidía, dado que las células están en mitosis o no llegando a mitosis, se realizó una FISH. Como se observa en la figura 40 C, el porcentaje de células con ploidía mayor de la normal es bajo y similar en células siRNA control y siRNA PTTG1 tratadas con paclitaxel, apoyando los resultados obtenidos mediante western blot y análisis de ciclo. Juntos, estos datos indican que la progresión del ciclo celular se dificulta en ausencia de PTTG1.

A



B



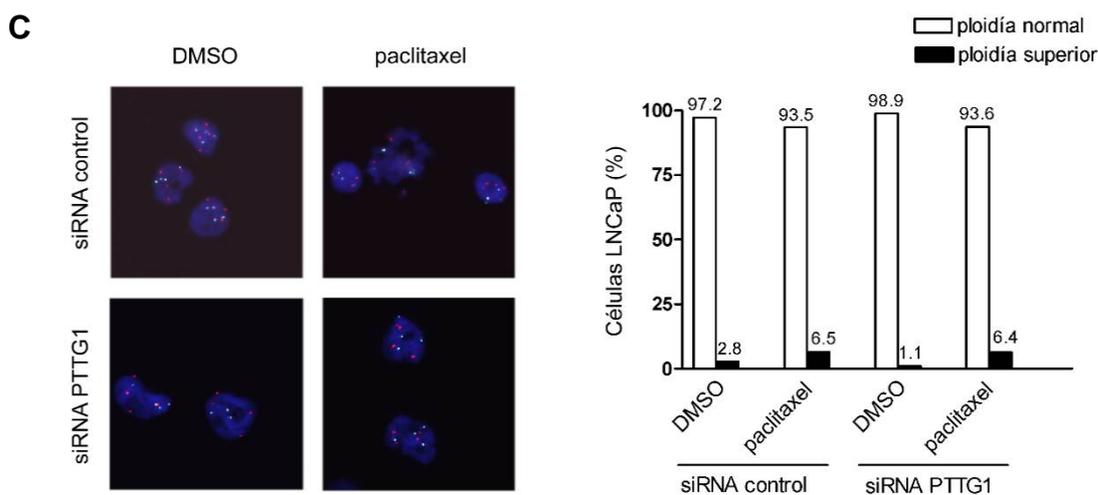


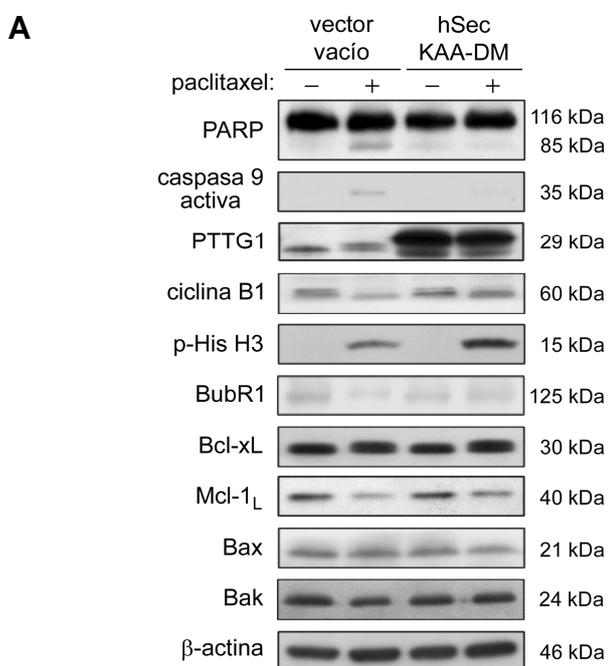
Figura 40: El silenciamiento de PTTG1 disminuye la apoptosis inducida por paclitaxel en células LNCaP. Las células se silenciaron con siRNA control o siRNA PTTG1 y se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 24 y 48 h. (A) Las proteínas indicadas se detectaron mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. (B) Análisis de ciclo celular, mediante citometría de flujo, de células marcadas con yoduro de propidio. El porcentaje de células en cada fase del ciclo se determinó con el programa ModFit. (C) Análisis de ploidía mediante FISH. Se determinó el número de señales por célula para los cromosomas 8 y 17, en al menos 100 células. Se muestran fotografías representativas. Los histogramas representan el porcentaje de células con ploidía normal o superior para cada condición. El experimento se realizó al menos tres veces.

3.4 La sobreexpresión de PTTG1 aumenta la parada en mitosis inducida por paclitaxel en células PC3 y LNCaP, con efectos opuestos sobre la apoptosis

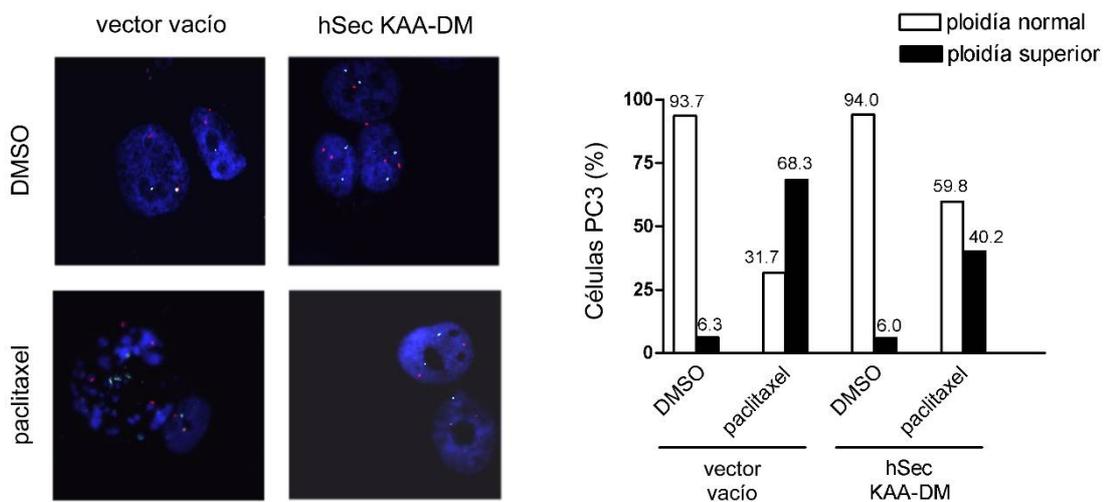
Para seguir investigando el papel de PTTG1 en la respuesta a paclitaxel, las células PC3 y LNCaP se transfectaron transitoriamente con un mutante no degradable de PTTG1 y se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 48 horas. Las células PC3 transfectadas con PTTG1 y tratadas con paclitaxel mostraron un mayor bloqueo en mitosis que las células transfectadas con el vector vacío y tratadas de la misma forma, como puede observarse por los niveles de histona H3 fosforilada, BubR1 y ciclina B1, pero, al igual que en caso del silenciamiento de PTTG1, este evento se asocia con una menor rotura de PARP y una menor activación de la caspasa 9, es decir, con una menor inducción de apoptosis (Figura 41 A). Los niveles de Bcl-xL, Bax y Bak se mantienen esencialmente sin cambios, mientras que la expresión de Mcl-1_L es más elevada en células PC3 transfectadas con PTTG1 y tratadas con paclitaxel que en células transfectadas con el vector vacío tratadas de la misma forma. Posteriormente se realizó una FISH para estudiar los cambios en la proporción de células en mitosis o que han sufrido deslizamiento bajo estas condiciones.

Las células PC3 transfectadas con el vector vacío y tratadas con paclitaxel mostraron un 68,3% de células con mayor ploidía de la normal, mientras que las células transfectadas con PTTG1 tratadas con paclitaxel mostraron una disminución del 28,1% en ese porcentaje, indicando una inhibición del deslizamiento en la última condición (Figura 41 B).

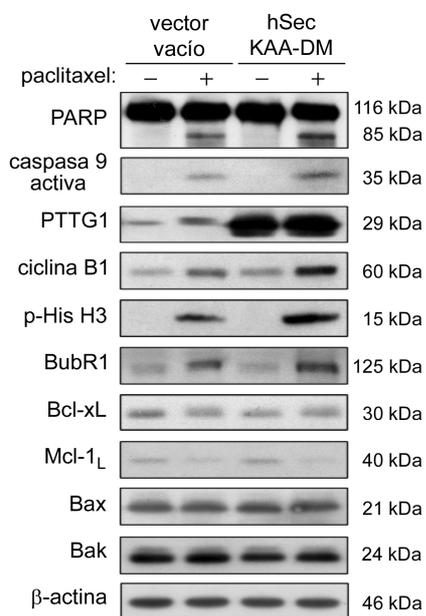
En el caso de las células LNCaP, la rotura de PARP y la activación de la caspasa 9 son superiores en las células transfectadas con PTTG1 tratadas con paclitaxel, comparadas con las transfectadas con el vector vacío tratadas de la misma forma. Los niveles de histona H3 fosforilada, BubR1 y ciclina B1 se elevan en células LNCaP transfectadas con PTTG1 después del tratamiento con paclitaxel, lo que indica una parada en mitosis más eficiente. La expresión de Bcl-xL, Mcl-1_L, Bax y Bak permanece similar tanto en células transfectadas con el vector vacío como en las transfectadas con PTTG1 (Figura 41 C). Los resultados de la FISH también confirman que las células no se están deslizando de la parada en mitosis inducida por paclitaxel (Figura 41 D).



B



C



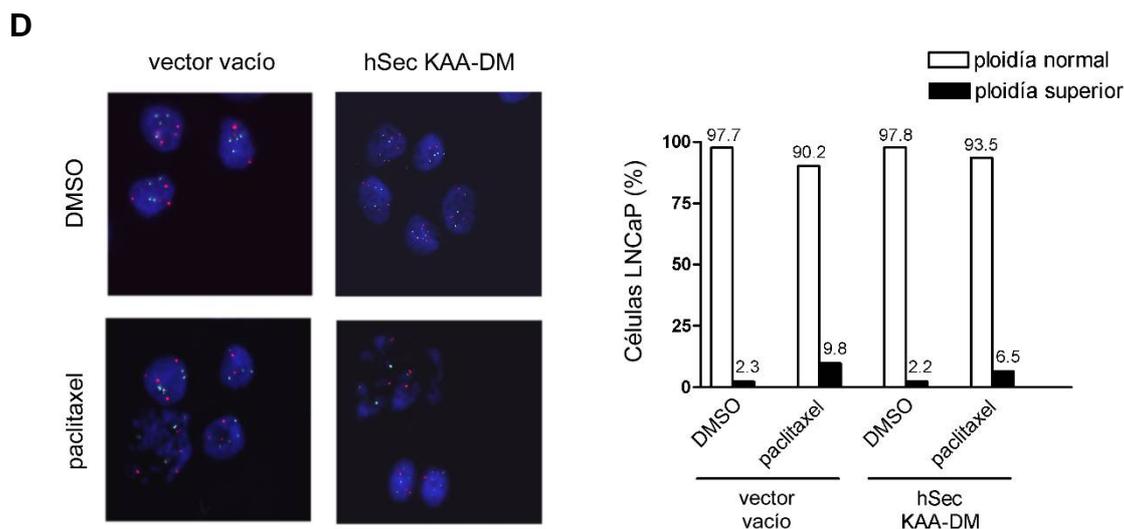


Figura 41: La parada en mitosis inducida por el paclitaxel aumenta en células PC3 y LNCaP transfectadas con PTTG1, con efectos opuestos en apoptosis. Las células PC3 (A y B) y LNCaP (C y D) se transfectaron transitoriamente con un mutante no degradable de PTTG1 (pEF/SecurinKAA-DM) o con el vector vacío, y se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 24 y 48 h. (A y C) Las proteínas indicadas se detectaron mediante western blot. β -actina se muestra como control de carga. (B y D) Análisis mediante FISH de los cromosomas 8 y 17 en al menos 100 células. Se muestran fotografías representativas. Los histogramas representan el porcentaje de células con ploidía normal o superior para cada condición. El experimento se realizó al menos tres veces.

