

Papel de la fosfatasa SHP-1 en el cáncer de próstata resistente a la castración.

Álvaro Antolínez Fernández^a, Santiago Ropero Salinas^b, Begoña Colás Escudero

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

a. alvaroaantolinez97@gmail.com b. santiago.ropero@uah.es

Palabras clave: Cáncer de próstata; receptor de andrógenos; CRISPR/Cas9; SHP-1; LNCaP; VCaP

Resumen

El cáncer de próstata (CP) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo occidental. Inicialmente, el desarrollo de este tipo de cáncer es dependiente de andrógenos, por ello, el tratamiento convencional consiste en la deprivación androgénica. Aunque se consigue la regresión del tumor, en un alto porcentaje de pacientes progresa hacia formas más agresivas de la enfermedad denominadas cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). Entre los mecanismos por los cuales se desarrolla la resistencia se ha descrito la activación del receptor de andrógenos (AR) a través de vías independientes de andrógenos, el cual se activará, translocará al núcleo y aumentará la expresión de genes relacionados con la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. Uno de los principales reguladores negativos de estas vías es la proteína SHP-1, una fosfatasa encargada de desfosforilar los residuos de tirosina de multitud de proteínas de estas vías. En este trabajo nos planteamos conocer mejor el papel de esta fosfatasa en el desarrollo del CRPC y su función sobre el AR. Para ello, silenciaremos SHP-1 mediante la técnica CRISPR/Cas9, una técnica reciente de edición genética, y determinaremos su papel en la fosforilación y actividad del AR, y como afecta a la supervivencia y proliferación de dos líneas celulares del cáncer de próstata con diferente sensibilidad a los tratamientos hormonales. Este estudio tendrá la finalidad de obtener nueva información sobre el papel de esta fosfatasa en fases más agresivas del cáncer con el fin de encontrar nuevas dianas terapéuticas que mejoren los tratamientos actuales de esta enfermedad y, por tanto, la supervivencia de estos pacientes.

Cita: Antolínez Fernández, Álvaro; Ropero Salinas, Santiago; Colás Escudero, Begoña (2020) Papel de la fosfatasa SHP-1 en el cáncer de próstata resistente a la castración. *dianas* 9 (2): e202009fa02. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202009fa02](http://www3.uah.es/dianas?e202009fa02) <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa02>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

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

Introducción

El cáncer de próstata (CP) es la segunda causa de muerte entre los hombres en los países industrializados, por lo que representa un problema de salud pública de primer orden según la organización Mundial de la Salud (OMS) [1]. En España se siguen diagnosticando más de 25000 casos al año, representando un 21% de los tumores en varones [2]. La mayoría suelen ser detectados en edades avanzadas, entre los 70 y 75 años [3], por lo que la edad es uno de los principales factores de riesgo. En los últimos años se ha producido un extraordinario avance en los mecanismos de detección, lo que ha mejorado la supervivencia global de los pacientes con cáncer de próstata. Sin embargo, aún hay un importante número de casos en los que la enfermedad se diagnóstica en estadillos más avanzados y otros que recaen tras el tratamiento con la aparición de formas más agresivas de la enfermedad.

Los andrógenos juegan un papel muy importante en la progresión de esta patología a través de su unión al receptor de andrógenos (AR) [4]. Este receptor pertenece a la familia de receptores nucleares, actuando en última instancia como factor de transcripción. Su activación, a través de la unión a andrógenos, hace que se transloque al núcleo y se una a secuencias de DNA específicas denominadas elementos de respuesta a andrógenos (AREs), regulando la expresión de genes encargados de la progresión de esta enfermedad [5,6]. De ahí que uno de los tratamientos más comunes sea la deprivación androgénica, la cual es efectiva durante un tiempo, hasta que el CP avanza a una fase más agresiva donde su crecimiento se vuelve independiente de andrógenos, llamada cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC).