3.5 El silenciamiento simultáneo de PTTG1 y Mcl-1 tiene un efecto proapoptótico sobre las células PC3 durante la mitosis

Como los resultados obtenidos en células PC3 indican que el aumento de células mitóticas obtenido tras tratamiento con paclitaxel tanto en células silenciadas como transfectadas con PTTG1 no sólo no aumenta la apoptosis sino que la disminuye, razonamos que la apoptosis sólo puede inducirse tras deslizamiento o que pueden existir bloqueos durante la mitosis que evitan la apoptosis en esa fase del ciclo. Para dilucidar estas hipótesis nos centramos en Mcl-1, debido a su elevado nivel de expresión cuando la mayoría de las células PC3 están en mitosis, es decir, tras 24 horas de tratamiento con paclitaxel. Las células PC3 silenciadas para Mcl-1 y tratadas con paclitaxel durante 48 horas, mostraron un aumento en los niveles de histona H3 fosforilada y ciclina B1 en relación a las células siRNA control tratadas con paclitaxel. Curiosamente, los aumentos de expresión de estas dos proteínas sólo son ligeramente superiores a los observados en células silenciadas para PTTG1 y tratadas con paclitaxel, pero la rotura de PARP y la activación de la caspasa 9

son claramente más altas en las células silenciadas para Mcl-1 tratadas con la droga (Figura 42). Las células silenciadas simultáneamente para PTTG1 y Mcl-1 y tratadas con paclitaxel durante 48 horas, muestran un aumento en la rotura de PARP y en la activación de la caspasa 9, asociado a un aumento de mitosis, como indican los niveles de histona H3 fosforilada y ciclina B1, comparadas con células siRNA control, siRNA PTTG1 y siRNA Mcl-1 tratadas con la droga (Figura 42). Estos datos indican que la resistencia a apoptosis que se produce cuando se silencia PTTG1 puede evitarse, superando incluso la inducción apoptótica obtenida en las células siRNA control, silenciando simultáneamente Mcl-1.

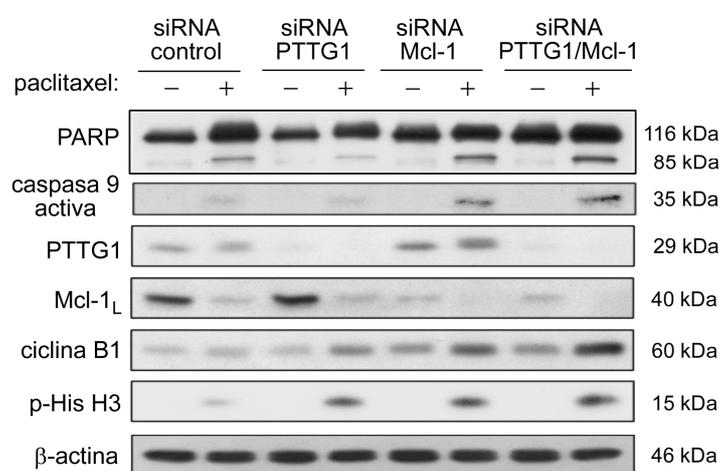
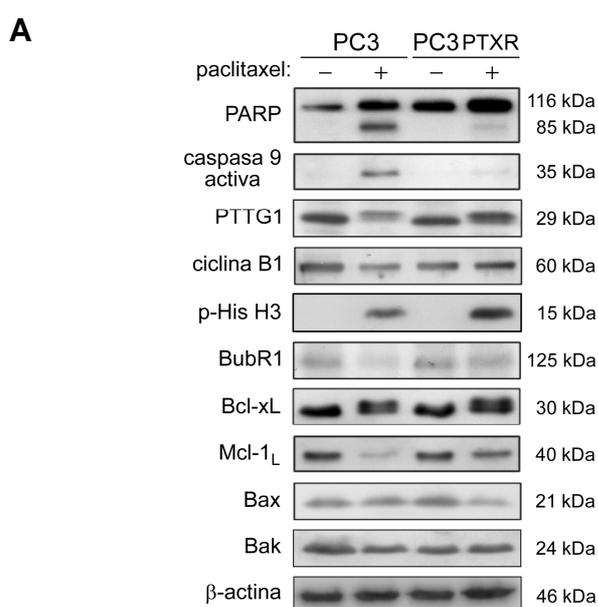


Figura 42: El silenciamiento simultáneo de PTTG1 y Mcl-1 incrementa la apoptosis inducida por paclitaxel durante la mitosis en células PC3. Las células PC3 se silenciaron con siRNA control, siRNA PTTG1, siRNA Mcl-1 o ambos simultáneamente. Para asegurar la misma cantidad de siRNA en todas las condiciones, se añadió siRNA control a una concentración de 100 nM en todos los silenciamientos simples. Las células se trataron posteriormente con paclitaxel 2,5 μ M durante 48 h. El experimento se realizó al menos tres veces.

3.6 La línea celular PC3 resistente a paclitaxel (PC3 PTXR) muestra una disminución de la apoptosis asociada a un incremento de mitosis y niveles elevados de Mcl-1_L después del tratamiento con paclitaxel

Finalmente, se examinó la apoptosis, el ciclo celular y algunas proteínas de la familia Bcl-2 en una línea celular PC3 resistente a paclitaxel generada en nuestro laboratorio. Como se puede observar en la figura 43 A, la rotura de PARP y la activación de la caspasa 9 están claramente disminuidas en las células PC3 PTXR después del tratamiento con

paclitaxel, comparadas con las células PC3 parentales tratadas de la misma forma. Esta reducción en la apoptosis está asociada con niveles más altos de histona H3 fosforilada, BubR1, ciclina B1 y PTTG1 en la línea celular resistente, ilustrando de nuevo la asociación entre la inhibición del deslizamiento y la disminución de la apoptosis. En relación a las proteínas de la familia Bcl-2, los niveles de expresión de Bak y Bcl-xL permanecen inalterados, pero se observa una disminución en el nivel de expresión de Bax en la línea celular resistente a paclitaxel tras el tratamiento con la droga. Curiosamente, la disminución de Mcl-1_L observada en las células parentales tras tratamiento con paclitaxel es claramente menos marcada en la línea celular resistente en la misma condición (Figura 43 A), apoyando la función de Mcl-1_L en la inhibición de la apoptosis durante mitosis. Como los datos de western sugieren una mayor parada en mitosis inducida por paclitaxel en las células resistentes que en las parentales, se estudió el ciclo celular y la ploidía en este contexto. Los perfiles de ciclo resultaron ser similares en las dos líneas celulares (Figura 43 B), sin embargo, los resultados de la FISH mostraron un 69,8 % de células PC3 tratadas con paclitaxel con ploidía más alta de la normal, mientras que en células PC3 PTXR tratadas con la droga ese porcentaje fue del 55,9%, corroborando la disminución del deslizamiento en las células PC3 PTXR tras tratamiento con paclitaxel (Figura 43 C).



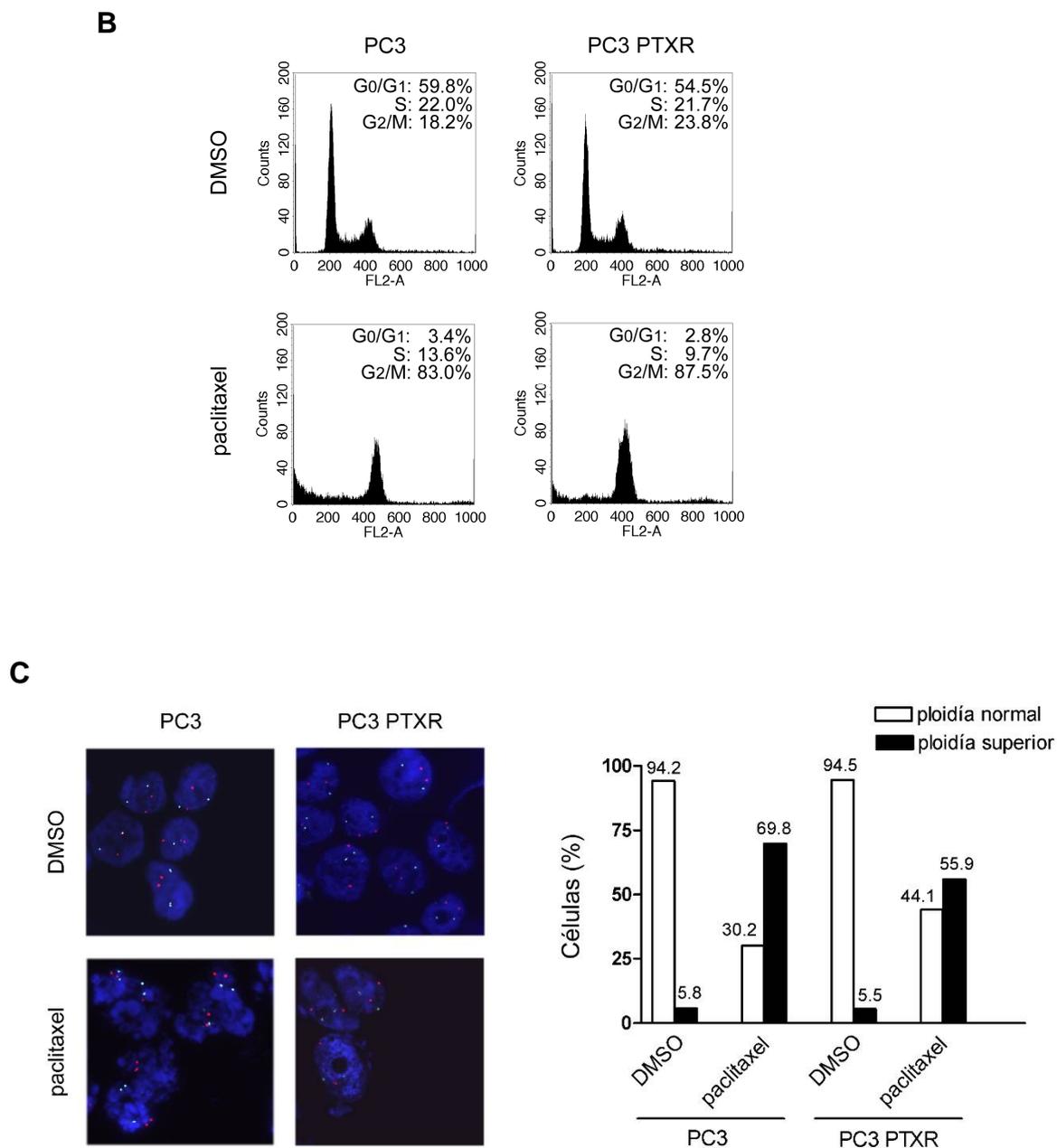


Figura 43: Las células PC3 resistentes a paclitaxel (PC3 PTXR) muestran un aumento de la mitosis y niveles elevados de Mcl-1L tras tratamiento con paclitaxel, asociado a una disminución de la apoptosis. Las células PC3 y PC3 PTXR se trataron con paclitaxel 2,5 μ M durante 48 h. (A) Las proteínas indicadas se detectaron mediante western blot, utilizando β -actina como control de carga. (B) Análisis de ciclo celular, mediante citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células en cada fase del ciclo. (C) Análisis de ploidía mediante FISH. Se determinó el número de señales por célula para los cromosomas 8 y 17, en al menos 100 células. Se muestran fotografías representativas. Los histogramas representan el porcentaje de células con ploidía normal o superior para cada condición. El experimento se realizó al menos tres veces.

DISCUSIÓN

1. PTPL1 Y APOPTOSIS

La potenciación de la proliferación celular y una apoptosis defectuosa son dos eventos centrales implicados en el desarrollo neoplásico y la progresión tumoral. Por tanto, desentrañar los mecanismos que controlan estos procesos puede proporcionar mejoras terapéuticas. En este estudio, hemos comparado la sensibilidad de las células PC3 a la apoptosis inducida por PEITC, anti-Fas o ambas drogas en combinación. Aunque hay controversia en la literatura respecto a la sensibilidad de las células PC3 al tratamiento con anti-Fas (Rokhlin *et al.*, 1997; Uslu *et al.*, 1997; Hedlund *et al.*, 1998), en nuestras manos son relativamente sensibles a la apoptosis inducida por anti-Fas. Como se ha publicado previamente (Xiao & Singh, 2002; Xiao *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006), también son sensibles a la apoptosis inducida por PEITC, y hemos observado que el PEITC produce una mayor inducción de apoptosis que el tratamiento con anti-Fas. En varios estudios, se ha demostrado que distintos compuestos como la adriamicina, el etopósido, la camptotecina, el resveratrol o la tricostatina A, pueden sensibilizar a las células tumorales de próstata a la apoptosis inducida por anti-Fas (Uslu *et al.*, 1997; Costa-Pereira & Cotter, 1999; Gillet *et al.*, 2007; Taghiyev *et al.*, 2005). En el caso del PEITC, se ha observado un efecto sensibilizador sobre la apoptosis inducida por anti-Fas en células de cáncer de vejiga T24 y en células Jurkat con Bcl-2 sobreexpresado (Pullar *et al.*, 2004). En este estudio, hemos mostrado que el tratamiento con PEITC también sensibiliza a las células PC3 a la apoptosis inducida por anti-Fas y que la extensión de la apoptosis causada por este tratamiento es mayor que la que se consigue con cualquiera de los dos compuestos por separado.

La fosforilación de tirosinas es un importante proceso regulador de la transducción de señales en eucariotas superiores (Abaan & Toretsky, 2008). PTPL1 es la proteína tirosina fosfatasa de tipo no receptor más grande y su función en la regulación de la apoptosis se debate actualmente. Algunas evidencias sugieren que PTPL1 puede actuar como un regulador negativo de la apoptosis y como promotor tumoral, mientras que otros

estudios apuntan hacia una función de PTPL1 como regulador positivo de la apoptosis y como supresor tumoral (Abaan & Toretsky, 2008). Concretamente en cáncer de próstata, hay dos estudios relativos a la sensibilidad a la apoptosis inducida por Fas en líneas celulares de cáncer de próstata, que no encuentran correlación entre resistencia a la apoptosis mediada por Fas y aumento de expresión de PTPL1 a nivel de RNA mensajero (Usluet *al.*, 1997; Hedlundet *al.*, 1998), pero no hay estudios funcionales en cáncer de próstata que documenten la función de PTPL1 en apoptosis. En este estudio, hemos determinado una función proapoptótica para PTPL1 en células PC3, dado que un aumento de su expresión promueve la apoptosis en células tratadas con PEITC y anti-Fas o paclitaxel y que la disminución de su expresión induce resistencia a apoptosis tras tratamiento con estas drogas. Hemos observado que la función proapoptótica de PTPL1 no sólo está restringida a la vía Fas de apoptosis, porque la disminución de su expresión tiene también un efecto protector sobre la apoptosis inducida por otros estímulos como PEITC o paclitaxel. El silenciamiento de PTPL1 también induce resistencia a apoptosis en células PC3 tratadas con la combinación de PEITC y anti-Fas, comparado con células que expresan PTPL1 endógeno tratadas de la misma forma. Esta diferencia en la inducción de apoptosis se pone de manifiesto en un porcentaje más bajo de apoptosis temprana, una menor rotura de la proteína PARP y un menor grado de activación de las caspasas 3, 7 y 9 en células tratadas, silenciadas para PTPL1. En relación a las proteínas de la familia Bcl-2, los cambios más llamativos son una ligera, aunque significativa, inducción de Bcl-xL en las células silenciadas para PTPL1 y un aumento de la proteína proapoptótica Mcl-1_S y del fragmento de 24 kDa de la proteína Mcl-1_L en células siRNA control tratadas. Se ha sugerido que los fragmentos rotos por caspasas de Mcl-1 pierden potencial antiapoptótico y se convierten en proapoptóticos, o alternatively, que la rotura de Mcl-1 puede interrumpir la función protectora de la proteína (Zhuang & Brady, 2006). En conjunto, estos resultados sugieren que la vía de señalización mediada por PTPL1 puede influir en los niveles de expresión de las proteínas Bcl-xL y Mcl-1_S, así como en eventos finales del

proceso apoptótico como la activación de caspasas y, por tanto, de la rotura mediada por caspasas de proteínas como Mcl-1 o PARP.

La familia proteína quinasa C (PKC), de serina/treonina quinasas, es activada por diversos estímulos y participa en procesos celulares como crecimiento, diferenciación y apoptosis. Las isoformas de la familia PKC se pueden subdividir en PKCs clásicas, nuevas y atípicas, dependiendo de sus características estructurales y de sus requerimientos para la activación. Las PKCs clásicas (α , β 1, β 2 y γ) son activadas por diacilglicerol y calcio, las PKCs nuevas (δ , ϵ , η y θ), se activan por diacilglicerol y las PKCs atípicas (ζ and λ /I) no responden ni a diacilglicerol ni a calcio (Brodie & Blumberg, 2003).

La mayoría de estudios indican que la isoforma PKC δ está implicada en la supresión de la proliferación celular y en la inducción de apoptosis, pero hay unos pocos estudios que apuntan a una función de PKC δ en la supervivencia celular y en respuestas antiapoptóticas (Jackson & Foster, 2004). En relación al cáncer de próstata, algunos estudios indican una función de PKC δ en migración e invasión (Villaret *et al.*, 2007; Kharaitet *et al.*, 2006; Chenet *et al.*, 2014), mientras que otros han documentado que la expresión de PKC δ se requiere en la apoptosis inducida por receptores de muerte, drogas antitumorales y otros compuestos (Sumitomo *et al.*, 2004; Sumitomo *et al.*, 2002; Gonzalez-Guerrico & Kazanietz, 2005; Lu *et al.*, 2011; Gurbuz *et al.*, 2015). En este sentido, hemos observado que la sobreexpresión de PKC δ aumenta la inducción de apoptosis mediada por PEITC y anti-Fas o paclitaxel en células PC3. En células LNCaP, se ha establecido que PKC δ media la apoptosis inducida por paclitaxel, etopósido (Sumitomo *et al.*, 2002) o ésteres de forbol (Gonzalez-Guerrico & Kazanietz, 2005); de acuerdo con estos datos, hemos observado que el silenciamiento de PKC δ induce resistencia a la apoptosis inducida por PEITC y anti-Fas o paclitaxel en esta línea celular. Todos estos datos indican que PTPL1 y PKC δ ejercen una función proapoptótica tanto en células sensibles a andrógenos (LNCaP), como en células resistentes a andrógenos (PC3).

La actividad de PKC δ está regulada por la unión de cofactores a su región reguladora y por la fosforilación de su dominio quinasa, especialmente de su bucle de

activación; aunque la dependencia de la actividad de PKC δ de la fosforilación del bucle de activación todavía es tema de controversia (Steinberg, 2004). Un estudio ha mostrado que PKC δ sólo tiene una actividad mínima cuando no está fosforilada (Le Good *et al.*, 1998). Otro, sin embargo, ha encontrado que un mutante de PKC δ , desfosforilado en el bucle de activación, era totalmente activo en un ensayo quinasa *in vitro* (Stempka *et al.*, 1997). En este sentido, otro estudio ha mostrado que una PKC δ mutante, no fosforilable en el bucle de activación, es activa catalíticamente en las células, pero su función y su patrón de fosforilación de sustratos están marcadamente cambiados. Notablemente, esta PKC δ mutante es tan activa como la tipo salvaje en la inducción de apoptosis (Liu *et al.*, 2006). Nosotros hemos observado que, en células PC3 que expresan PTPL1 endógeno, la fosforilación de PKC δ en la treonina 505 (T505), localizada en el bucle de activación, disminuye claramente tras tratamiento con PEITC y anti-Fas, mientras que las células silenciadas para PTPL1 tratadas mantienen el nivel basal de fosforilación de PKC δ . Esta pérdida de la fosforilación de PKC δ en T505 en presencia de PTPL1 ocurre también cuando se usan PEITC o paclitaxel para inducir apoptosis. Es interesante notar que la pérdida de fosforilación de PKC δ en T505 sólo ocurre en células que están sufriendo apoptosis, por lo que nos preguntamos si la pérdida de fosforilación significa una pérdida de actividad de la quinasa y es similar a una pérdida de la proteína o si la presencia de PKC δ desfosforilada en T505 vía PTPL1 es relevante para la inducción de apoptosis. Se confirmó la última hipótesis, ya que el silenciamiento de PKC δ mediante siRNA induce resistencia a apoptosis en células PC3. Además, el silenciamiento simultáneo de PTPL1 y PKC δ causa una mayor resistencia a la apoptosis que cualquiera de ellos por separado, apoyando la idea de que la presencia de ambas proteínas es necesaria para una mejor eficiencia del proceso apoptótico. En resumen, hemos mostrado que las células PC3 son más sensibles a la inducción de apoptosis por PEITC y anti-Fas cuando están presentes tanto PTPL1 como PKC δ , que PKC δ se desfosforila en T505 en células que sufren apoptosis disparada por distintos estímulos y que la pérdida de la fosforilación en T505 de PKC δ puede estar mediada, probablemente de forma indirecta, por PTPL1. El efecto de PTPL1 sobre PKC δ

también se pone de manifiesto porque la sobreexpresión de PTPL1 y el silenciamiento simultáneo de PKC δ producen una reversión parcial de la apoptosis obtenida tras la sobreexpresión de PTPL1 y el tratamiento con PEITC y anti-Fas