Aunque los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla esta resistencia son aún objeto de estudio, hasta el momento, se han descrito los siguientes: sobreexpresión del AR; mutación del gen que codifica para el AR; expresión de variantes de splicing del AR que son activas en ausencia de ligando; activación del AR de forma independiente de ligando a través de vías de transducción de señales alternativas, como las reguladas por EGFR o PI3K/AKT; y producción intratumoral de andrógenos [7].

Como se acaba de comentar, en el CRPC el AR se sigue expresando y activando, a través de rutas independientes de andrógenos, las cuales están reguladas por diferentes factores de crecimiento y citoquinas (EGF, TGF β , IGF-1, VEGF, IL-6). Estos factores inducen la activación de ciertas proteínas quinasas como MAPK, PI3K, Src o ACK1, que llevarán a cabo la fosforilación del receptor en múltiples residuos de serina, treonina y tirosina. En las fases más agresivas del CP se ha visto que algunas de estas rutas se encuentran desreguladas. En concreto se ha visto que la ruta de las MAPKs se encuentra sobreexpresada, aumentando la proliferación de las células cancerosas [8]. También la ruta PI3K/AKT se encuentra sobreexpresada en este tipo de tumores debido a la pérdida de PTEN, un conocido supresor tumoral que ayuda a catalizar el paso de PIP3 a PIP2 en esta ruta [9]. Además, suele haber una sobreexpresión de ciertos factores de crecimiento como VEGF o EGF [10], que conllevan una mayor activación de las quinasas Src o ACK1, asociándose este incremento a una disminución de la tasa de supervivencia y un peor pronóstico. Por último, recientemente, se ha demostrado que IL-6 provoca la fosforilación y activación de STAT3 que a su vez interacciona con el AR provocando su fosforilación en tirosina, activación y translocación al núcleo [11].

La actividad de estas puede inducir en última instancia que el AR se fosforile en residuos de tirosina, serina y treonina a través de diferentes proteínas quinasas, regulando funciones tan diversas como la estabilidad del receptor, la localización nuclear, su unión al DNA e interacciones proteína-proteína, lo que al final determinará la especificidad y el grado de regulación de los genes diana. Por lo tanto, la fosforilación del AR puede contribuir a su activación en ausencia de andrógenos o a su sensibilización a bajos niveles de estos y jugar un papel importante en el desarrollo de la independencia androgénica del cáncer de próstata [12].

En cuanto a la fosforilación del AR en residuos de tirosina, hasta el momento se conocen con detalle las tirosinas quinasa encargadas de su fosforilación, pero menos conocidas son las tirosinas fosfatasas que lo desfosforilan [13]. Es evidente que los cambios en la fosforilación del receptor pueden deberse también a alteraciones en la actividad de estas fosfatasas. Nuestro grupo fue el primero en describir la expresión de una de estas PTPs, SHP-1, en las líneas celulares tumorales prostáticas humanas PC3 y LNCaP, y en la próstata humana [14]. SHP-1 es una proteína citosólica de 66 KDa codificada por el gen PTPN6 (proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 6) que posee dos dominios SH2 de unión a tirosinas fosforiladas. SHP-1 se expresa predominantemente en células hematopoyéticas y moderadamente en otros tipos celulares como células epiteliales de la próstata [15].

Estos hallazgos del grupo al que me he incorporado indican que esta enzima está presente en alteraciones no malignas (hiperplasia prostática benigna), en lesiones precursoras del adenocarcinoma prostático (neoplasia intraepitelial prostática), y en carcinoma de próstata bien diferenciado. También se ha demostrado que los cambios de expresión de esta fosfatasa en la línea celular de cáncer de próstata PC3 provocan cambios en la proliferación celular. Se demostró que la ausencia de esta fosfatasa se podía relacionar con un avance hacia estadios más agresivos del cáncer a través de la regulación que lleva a cabo en el ciclo celular, inhibiendo la progresión G1/S, a través de la modificación de la expresión de reguladores del ciclo celular como p27 y la ciclina E [16].

Por otra parte, se ha visto que en cáncer de hígado la vía de señalización controlada por IL-6 y STAT3 está regulada negativamente por la tirosina fosfatasa SHP-1 mediante la desfosforilación de STAT3. En concreto, en este tipo de tumores SHP-1 se comporta como un supresor tumoral, y de hecho se han aprobado tratamientos con compuestos que estimulan la actividad de SHP-1 que han demostrado su eficacia en la inhibición del crecimiento tumoral y la transición epitelio-mesénquima [17].

Por lo tanto, todos estos datos sugieren que SHP-1 podría estar regulando la actividad del receptor de andrógenos tanto de modo directo mediante su desfosforilación, o de forma indirecta controlando las rutas de señalización responsables de la fosforilación del AR como PI3K/AKT, Src o STAT, lo que nos lleva a pensar en esta fosfatasa como una posible diana terapéutica contra el CRPC.

Con el objetivo de estudiar la función que lleva a cabo SHP-1 en este cáncer nuestro grupo de laboratorio comenzó su abordaje realizando silenciamientos temporales mediante RNA de interferencia, lo que ha producido resultados esperanzadores [16]. El reciente descubrimiento de la edición genética mediante el sistema CRISPR/Cas9 permite realizar silenciamientos estables, lo que la convierte en una valiosa herramienta para el estudio de la función de cualquier proteína. Como antecedente, esta técnica se basa en un tipo de inmunidad adaptativa mediada por ARN en bacterias para prevenir infecciones de material genético invasor. Actualmente, el CRISPR/Cas9 (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas) se ha adaptado como una revolucionaria herramienta biotecnológica que ofrece posibilidades notables para la edición genética en cualquier otro organismo [18,19].

La región CRISPR está constituida por dos elementos: segmentos repetidos, de entre 20-50 pares de bases y espaciadores de igual longitud, lo cuales son únicos y representan los segmentos adquiridos de DNA extraño. El CRISPR/Cas9 actúa de manera general a través de tres etapas conocidas. Primero, sucede el estadio de adquisición, donde la célula identifica, procesa e incorpora el DNA foráneo, como un nuevo espaciador en el locus CRISPR. Después, se produce la transcripción del locus CRISPR, donde se

obtendrá un pre-crRNA que, una vez sea procesado y sea maduro, dará lugar al crRNA, el cual actuará como RNA guía (gRNA) y conducirá a la nucleasa Cas9 a la secuencia diana, que es complementaria del RNA guía. Es imprescindible la presencia de un protoespaciador (PAM) junto a la secuencia diana para que la secuencia pueda ser reconocida. En este sitio, la nucleasa Cas9 catalizará una doble rotura de cadena, que estimulará los mecanismos de reparación del ADN celular. La reparación podrá ser llevada a cabo por recombinación homóloga (HR) o por recombinación no homóloga (NHEJ) [20].

Aunque en HR se puede introducir la modificación de secuencia deseada debido a que se presenta una plantilla de DNA, en NHEJ, pueden ocurrir inserciones o eliminaciones cuando la célula intenta reparar la doble rotura de cadena. Esta religación puede causar mutaciones de desplazamiento del marco de lectura que cause la no expresión de la proteína funcional [21].

En este trabajo, este último mecanismo de reparación se utilizará para inducir el error en el gen PTPN6, gen que codifica SHP-1, dirigiendo los RNA guías a una región exónica para que se exprese la mutación. El silenciamiento de SHP-1 se llevará a cabo en diferentes líneas celulares del cáncer de próstata las cuales representan estadios diferentes de la enfermedad, con el objetivo de conocer mejor la función llevada a cabo por esta fosfatasa en la supervivencia y proliferación de las células cancerosas.