Como se menciona anteriormente, una PKC δ mutante, no fosforilable en el bucle de activación, es tan activa como la tipo salvaje en la inducción de apoptosis, pero muestra defectos en la fosforilación de sustratos en las células y es defectiva en ensayos reporteros con AP-1 y NF κ B que requieren actividad quinasa (Liu *et al.*, 2006). NF- κ B media principalmente señales antiapoptóticas en el cáncer de próstata (Suh & Rabson, 2004) y no se ha establecido todavía una relación entre NF κ B y PKC δ en células tumorales de próstata, por lo que investigamos su estado de activación en este contexto. NF κ B permanece fosforilado tras tratamiento con PEITC y anti-Fas cuando PKC δ o tanto PTPL1 como PKC δ están silenciadas. Sin embargo, en células tratadas, con expresión endógena de PTPL1 y PKC δ , en las que PKC δ está desfosforilada en T505, el nivel de NF κ B fosforilado (activo) es más bajo que en células tratadas con expresión endógena de PKC δ pero silenciadas para PTPL1, en las que PKC δ está fosforilada en T505. De acuerdo con estos datos, la desfosforilación de NF κ B es más efectiva en presencia de PKC δ desfosforilada en T505, vía PTPL1, que cuando PKC δ está fosforilada en T505. También se examinó el estado de fosforilación de I κ B α , un regulador negativo de la actividad de NF κ B. La fosforilación de I κ B α en las serinas 32 y 36 conduce a su ubiquitinación y degradación, lo que a su vez promueve la translocación de NF κ B desde el citoplasma al núcleo, donde se convierte en un factor de transcripción activo (Suh & Rabson, 2004). La fosforilación de I κ B α en la tirosina 42 también induce su disociación de NF κ B pero sin degradación proteolítica (Fan *et al.*, 2002) y, además se ha demostrado que I κ B α fosforilado en Y42 es un sustrato de PTPL1 *in vitro* (Nakai *et al.*, 2000). Hemos observado que, en células que expresan PTPL1 y PKC δ endógenos, tratadas con PEITC y anti-Fas, I κ B α se desfosforila extensamente en S32, S36 e Y42. Sin embargo, cuando se silencian PKC δ , PTPL1 o ambos, la desfosforilación en los tres sitios se ve disminuida tras el tratamiento con las drogas. Estos datos indican que tanto PTPL1 como PKC δ pueden influir, de forma

independiente, sobre la fosforilación de I κ B α ; sin embargo, el hecho de que la fosforilación de los tres sitios estudiados se inhiba casi completamente tras tratamiento cuando ambas proteínas están silenciadas simultáneamente, indica una posible acción cooperativa entre PTPL1 y PKC δ sobre la desfosforilación de I κ B α .

Se ha publicado que el PEITC inhibe la fosforilación de I κ B α (Xu *et al.*, 2005), por tanto, basándonos en trabajos anteriores y en nuestros resultados, proponemos que la inhibición de la degradación de I κ B α y la supresión de la actividad de NF κ B (tanto por asociación con I κ B α como por desfosforilación) podrían estar mediadas, al menos en parte, por PTPL1 y PKC δ , y que la señalización mediada por estas dos proteínas contribuye a la apoptosis en células de cáncer de próstata.

Akt es una serina/treonina quinasa que promueve la supervivencia de las células tumorales y media principalmente rutas de señalización antiapoptóticas (Li *et al.*, 2005). Sin embargo, la relevancia de estas rutas puede variar dependiendo del contexto celular; por ejemplo, en células PC3, Bcl-x_L media una ruta de supervivencia independiente de la señalización de Akt (Yang *et al.*, 2003). Algunos autores han mostrado que PTPL1 inhibe la fosforilación de Akt (Dromard *et al.*, 2007), mientras que otros no encuentran esa correlación (Miyazaki *et al.*, 2006). Sorprendentemente, hemos detectado una disminución de la fosforilación de Akt en células PC3 silenciadas para PTPL1; sin embargo, los niveles de fosforilación de Akt disminuyen tras tratamiento tanto en presencia como en ausencia de PTPL1 y PKC δ . La capacidad del tratamiento con PEITC y anti-Fas para disminuir la fosforilación de Akt en todas las condiciones probadas podría indicar que PTPL1 y PKC δ no se requieren para desfosforilar a Akt. Además, la desfosforilación de Akt no parece controlar la apoptosis, al menos en este contexto, dado que tiene lugar tanto en células que están sufriendo una apoptosis extensiva como en células con una apoptosis disminuida.

La expresión inmunohistoquímica de PKC δ en el cáncer de próstata también es motivo de controversia. En un estudio con 23 biopsias de cáncer de próstata se observó

que PKC δ se expresaba sólo en el estroma y no en el epitelio (Cornford *et al.*, 1999). Sin embargo, otros autores han encontrado una alta expresión de PKC δ en el componente epitelial de los cánceres de próstata (Villaret *al.*, 2007; Kharaitet *al.*, 2006), independientemente del grado de Gleason (Villaret *al.*, 2007). La expresión inmunohistoquímica de PTPL1 no se ha evaluado hasta el momento en los cánceres de próstata. Nosotros hemos observado mediante inmunohistoquímica en tejidos de pacientes con cáncer de próstata, que la expresión de PTPL1 y PKC δ es más alta en tumores bien diferenciados, con grado de Gleason bajo que en tumores mal diferenciados con alto grado de Gleason, de una forma estadísticamente significativa. En este sentido, la expresión de PTPL1 a nivel de RNAm es un indicador pronóstico independiente favorable de la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama (Révillion *et al.*, 2009). La pérdida de estas proteínas en tumores de próstata más agresivos y de peor pronóstico indica que su ausencia podría estar relacionada con la resistencia a apoptosis y la progresión tumoral.

2. PTPL1 E INVASIÓN

La carcinogénesis de la próstata implica una progresión de varios pasos desde células precancerosas a células que proliferan localmente y luego metastatizan. Se ha demostrado que PTPL1 inhibe la invasividad de las células de cáncer de ovario SKOV3 (Zhu *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2009) y de las células de cáncer de mama MCF7 (Glondou-Lassis *et al.*, 2010). De acuerdo con estos datos, el silenciamiento de PTPL1 en células PC3 induce un aumento del porcentaje de invasión (13,7%), lo que apoya la función de PTPL1 como inhibidor de la invasión. Los resultados de la matriz de cDNA y de la PCR cuantitativa también confirman esta función. Entre los genes inducidos diferencialmente en la matriz realizada con células PC3 siRNA control y siRNA PTPL1, se encuentran varios componentes del sistema uPA (activador del plasminógeno de tipo uroquinasa), osteopontina e integrina $\alpha 6$. El sistema uPA está formado por el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), su receptor (uPAR), el activador del plasminógeno tisular (tPA), el plasminógeno y los inhibidores de

los activadores del plasminógeno (PAIs). El uPA se secreta como un zimógeno (pro-uPA) y su activación se acelera por su unión a uPAR (Andreasen *et al.*, 2000). uPA activo cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina, que a su vez degrada distintos componentes de la matriz extracelular. Por tanto, uPA y su receptor se consideran reguladores del proceso metastásico en distintos estadios y representan una importante diana terapéutica. La actividad y el recambio de uPA están regulados por otro miembro del sistema, PAI-1, que es el principal inhibidor endógeno de uPA. De acuerdo con su función inhibidora, originalmente se predijo que suprimiría la proliferación y las metástasis de las células tumorales. Sin embargo, unos altos niveles de PAI-1 indican un peor pronóstico para la supervivencia en algunos cánceres humanos (Duffy, 2002; Werle *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha demostrado que tanto la proteína uPA derivada del tumor como la proteína PAI-1 derivada del tumor y del estroma juegan papeles importantes en el crecimiento intraóseo del cáncer de próstata metastásico mediante la regulación del eje uPA-uPAR-PAI-1 por mecanismos autocrinos/paracrinos (Dong *et al.*, 2008). Por tanto, el sistema uPA está particularmente asociado con el proceso de metástasis. En el cáncer de próstata, la sobreexpresión de uPA y PAI-1 está asociada con características patológicas adversas y con un riesgo más alto de recurrencia en hombres con cáncer clínicamente localizado tratados mediante prostatectomía radical (Gupta *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado en células PC3 que el silenciamiento de uPA y uPAR mediante RNA de interferencia inhibe la invasión, la supervivencia y la tumorigenicidad *in vivo* (Pulukuri *et al.*, 2005). La sobreexpresión de la integrina $\alpha 6$, un receptor de laminina, también está asociada con un aumento del potencial invasivo de las células de cáncer de próstata humano *in vitro* y con la progresión del carcinoma de próstata en biopsias humanas (Rabinovitz *et al.*, 1995; Schmelz *et al.*, 2002). La integrina $\alpha 6$ existe en la forma clásica (140 kDa) y en una forma más pequeña (70 kDa) llamada $\alpha 6p$. Esta variante, presente en el cáncer de próstata pero ausente en la próstata normal, se produce por la rotura proteolítica de la integrina $\alpha 6$ mediada por uPA, de forma independiente de plasmina, y potencia la migración y la invasión celular sobre laminina (Pawaret *et al.*, 2007). La rotura de la integrina $\alpha 6$ también

permite la extravasación de las células tumorales de próstata desde el sistema circulatorio al hueso (Portset *et al.*, 2009).

La osteopontina está sobreexpresada en diferentes cánceres y está implicada en invasión y metástasis (Rangaswamiet *et al.*, 2006). En pacientes con cáncer de próstata, el aumento de expresión de osteopontina correlaciona con el grado de Gleason y con la disminución de la supervivencia (Forootanet *et al.*, 2006). En piezas de prostatectomía, la expresión de osteopontina está asociada independientemente con la recurrencia bioquímica (Caruso *et al.*, 2008). Además, la osteopontina estimula la secreción de uPA en células tumorales de mama (Das *et al.*, 2004).