Hipótesis

En la actualidad uno de los principales problemas para el tratamiento del cáncer de próstata es la resistencia a los tratamientos hormonales que ofrece el tumor en la gran mayoría de los pacientes que reciben este tratamiento, y su progresión a fases más agresivas y metastásicas. Hoy en día se siguen estudiando los mecanismos moleculares por los que el tumor ofrece resistencia a la deprivación androgénica, de los que uno de los principales es la activación del AR de manera independiente de su ligando natural, a través de diferentes vías de señalización. Diversos estudios muestran la participación de la proteína fosfatasa SHP-1 en vías de señalización relacionadas con crecimiento, proliferación y migración celular, a través de su interacción principalmente con PI3K, STAT o las MAPKs. Además, se ha observado una variación en la expresión de SHP-1 en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata que representan estadios diferentes de la enfermedad, siendo la expresión menor en estadios más avanzados. Por ello, la hipótesis de este trabajo es que la fosfatasa SHP-1 podría estar regulando la fosforilación y, por tanto, la actividad del AR tanto de un modo directo como a través de la regulación de vías de señalización que regulan su actividad. Por último, los datos aportados en este estudio puedan ayudar a conocer mejor la función de esta proteína en este cáncer, así como su uso como diana terapéutica para de este modo mejorar los tratamientos actuales.

Objetivos

En este trabajo nos hemos propuesto como objetivo principal conocer mejor el papel de la tirosina fosfatasa SHP-1 en el cáncer de próstata resistente a la castración con el fin de encontrar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas de esta enfermedad. Para ello los objetivos específicos son: 1) Silenciar la expresión de SHP-1 mediante CRISPR/Cas9 en células tumorales sensibles y resistentes al tratamiento hormonal. 2) Determinar el papel de SHP-1 en la fosforilación y actividad del AR tanto de un modo directo como a través de las vías de señalización que regulan su actividad en ausencia de andrógenos. 3) Determinar el papel de SHP-1 sobre la proliferación, supervivencia y ciclo celular de células tumorales sensibles y resistentes al tratamiento hormonal.

Metodología

Muestras

Para llevar a cabo este estudio utilizaremos dos líneas celulares de cáncer de próstata que representan estadios diferentes de la enfermedad y expresan SHP-1:

Células LNCaP: estas células proceden de una metástasis en ganglio linfático de un adenocarcinoma prostático. Expresan el receptor de andrógenos y son sensibles al tratamiento hormonal, por lo que representan los primeros estadios del cáncer de próstata.

Células VCaP: estas células proceden de un paciente con una metástasis en hueso. Expresan el receptor de andrógenos, pero no son sensibles al tratamiento hormonal, de ahí que representen estadios más avanzados de la enfermedad.

Objetivo 1. Silenciamiento de SHP-1 mediante el sistema CRISPR/Cas9 en los dos modelos celulares.

Como se comentó al principio del trabajo, nuestro grupo de laboratorio ya encontró en el pasado la expresión de esta fosfatasa en diferentes líneas celulares del cáncer de próstata y diferencias en cuanto a su expresión, por lo que primero de todo llevaremos un análisis de la expresión de la fosfatasa en las

líneas celulares utilizadas en este trabajo, LNCaP y VCaP, las cuales como se comentó en el apartado de “Muestras”, representan estadios diferentes del cáncer y ambas expresan la fosfatasa. Esto se llevará a cabo mediante la técnica Western-blot con la utilización de un anticuerpo primario anti-SHP-1. Todo esto se realizará con el fin de observar si hay diferencias de expresión asociadas a las distintas fases del CP que nos ayudará a interpretar mejor los resultados de los experimentos posteriores

Una vez visto si hay diferencias en la expresión de SHP-1 entre ambas líneas celulares analizaremos su efecto sobre la actividad del AR. Para ello, llevaremos a cabo la anulación de la expresión de la fosfatasa mediante la técnica CRISPR/Cas9. Una de las ventajas de esta técnica en comparación con otras como el uso de RNA de interferencia (siRNA), es que obtenemos una mayor reproducibilidad al tener siempre el mismo grado de silenciamiento, a diferencia de los siRNAs, que pueden variar entre experimentos. Además, al ser un silenciamiento estable, nos permite realizar ensayos a más largo plazo.