β -catenina forma parte, junto con E-cadherina y α -catenina, de un complejo proteico que media la adhesión celular. En células no estimuladas, la mayor parte de β -catenina se encuentra en las uniones adherentes entre células epiteliales. Para asegurar su rápido recambio, el exceso de β -catenina citoplásmica sintetizada de novo es fosforilada por un complejo de destrucción del que forman parte la quinasa GSK3 β y el supresor tumoral APC (Adenomatous Polyposis Coli). Una serie de fosforilaciones secuenciales la marcan para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma. β -catenina no fosforilada no se degrada y entra en el núcleo, donde actúa como coactivador transcripcional e interacciona con factores de transcripción como TCF y LEF, y conduce al aumento de transcripción de genes diana como MMP7, c-Myc, ciclina D1, c-jun, Fra y otros miembros de la familia c-fos (Willert & Jones, 2006, Yokoyama *et al.*, 2014). Se ha descrito que β -catenina fosforilada en tirosina puede ser desfosforilada *in vitro* por PTP-BL, el homólogo en ratón de PTPL1 (Erdmann, 2000) y que PTPL1 interacciona con APC (Erdmann *et al.*, 2000). También se ha descrito que GSK3 β fosforilada no puede fosforilar a β -catenina, permitiendo su acumulación (Willert & Jones, 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos, relativos a la disminución de la proliferación tras el silenciamiento de PTPL1, hemos observado una disminución de los niveles de ciclina D1, mientras que los niveles de GSK3 β fosforilada permanecen prácticamente sin cambios. Por tanto, β -catenina no parece activar la transcripción de la ciclina D1 ni de probablemente otras dianas

relacionadas con proliferación, al menos en este contexto. Además, la inmunofluorescencia de β -catenina muestra una relocalización de la membrana al citosol en células PC3 silenciadas para PTPL1, por lo que el mayor impacto de β -catenina puede darse sobre la adhesión celular y sobre dianas transcripcionales relacionadas con invasión, como uPA y uPAR (Hiendlmeyer et al., 2004; Wang et al., 2010), aunque la aclaración de este punto requeriría más experimentos.

En resumen, la supresión de la expresión endógena de PTPL1 produce un fenotipo más invasivo en células de cáncer de próstata. Este aumento del potencial invasivo puede explicarse, al menos en parte, por la inducción de mediadores de la invasión bien conocidos como el sistema uPA, osteopontina, integrina $\alpha 6$ y β -catenina. La influencia de PTPL1 sobre estas proteínas sugiere que actúa como un supresor tumoral, cuya disminución o ausencia de expresión podría estar relacionada con la progresión tumoral.

3. PTPL1 Y CICLO CELULAR

La influencia de PTPL1 sobre ciclo celular y proliferación no está muy estudiada. Los datos disponibles apuntan hacia una función en el control del ciclo celular meiótico en oocitos de *Xenopus* (Nedachi & Conti, 2004) y en la citocinesis en células HeLa (Herrmann et al., 2003). En este último estudio se observó que tanto el aumento del nivel de expresión de PTPL1 como la expresión de PTPL1 con un dominio tirosina fosfatasa inactivo conduce a defectos en la citocinesis y a la generación de células multinucleadas. Nosotros hemos mostrado que la disminución de la expresión de PTPL1 endógeno mediante siRNA produce una disminución de la proliferación y cambios en el perfil de ciclo celular en células PC3. Los niveles de expresión de varios reguladores del ciclo celular también apoyan este resultado. La ciclina E es esencial en la transición G₁/S (Malumbres & Barbacid, 2009) y PCNA tiene una función crítica en la replicación del DNA (Maga & Hubscher, 2003), por lo que, de acuerdo con la disminución de fase S observada, los niveles de expresión de ciclina

E y PCNA también son menores en células PC3 silenciadas para PTPL1. Los niveles de ciclina B1 y PTTG1 aumentan en mitosis (Malumbres & Barbacid, 2009; Ramos-Morales *et al.*, 2000) y la histona H3 se fosforila en la serina 10 al final de la profase (Hayashi-Takanaka *et al.*, 2009). También de acuerdo con la disminución de células en G₂/M, los niveles de ciclina B1, PTTG1 y fosfo-histona H3 son menores en células PC3 silenciadas para PTPL1. Estos datos pueden indicar una función de PTPL1 en la regulación del ciclo celular, dado que el silenciamiento de PTPL1 dificulta la progresión a través de las fases S y G₂/M en un cultivo asincrónico. Para estudiar este tema con mayor profundidad, las células PC3 silenciadas para PTPL1 se trataron con paclitaxel. El tratamiento con esta droga durante 24 h es igualmente eficiente llevando a las células siRNA control y siRNA PTPL1 a mitosis, a pesar del retraso en el ciclo celular observado en células PC3 asincrónicas silenciadas para PTPL1. Sin embargo, a 48 h, una gran proporción de células siRNA control ha salido de mitosis por deslizamiento mientras que las células siRNA PTPL1 permanecen más bloqueadas en mitosis.

Los datos indican una asociación, un tanto paradójica, entre mantenimiento de la mitosis e inhibición de la apoptosis en células PC3. Debido a las posibles implicaciones de este fenómeno en la adquisición de resistencia a paclitaxel, nos propusimos examinar si esa observación (aumento de mitosis e inhibición de apoptosis) se repetía en otra línea celular de cáncer de próstata (LNCaP), con mayor sensibilidad a la apoptosis inducida por paclitaxel. Además, el efecto de la ausencia de PTPL1 sobre la inhibición del deslizamiento nos hizo preguntarnos qué influencia podría tener PTTG1 sobre este proceso, dada la función central de esta proteína en el ciclo celular.

4. PTTG1, APOPTOSIS Y CICLO CELULAR

Los defectos en las maquinarias de ciclo celular y apoptosis influyen las respuestas celulares a las drogas utilizadas en quimioterapia; por tanto, una mejor comprensión de los

mecanismos que subyacen a las respuestas malas o incompletas puede ayudar a mejorar los regímenes terapéuticos.

Se ha publicado (Perez-Stable, 2006), que las células PC3 y LNCaP muestran una respuesta apoptótica diferente después del tratamiento con paclitaxel. También se ha descrito que las células PC3 tratadas con 50 ng/ml de paclitaxel durante 24 h antes de retirarlo, salen de mitosis sin hacer citocinesis, lo que conduce a la aparición de células poliploides. En este contexto, la muerte celular es un proceso lento y retrasado (aparece una población sub-G₁ después de 72 h de tratamiento), que ocurre después de la endoreplicación del DNA (Lanzi *et al.*, 2001). También se ha demostrado que las células PC3 salen de mitosis después de una parada prolongada inducida por paclitaxel a 150 nmol/L, y permanecen en un estado anormal parecido a G₁ durante un extenso periodo de tiempo (Shi *et al.*, 2008).

En nuestras condiciones experimentales, hemos observado que la mayoría de células PC3 han llegado a mitosis, pero no están en apoptosis, después de 24 h de tratamiento con paclitaxel 2.5 μ M. Las células LNCaP tratadas de forma similar también están llegando a mitosis e iniciando la apoptosis. Después de 48 h de tratamiento con la droga, la mayoría de células PC3 han salido de mitosis por deslizamiento, con un aumento paralelo de la apoptosis. Las células LNCaP en apoptosis también aumentan a ese tiempo, pero asociado con un aumento de las células mitóticas. La inducción de apoptosis por el paclitaxel está relacionada con su capacidad de parar a las células en mitosis (Shi *et al.*, 2008); nuestros datos también sugieren que la línea celular capaz de mantener la parada en mitosis más eficientemente es la más sensible al efecto apoptótico del paclitaxel.

Existen distintos estudios que documentan las funciones de PTTG1 en apoptosis. Concretamente, se ha publicado que la sobreexpresión de PTTG1 puede causar apoptosis dependiente e independiente de p53, en células de cáncer de mama MCF7 (p53 tipo salvaje) y células de osteosarcoma MG63 (deficientes en p53) (Yu *et al.*, 2000). También se ha publicado que PTTG1 induce la activación del promotor de p53 a través de c-myc y que la sobreexpresión de PTTG1 estimula la expresión de Bax, una diana conocida de p53

(Hamid & Kakar, 2004). Por el contrario, también se ha descrito que PTTG1 interacciona con p53 *in vitro* e *in vivo*, y que esta interacción bloquea la unión específica de p53 al DNA, inhibiendo su actividad transcripcional. En este contexto, la actividad del promotor de Bax disminuye, debido a la interacción PTTG1-p53, lo que conduce a una disminución de la apoptosis (Bernal *et al.*, 2002). También se ha observado en líneas celulares de hepatoma que la sobreexpresión de PTTG1 atenúa la apoptosis inducida por p53 (Cho-Rok *et al.*, 2006). Específicamente en cáncer de próstata, se ha observado que las células LNCaP transfectadas establemente con una construcción de PTTG1, mostraron unos porcentajes en las fases S y G₂/M más altos que las células transfectadas con el vector vacío. Recíprocamente, las células LNCaP transfectadas de forma estable con una construcción antisentido de PTTG1, mostraron un aumento de las células en fase G₁, comparadas con las células control (Zhu *et al.*, 2006), un hallazgo en consonancia con los efectos del siRNA PTTG1 observados en células JEG-3 (Tong *et al.*, 2007).

En el contexto de la apoptosis inducida por una droga antimitótica como el paclitaxel, hemos identificado dos situaciones en las que PTTG1 influye sobre el destino celular diferencialmente. El silenciamiento de PTTG1 en células PC3 no afecta a su capacidad de alcanzar mitosis en respuesta al tratamiento con paclitaxel; además el mantenimiento del estado mitótico se encuentra reforzado. De forma similar, las células PC3 que sobreexpresan PTTG1 también mantienen el estado mitótico de forma incrementada. Tanto la sobreexpresión de PTTG1 como el silenciamiento conducen a un aumento de la activación del SAC tras el tratamiento con paclitaxel, como indican los niveles más elevados de BubR1; esto podría explicar el aumento en las células mitóticas obtenido tras el tratamiento con paclitaxel en estas dos situaciones. El efecto más curioso y paradójico observado en las situaciones mencionadas es que el aumento de células mitóticas, es decir, la inhibición del deslizamiento, está asociado con una disminución de la apoptosis. El efecto del silenciamiento de PTTG1 en células LNCaP es marcadamente diferente. Las células LNCaP silenciadas para PTTG1 y tratadas con paclitaxel pierden su capacidad para llegar a mitosis y, por tanto, de morir por apoptosis. Por el contrario, las

células LNCaP que sobreexpresan PTTG1 tratadas con la droga, llegan a mitosis más eficientemente y muestran un aumento de la apoptosis. Estos datos están de acuerdo con el comportamiento clásico de las células sensibles al paclitaxel: llegan a mitosis y mueren por apoptosis durante la mitosis. Cuando se potencia la parada en mitosis, como ocurre en el caso de la sobreexpresión de PTTG1, la inducción de apoptosis también se potencia.

Como se comenta anteriormente, varios datos indican que la inducción del mantenimiento de la parada en mitosis en células PC3 no es suficiente para disparar la apoptosis. Primero, las células PC3 alcanzan mitosis rápidamente después del tratamiento con paclitaxel en las primeras 24 h; sin embargo, a ese tiempo, la apoptosis es apenas detectable. En segundo lugar, tanto el aumento de expresión de PTTG1 como su disminución elevan la proporción células mitóticas por inhibición del deslizamiento tras tratamiento con paclitaxel, pero ninguna de estas dos situaciones va unida a un aumento de apoptosis. Por tanto, la “comunicación” entre la maquinaria mitótica y la apoptótica parece estar desacoplada, dado que la parada en mitosis, independientemente de su duración, no facilita la apoptosis. De hecho, en este contexto, la apoptosis sólo tiene lugar después de que las células PC3 hayan sufrido deslizamiento. La relevancia de Mcl-1 durante la parada en mitosis y la apoptosis subsiguiente se ha ilustrado en varios estudios (Harley *et al.*, 2010; Wertz *et al.*, 2011). Estos estudios sugieren que la estabilización de Mcl-1 durante una parada en mitosis induce resistencia a apoptosis. Como hemos observado niveles altos de Mcl-1_L en células PC3 tratadas con paclitaxel durante 24 h, cuando la mayoría de las células están en mitosis, silenciamos PTTG1 y Mcl-1 y añadimos paclitaxel durante 48 h, para observar el efecto de la disminución de la expresión de Mcl-1 solo o en el contexto de una parada en mitosis más eficiente inducida por el silenciamiento de PTTG1. En ambas situaciones, las células PC3 mostraron un aumento de la mitosis unido a un aumento de la apoptosis, más marcado en el caso de las células silenciadas simultáneamente.

Finalmente, los resultados obtenidos con las células PC3 PTXR también apoyan los resultados previos. Concretamente, el efecto del tratamiento con paclitaxel en estas células

es similar a la situación obtenida con la sobreexpresión de PTTG1, ya que también muestran un aumento del mantenimiento de la mitosis y una disminución de la apoptosis después del tratamiento con paclitaxel. Sin embargo, en el caso de las células resistentes a paclitaxel, la disminución del deslizamiento no explica completamente la fuerte reducción de la apoptosis; la disminución de la proteína Bax y la incapacidad para disminuir los niveles de Mcl-1_L tras el tratamiento también podrían estar influyendo en el fenotipo resistente, ilustrando de nuevo la implicación de Mcl-1_L en el desarrollo de la resistencia a la apoptosis inducida por paclitaxel.

En resumen, en este modelo, la inducción de apoptosis más extensa tras tratamiento con paclitaxel se consigue cuando las células se paran en mitosis eficientemente, los niveles de la proteína PTTG1 son altos y los niveles de la proteína Mcl-1_L disminuyen rápidamente durante la mitosis. En el caso de células con propensión al deslizamiento, el mantenimiento de la parada en mitosis que ocurre tras el silenciamiento de PTTG1 no facilita la apoptosis, a menos que la disminución de expresión de Mcl-1_L tenga lugar al mismo tiempo. Estas diferentes posibilidades podrían ayudar a entender las bases moleculares que subyacen a las malas respuestas a la terapia con paclitaxel.

CONCLUSIONES

1. Las células PC3 son más sensibles a la inducción de apoptosis mediada por la combinación de PEITC y anti-Fas que a cualquiera de las dos drogas por separado.
2. El silenciamiento de PTPL1 produce resistencia a la apoptosis inducida por PEITC y anti-Fas, PEITC solo y paclitaxel en células PC3. En el caso del tratamiento con PEITC y anti-Fas, la disminución de apoptosis está asociada a un aumento de la proteína antiapoptótica Bcl-xL tras el silenciamiento de PTPL1 y a una disminución de la rotura de Mcl-1_L en células silenciadas y tratadas con la combinación de drogas. En células LNCaP, el silenciamiento de PTPL1 también produce resistencia a la apoptosis inducida por PEITC y anti-Fas.
3. En células PC3 con expresión de PTPL1 endógeno se produce una disminución de la fosforilación de PKC δ en la treonina 505 tras tratamiento con PEITC y anti-Fas, PEITC solo o paclitaxel, asociada a apoptosis, que no se produce en células silenciadas para PTPL1 tratadas. La disminución de la fosforilación no es equivalente a la pérdida de expresión de la quinasa, dado que el silenciamiento de PKC δ produce resistencia a la apoptosis inducida por PEITC y anti-Fas, PEITC solo y paclitaxel. En células LNCaP, el silenciamiento de PKC δ también produce resistencia a la apoptosis inducida con PEITC y anti-Fas y paclitaxel.
4. La ruta de transducción de señales mediada por PTPL1 y PKC δ influye sobre la fosforilación de NF κ B e I κ B α ; cuando PTPL1 y PKC δ son silenciadas simultáneamente, se produce el mayor aumento de la fosforilación de NF κ B (lo que indicaría una mayor activación), así como el mayor aumento de la fosforilación de I κ B α (lo que indicaría una mayor disociación de NF κ B). En este mismo sentido, la sobreexpresión de PTPL1 y PKC δ en células PC3 produce un aumento de la apoptosis tras tratamiento con PEITC y anti-Fas, asociado a una disminución de la fosforilación de NF κ B.

5. La señalización apoptótica inducida por PTPL1 está mediada, al menos en parte, por PKC δ , ya que el aumento de apoptosis que se obtiene tras la sobreexpresión de PTPL1 revierte parcialmente cuando se silencia PKC δ simultáneamente.
6. La expresión de PTPL1 y PKC δ es menor en cánceres de próstata pobremente diferenciados, de alto grado de Gleason, de forma estadísticamente significativa.
7. El silenciamiento de PTPL1 induce un fenotipo más invasivo en células PC3 en ensayos con matrigel. Este aumento del potencial invasivo está mediado, al menos en parte, por mediadores conocidos de la invasión como uPA, uPAR, integrina $\alpha 6$, osteopontina y β -catenina.
8. Las células PC3 silenciadas para PTPL1 muestran una disminución de la proliferación y un aumento de la fase G₀/G₁ comparadas con las células siRNA control. Tras tratamiento con paclitaxel, estas células sufren una disminución de la apoptosis, asociada a una parada en mitosis más robusta y una inhibición del deslizamiento, comparadas con las células siRNA control tratadas de la misma forma.
9. En células LNCaP, el tratamiento con paclitaxel induce apoptosis, asociada a una parada robusta en mitosis; sin embargo, en células PC3, el tratamiento con paclitaxel induce menos apoptosis que en células LNCaP y la que se produce, está asociada al deslizamiento de mitosis.
10. En células LNCaP, el silenciamiento de PTTG1 y el tratamiento con paclitaxel producen una disminución de apoptosis asociada a una menor llegada a mitosis;

por el contrario, la sobreexpresión de PTTG1 y el tratamiento con la droga producen un aumento de apoptosis asociada a una mayor parada en mitosis.

11. En células PC3 en cambio, tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de PTTG1 producen una disminución de la apoptosis, asociada en ambos casos a la inhibición del deslizamiento y a un aumento de la parada en mitosis. Sin embargo, el silenciamiento simultáneo de PTTG1 y Mcl-1 produce un aumento de apoptosis tras tratamiento con paclitaxel, asociado a un aumento de la parada en mitosis (o inhibición del deslizamiento), lo que indica que un incremento de la parada en mitosis por sí solo no es suficiente para inducir apoptosis y que existen mecanismos de bloqueo que dificultan la apoptosis durante la parada en mitosis. La combinación de un aumento de la parada en mitosis y la eliminación de uno de esos bloqueos, como Mcl-1, puede constituir una estrategia eficaz para conseguir una inducción de apoptosis eficiente en células propensas a sufrir deslizamiento, y por tanto, menos sensibles a los antimitóticos.

REFERENCIAS

-
- Abaan OD & Toretsky JA (2008). PTPL1: a large phosphatase with a split personality. *Cancer Metastasis Rev* 27(2):205–214
- Abate-Shen C & Shen MM (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14(19):2410–2434
- Adams JM (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17(20):2481–2495
- Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57(1):25–40
- Ashkenazi A & Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381):1305–1308
- Bernal JA, Luna R, Espina A, Lázaro I, Ramos-Morales F, Romero F, Arias C, Silva A, Tortolero M, Pintor-Toro JA (2002). Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat Genet* 32(2):306–311
- Berry W & Eisenberger M (2005). Achieving treatment goals for hormone-refractory prostate cancer with chemotherapy. *Oncologist* 10 Suppl 3:30–39
- Bertani G (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* 186(3):595–600
- Bhalla KN (2003). Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 22(56):9075–9086
- Boelaert K, McCabe CJ, Tannahill LA, Gittoes NJ, Holder RL, Watkinson JC, Bradwell AR, Sheppard MC, Franklyn JA (2003). Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 88(5):2341–2347
- Bompard G, Puech C, Prébois C, Vignon F, Freiss G (2002). Protein-tyrosine phosphatase PTPL1/FAP-1 triggers apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 277(49):47861–47869

- Brito DA, Rieder CL (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol* 16(12):1194–1200
- Brodie C & Blumberg PM (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase C delta. *Apoptosis* 8:19–27
- Bruckheimer EM & Kyprianou N (2000). Apoptosis in prostate carcinogenesis. A growth regulator and a therapeutic target. *Cell Tissue Res* 301(1):153–162
- Caruso DJ, Carmack AJ, Lokeshwar VB, Duncan RC, Soloway MS, Lokeshwar BL (2008). Osteopontin and interleukin-8 expression is independently associated with prostate cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 14(13):4111–4118
- Castilla C, Congregado B, Chinchón D, Torrubia FJ, Japón MA, Sáez C (2006). Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology* 147(10):4960–4967
- Chen Z, Forman LW, Williams RM, Faller DV (2014). Protein kinase C- δ inactivation inhibits the proliferation and survival of cancer stem cells in culture and *in vivo*. *BMC cancer* 14:90
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37(3):299–310
- Cho-Rok J, Yoo J, Jang YJ, Kim S, Chu IS, Yeom YI, Choi JY, Im DS (2006). Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 43(5):1042–1052
- Ciliberto A & Shah JV (2009). A quantitative systems view of the spindle assembly checkpoint. *EMBO J* 28(15):2162–2173
- Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, Olsson CA, Korsmeyer S, Buttyan R (1993). Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 143(2):390–400
- Cornford P, Evans J, Dodson A, Parsons K, Woolfenden A, Neoptolemos J, Foster CS (1999). Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer. *Am J Pathol* 154(1):137–144

- Costa-Pereira AP, Cotter TG (1999). Camptothecin sensitizes androgen-independent prostate cancer cells to anti-Fas-induced apoptosis. *Br J Cancer* 80:371–378
- Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Hobisch A (2002). Androgen receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 9(3):155–170
- Das R, Mahabeleshwar GH, Kundu GC (2004). Osteopontin induces AP-1-mediated secretion of urokinase-type plasminogen activator through c-Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in breast cancer cells. *J Biol Chem* 279(12):11051–11064
- Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ, Samarasinghe H (2012). Gleason grading: past, present and future. *Histopathology* 60(1):75–86
- Domínguez A, Ramos-Morales F, Romero F, Rios RM, Dreyfus F, Tortolero M, Pintor-Toro JA (1998). hPTTG, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene* 17(17):2187–2193
- Dong Z, Saliganan AD, Meng H, Nabha SM, Sabbota AL, Sheng S, Bonfil RD, Cher ML (2008). Prostate cancer cell-derived urokinase-type plasminogen activator contributes to intraosseous tumor growth and bone turnover. *Neoplasia* 10(5):439–449
- Dromard M, Bompard G, Glondou-Lassis M, Puech C, Chalhoub D, Freiss G (2007). The putative tumor suppressor gene PTPN13/PTPL1 induces apoptosis through insulin receptor substrate-1 dephosphorylation. *Cancer Res* 67(14):6806–6813
- Duffy MJ (2002). Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 48(8):1194–1197
- Erdmann KS, Kuhlmann J, Lessmann V, Herrmann L, Eulenburger V, Müller O, Heumann R (2000). The adenomatous polyposis coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain. *Oncogene* 19(34):3894–3901
- Erdmann KS (2003). The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/ Basophil-like. Interacting proteins and molecular functions. *Eur J Biochem* 270(24):4789–4798

- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56(1):5–51
- Fan C, Yang J, Engelhardt JF (2002). Temporal pattern of NFkappaB activation influences apoptotic cell fate in a stimuli-dependent fashion. *J Cell Sci* 115(Pt 24):4843–4853
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>
- Forootan SS, Foster CS, Aachi VR, Adamson J, Smith PH, Lin K, Ke Y (2006). Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer. *Int J Cancer* 118(9):2255–2261
- Gan L, Chen S, Wang Y, Watahiki A, Bohrer L, Sun Z, Wang Y, Huang H (2009). Inhibition of the androgen receptor as a novel mechanism of taxol chemotherapy in prostate cancer. *Cancer Res* 69(21):8386–8394
- Gascoigne KE & Taylor SS (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* 14(2):111–122
- Gascoigne KE & Taylor SS (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci* 122(Pt 15):2579–2585
- Gill C, Walsh SE, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW (2007). Resveratrol sensitizes androgen independent prostate cancer cells to death-receptor mediated apoptosis through multiple mechanisms. *Prostate* 67(15):1641–1653
- Gleason DF & Mellinger GT (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111(1):58–64
- Glondou-Lassis M, Dromard M, Lacroix-Triki M, Nirdé P, Puech C, Knani D, Chalbos D, Freiss G (2010). PTPL1/PTPN13 regulates breast cancer cell aggressiveness through direct inactivation of Src kinase. *Cancer Res* 70(12):5116–5126

Gonzalez-Guerrico AM & Kazanietz MG (2005). Phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via autocrine activation of the extrinsic apoptotic cascade: a key role for protein kinase C delta. *J Biol Chem* 280(47):38982–38991

Goto T, Takano M, Hirata J, Tsuda H (2008). The involvement of FOXO1 in cytotoxic stress and drug-resistance induced by paclitaxel in ovarian cancers. *Br J Cancer* 98(6):1068–1075

Gupta A, Lotan Y, Ashfaq R, Roehrborn CG, Raj GV, Aragaki CC, Montorsi F, Shariat SF (2009). Predictive value of the differential expression of the urokinase plasminogen activation axis in radical prostatectomy patients. *Eur Urol* 55(5):1124–1133

Gurbuz N, Park MA, Dent P, Abdel Mageed AB, Sikka SC, Baykal A (2015). Cystine dimethyl ester induces apoptosis through regulation of PKC- δ and PKC- ϵ in prostate cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 15(2):217-227

Guseva NV, Taghiyev AF, Rokhlin OW, Cohen MB (2002). Contribution of death receptor and mitochondrial pathways to Fas-mediated apoptosis in the prostatic carcinoma cell line PC3. *Prostate* 51(4):231–240

Haldar S, Chintapalli J, Croce CM (1996). Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res* 56(6):1253–1255

Hamid T & Kakar SS (2004). PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. *Mol Cancer* 3:18

Harley ME, Allan LA, Sanderson HS, Clarke PR (2010). Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J* 29(14):2407–2420

Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H (2009). Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *J Cell Biol* 187(6):781–790

Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, Nelson V, Nakashima M, Melmed S (2000). Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *Lancet* 355(9205):716–719

Hedlund TE, Duke RC, Schleicher MS, Miller GJ (1998). Fas-mediated apoptosis in seven human prostate cancer cell lines: correlation with tumor stage. *Prostate* 36(2):92–101

Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770–776

Herrmann L, Dittmar T, Erdmann KS (2003). The protein tyrosine phosphatase PTP-BL associates with the midbody and is involved in the regulation of cytokinesis. *Mol Biol Cell* 14(1):230–240

Hiendlmeyer E, Regus S, Wassermann S, Hlubek F, Haynl A, Dimmler A, Koch C, Knoll C, van Beest M, Reuning U, Brabletz T, Kirchner T, Jung A (2004). Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors. *Cancer Res* 64(4):1209–1214

Hoover AC, Strand GL, Nowicki PN, Anderson ME, Vermeer PD, Klingelutz AJ, Bossler AD, Pottala JV, Hendriks WJ, Lee JH (2009). Impaired PTPN13 phosphatase activity in spontaneous or HPV-induced squamous cell carcinomas potentiates oncogene signaling through the MAP kinase pathway. *Oncogene* 28(45): 3960–3970

Huggins C & Hodges CV (1941). Studies on prostatic cancer: the effects of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research* 1:293–297

Isaacs JT & Isaacs WB (2004). Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nature Medicine* 10(1):26–27

Jackson DN & Foster DA (2004). The enigmatic protein kinase C delta: complex roles in cell proliferation and survival. *FASEB J* 18(6):627–636

Jeske S, Tagawa ST, Olowokure O, Selzer J, Giannakakou P, Nanus DM (2011). Carboplatin plus paclitaxel therapy after docetaxel in men with metastatic castrate resistant prostate cancer. *Urol Oncol* 29(6):676–681

Joo JH & Jetten AM (2008). NF-kappaB-dependent transcriptional activation in lung carcinoma cells by farnesol involves p65/RelA(Ser276) phosphorylation via the MEK-MSK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 283(24):16391–16399

- Kelly PN & Strasser A (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 18(9):1414–1424
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239–257
- Kharait S, Dhir R, Lauffenburger D, Wells A (2006). Protein kinase C delta signaling downstream of the EGF receptor mediates migration and invasiveness of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343(3):848–856
- Lai YJ, Lin WC, Lin FT (2007). PTPL1/FAP-1 negatively regulates TRIP6 function in lysophosphatidic acid-induced cell migration. *J Biol Chem* 282(33):24381–24387
- Lanzi C, Cassinelli G, Cuccuru G, Supino R, Zuco V, Ferlini C, Scambia G, Zunino F (2001). Cell cycle checkpoint efficiency and cellular response to paclitaxel in prostate cancer cells. *Prostate* 48(4):254–264
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281(5385):2042–2045
- Li L, Ittmann MM, Ayala G, Tsai MJ, Amato RJ, Wheeler TM, Miles BJ, Kadmon D, Thompson TC (2005). The emerging role of the PI3-K-Akt pathway in prostate cancer progression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8(2):108–118
- Li Y, Kanki H, Hachiya T, Ohyama T, Irie S, Tang G, Mukai J, Sato T (2000). Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int J Cancer* 87(4):473–479
- Liu Y, Belkina NV, Graham C, Shaw S (2006). Independence of protein kinase C-delta activity from activation loop phosphorylation: structural basis and altered functions in cells. *J Biol Chem* 281(17):12102–12111
- Lopez-Beltran A, Mikuz G, Luque RJ, Mazzucchelli R, Montironi R (2006). Current practice of Gleason grading of prostate carcinoma. *Virchows Arch* 448(2):111–118

- Lu PH, Yu CC, Chiang PC, Chen YC, Ho YF, Kung FL, Guh JH (2011). Paclitaxel induces apoptosis through activation of nuclear protein kinase C- δ and subsequent activation of Golgi associated Cdk1 in human hormone refractory prostate cancer. *J Urol* 186(6):2434–2441
- Maga G & Hubscher U (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116(Pt 15):3051–3060
- Mahmood Z & Shukla Y (2010). Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 316(6):887–899
- Malumbres M & Barbacid M (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3):153–166
- Manchado E, Guillaumot M, Malumbres M (2012). Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ* 19(3):369–377
- Miyazaki T, Atarashi Y, Yasumura S, Minatoya I, Ogawa K, Iwamoto M, Minemura M, Shimizu Y, Sato TA, Watanabe A, Sugiyama T (2006). Fas-associated phosphatase-1 promotes Fas-mediated apoptosis in human colon cancer cells: novel function of FAP-1. *J Gastroenterol Hepatol* 21(1 Pt 1):84–91
- Morrissey C & Vessella RL (2007). The role of tumor microenvironment in prostate cancer bone metastasis. *J Cell Biochem* 101(4):873–886
- Musacchio A & Salmon ED (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5):379–393
- Nakai Y, Irie S, Sato TA (2000). Identification of I κ B α as a substrate of Fas-associated phosphatase-1. *Eur J Biochem* 267(24):7170–7175
- Nedachi T & Conti M (2004). Potential role of protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 13 in the control of oocyte meiotic maturation. *Development* 131(20):4987–4998
- Olsson M & Zhivotovsky B (2011). Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 18(9):1441–1449

Pawar SC, Demetriou MC, Nagle RB, Bowden GT, Cress AE (2007). Integrin alpha6 cleavage: a novel modification to modulate cell migration. *Exp Cell Res* 313(6):1080–1089

Pérez de Castro I, de Cárcer G, Malumbres M (2007). A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis* 28(5):899–912

Perez-Stable C (2006). 2-Methoxyestradiol and paclitaxel have similar effects on the cell cycle and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Lett* 231(1):49–64

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45

Pop C & Salvesen GS (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284(33):21777–21781

Ports MO, Nagle RB, Pond GD, Cress AE (2009). Extracellular engagement of alpha 6 integrin inhibited urokinase-type plasminogen activator-mediated cleavage and delayed human prostate bone metastasis. *Cancer Res* 69(12):5007–5014

Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV, Fojo T (1998). Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* 58(15):3331–3338

Pullar JM, Thomson SJ, King MJ, Turnbull CI, Midwinter RG, Hampton MB (2004). The chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate sensitizes cells to Fas-mediated apoptosis. *Carcinogenesis* 25(5):765–772

Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, Rao JS (2005). RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem* 280(43):36529–36540

Puri R, Tousson A, Chen L, Kakar SS (2001). Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors. *Cancer Lett* 163(1):131–139

- Rabinovitz I, Nagle RB, Cress AE (1995). Integrin alpha 6 expression in human prostate carcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype in vitro and in vivo. *Clin Exp Metastasis* 13(6):481–491
- Ramos-Morales F, Domínguez A, Romero F, Luna R, Multon MC, Pintor-Toro JA, Tortolero M (2000). Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. *Oncogene* 19(3):403–409
- Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC (2006). Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol* 16(2):79–87
- Révillion F, Puech C, Rabenoelina F, Chalbos D, Peyrat JP, Freiss G (2009). Expression of the putative tumor suppressor gene PTPN13/PTPL1 is an independent prognostic marker for overall survival in breast cancer. *Int J Cancer* 124(3):638–643
- Rokhlin OW, Bishop GA, Hostager BS, Waldschmidt TJ, Sidorenko SP, Pavloff N, Kiefer MC, Umansky SR, Glover RA, Cohen MB (1997). Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 57(9):1758–1768
- Romero F, Multon MC, Ramos-Morales F, Dominguez A, Bernal JA, Pintor-Toro JA, Tortolero M (2001). Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res* 29:1300–1307
- Sáez C, Japón MA, Ramos-Morales F, Romero F, Segura DI, Tortolero M, Pintor-Toro JA (1999). hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias. *Oncogene* 18(39):5473–5476
- Sáez C, Pereda T, Borrero JJ, Espina A, Romero F, Tortolero M, Pintor-Toro JA, Segura DI, Japón MA (2002). Expression of hpttg proto-oncogene in lymphoid neoplasias. *Oncogene* 21(53):8173–8177
- Sáez C, Martínez-Brocca MA, Castilla C, Soto A, Navarro E, Tortolero M, Pintor-Toro JA, Japón MA (2006). Prognostic significance of human pituitary tumor-transforming gene immunohistochemical expression in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91(4):1404–1409

- Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV, Cusimano M (2008). Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer* 15(3):721–743
- Santen RJ (1992). Endocrine treatment of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 75(3):685–689
- Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268(5209):411–415
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17(6):1675–1687
- Schmelz M, Cress AE, Scott KM, Burger F, Cui H, Sallam K, McDaniel KM, Dalkin BL, Nagle RB (2002). Different phenotypes in human prostate cancer: alpha6 or alpha3 integrin in cell-extracellular adhesion sites. *Neoplasia* 4(3):243–254
- Shen MM & Abate-Shen C (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 24(18):1967–2000
- Shi J, Orth JD, Mitchison T (2008). Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Res* 68(9):3269–3276
- Smith DC, Tangen CM, Van Veldhuizen PJ Jr, Harrer GW, Golshayan A, Mills GM, Vogelzang NJ, Thompson IM, Hussain MH (2011). Phase II evaluation of early oral estramustine, oral etoposide, and intravenous paclitaxel combined with hormonal therapy in patients with high-risk metastatic prostate adenocarcinoma: Southwest Oncology Group S0032. *Urology* 77(5):1172–1176
- Solbach C, Roller M, Fellbaum C, Nicoletti M, Kaufmann M (2004). PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence. *Breast* 13(1):80–81
- Steinberg SF (2004). Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C delta. *Biochem J* 384(Pt 3):449–459

Stempka L, Girod A, Müller HJ, Rincke G, Marks F, Gschwendt M, Bossemeyer D (1997). Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form. *J Biol Chem* 272(10):6805–6811

Suh J & Rabson AB (2004). NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 91(1):100–117

Sumitomo M, Ohba M, Asakuma J, Asano T, Kuroki T, Asano T, Hayakawa M (2002). Protein kinase C delta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J Clin Invest* 109(6):827–836

Sumitomo M, Asano T, Asakuma J, Asano T, Nanus DM, Hayakawa M (2004). Chemosensitization of androgen-independent prostate cancer with neutral endopeptidase. *Clin Cancer Res* 10(1 Pt 1):260–266

Sunters A, Madureira PA, Pomeranz KM, Aubert M, Brosens JJ, Cook SJ, Burgering BM, Coombes RC, Lam EW (2006). Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Res* 66(1):212–220

Taghiyev AF, Guseva NV, Sturm MT, Rokhlin OW, Cohen MB (2005). Trichostatin A (TSA) sensitizes the human prostatic cancer cell line DU145 to death receptor ligands treatment. *Cancer Biol Ther* 4(4):382–390

Taplin ME & Balk SP (2004). Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem* 91(3):483–490.

Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S (2007). Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene* 26(38):5596–5605

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245(4915): 301–305

True L, Coleman I, Hawley S, Huang CY, Gifford D, Coleman R, Beer TM, Gelmann E, Datta M, Mostaghel E, Knudsen B, Lange P, Vessella R, Lin D, Hood L, Nelson PS (2006).

A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29):10991–10996

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097–1099

Ungefroren H, Kruse ML, Trauzold A, Roeschmann S, Roeder C, Arlt A, Henne-Bruns D, Kalthoff H (2001). FAP-1 in pancreatic cancer cells: functional and mechanistic studies on its inhibitory role in CD95-mediated apoptosis. *J Cell Sci* 114(Pt 15):2735–2746

Uslu R, Borsellino N, Frost P, Garban H, Ng C, Mizutani Y, Belldegrün A, Bonavida B (1997). Chemosensitization of human prostate carcinoma cell lines to anti-Fas-mediated cytotoxicity and apoptosis. *Clinical Cancer Res* 3(6):963–972

Uzgare AR & Isaacs JT (2005). Prostate cancer: potential targets of anti-proliferative and apoptotic signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37(4):707–714

Uzzo RG, Haas NB, Crispen PL, Kolenko VM (2008). Mechanisms of apoptosis resistance and treatment strategies to overcome them in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 112(8):1660–1671

Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440–442

Villar J, Arenas MI, MacCarthy CM, Blázquez MJ, Tirado OM, Notario V (2007). PCPH/ENTPD5 expression enhances the invasiveness of human prostate cancer cells by a protein kinase C delta-dependent mechanism. *Cancer Res* 67(22):10859–10868

Vlotides G, Eigler T, Melmed S (2007). Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Rev* 28(2):165–186

Wang Q, Sun ZX, Allgayer H, Yang HS (2010). Downregulation of E-cadherin is an essential event in activating beta-catenin/Tcf-dependent transcription and expression of its target genes in Pcd4 knockdown cells. *Oncogene* 29(1):128–138

Wang Z, Shen D, Parsons DW, Bardelli A, Sager J, Szabo S, Ptak J, Silliman N, Peters BA, van der Heijden MS, Parmigiani G, Yan H, Wang TL, Riggins G, Powell SM, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2004). Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* 304(5674):1164–1166

Werle B, Kotsch M, Lah TT, Kos J, Gabrijelcic-Geiger D, Spiess E, Schirren J, Ebert W, Fiehn W, Luther T, Magdolen V, Schmitt M, Harbeck N (2004). Cathepsin B, plasminogen activator inhibitor (PAI-1) and plasminogen activator-receptor (uPAR) are prognostic factors for patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 24(6):4147–4161

Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, Helgason E, Ernst JA, Eby M, Liu J, Belmont LD, Kaminker JS, O'Rourke KM, Pujara K, Kohli PB, Johnson AR, Chiu ML, Lill JR, Jackson PK, Fairbrother WJ, Seshagiri S, Ludlam MJ, Leong KG, Dueber EC, Maecker H, Huang DC, Dixit VM (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* 471(7336):110–114

Willert K & Jones KA (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20(11):1394–1404

Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N (2001). Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Res* 61(3):1227–1232

Wittekind C & Neid M (2005). Cancer invasion and metastasis. *Oncology* 69(Suppl 1):14–16

Wong RW (2010). An update on cohesin function as a 'molecular glue' on chromosomes and spindles. *Cell Cycle* 9(9):1754–1758

Xiao D & Singh SV (2002). Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in p53-deficient PC-3 human prostate cancer cell line is mediated by extracellular signal-regulated kinases. *Cancer Res* 62(13):3615–3619

Xiao D, Johnson CS, Trump DL, Singh SV (2004). Proteasome-mediated degradation of cell division cycle 25C and cyclin-dependent kinase 1 in phenethyl isothiocyanate-induced G2-M-phase cell cycle arrest in PC-3 human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3(5):567–575

Xiao D, Zeng Y, Choi S, Lew KL, Nelson JB, Singh SV (2005). Caspase-dependent apoptosis induction by phenethyl isothiocyanate, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent, is mediated by Bak and Bax. *Clin Cancer Res* 11(7):2670–2679

Xiao D, Lew KL, Zeng Y, Xiao H, Marynowski SW, Dhir R, Singh SV (2006). Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis* 27(11):2223–2234

Xu C, Shen G, Chen C, G elinas C, Kong AN (2005). Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncogene* 24(28):4486–4495

Yang CC, Lin HP, Chen CS, Yang YT, Tseng PH, Rangnekar VM, Chen CS (2003). Bcl-xL mediates a survival mechanism independent of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 278(28):25872–25878

Yao H, Song E, Chen J, Hamar P (2004). Expression of FAP-1 by human colon adenocarcinoma: implication for resistance against Fas-mediated apoptosis in cancer. *Br J Cancer* 91(9):1718–1725

Yeh SH, Wu DC, Tsai CY, Kuo TJ, Yu WC, Chang YS, Chen CL, Chang CF, Chen DS, Chen PJ (2006). Genetic characterization of fas-associated phosphatase-1 as a putative tumor suppressor gene on chromosome 4q21.3 in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 12(4):1097–1108

Ying J, Li H, Cui Y, Wong AH, Langford C, Tao Q (2006). Epigenetic disruption of two proapoptotic genes MAPK10/JNK3 and PTPN13/FAP-1 in multiple lymphomas and carcinomas through hypermethylation of a common bidirectional promoter. *Leukemia* 20(6):1173–1175

Yokoyama NN, Shao S, Hoang BH, Mercola D, Zi X (2014). Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *Am J Clin Exp Urol* 2(1):27–44

Yu R, Heaney AP, Lu W, Chen J, Melmed S (2000). Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. *J Biol Chem* 275(47):36502–36505

Yu R, Lu W, Chen J, McCabe CJ, Melmed S (2003). Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology* 144(11):4991–4998

Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S (1999). Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84(2):761–767

Zhu JH, Chen R, Yi W, Cantin GT, Fearn C, Yang Y, Yates JR3rd, Lee JD (2008). Protein tyrosine phosphatase PTPN13 negatively regulates Her2/ErbB2 malignant signalling. *Oncogene* 27(18):2525–2531

Zhu X, Mao Z, Na Y, Guo Y, Wang X, Xin D (2006). Significance of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1) in prostate cancer. *Anticancer Res* 26(2A):1253–1259

Zhuang J & Brady HJ (2006). Emerging role of Mcl-1 in actively counteracting BH3-only proteins in apoptosis. *Cell Death Differ* 13(8):1263–1267

Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 285:418–422

Zur A & Brandeis M (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J* 20(4):792–801

ANEXO

Con los resultados expuestos en esta tesis doctoral, se han publicado los siguientes artículos:

Castilla C, Flores ML, Conde JM, Medina R, Torrubia FJ, Japón MA, Sáez C (2012). Downregulation of protein tyrosine phosphatase PTPL1 alters cell cycle and upregulates invasion-related genes in prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 29(4):349–358

Castilla C, Chinchón D, Medina R, Torrubia FJ, Japón MA, Sáez C (2013). PTPL1 and PKC δ contribute to proapoptotic signalling in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 4:e576

Castilla C, Flores ML, Medina R, Pérez-Valderrama B, Romero F, Tortolero M, Japón MA, Sáez C (2014). Prostate cancer cell response to paclitaxel is affected by abnormally expressed securin PTTG1. *Mol Cancer Ther* 13(10):2372–2