Primero llevaremos a cabo la expresión de la proteína Cas9 de manera estable en nuestras células mediante partículas lentivirales. Una vez hayamos conseguido esto, podremos silenciar cualquier proteína generando RNAs guías (gRNAs) específicos, en concreto el objetivo de este proyecto es silenciar SHP-1. Para la expresión de la Cas9, se llevará a cabo la producción de estos lentivirus por transfección con fosfato de calcio en las células 293T. Esta línea celular procede de células de riñón de embrión humano y son ampliamente utilizadas como hospedadoras para expresión génica debido a su sencillo cultivo y su gran eficiencia en las transfecciones, cercanas al 100%. El método de transfección utilizado está basado en la formación de un precipitado, entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos; estos formarán unos agregados que serán endocitados por las células. Para la producción de estos lentivirus se utilizarán los siguientes plásmidos de Addgene:

pCMV-VSV-G: plásmido de 6363 pares de bases (pb) que contiene las proteínas necesarias para producir la envoltura de las partículas lentivirales.

psPAX2: plásmido de segunda generación de 10703 pb que ayuda al empaquetamiento de las partículas lentivirales.

LentiCas9-Blast: plásmido de 12860 pb el cual contiene la proteína Cas9 y ofrece resistencia a la blasticidina. Este plásmido contiene, además, la secuencia que codifica para el epítipo Flag fusionado con la proteína Cas9.

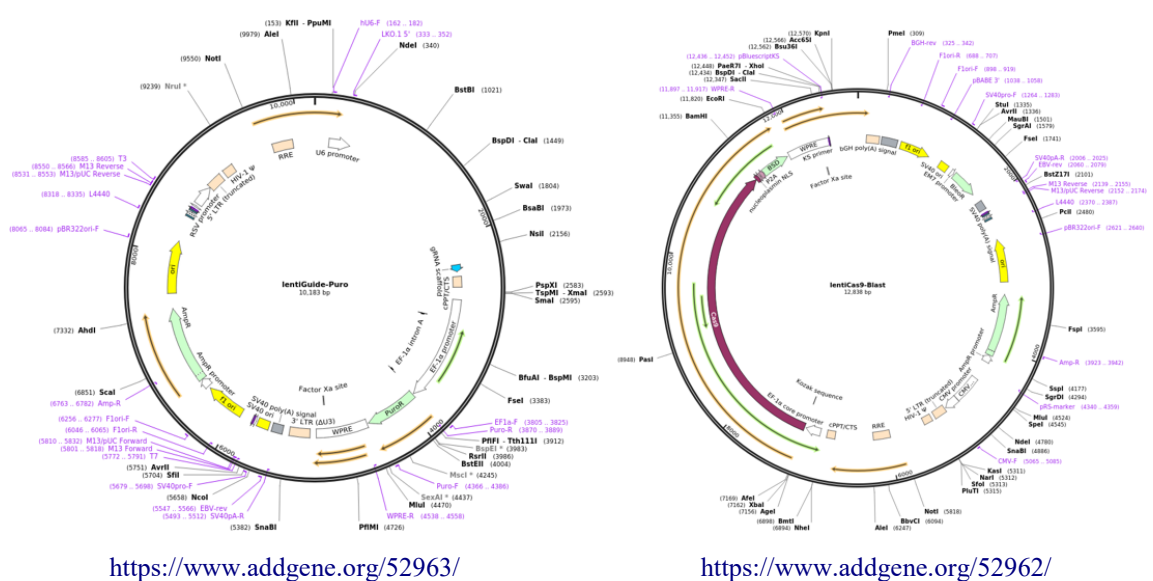


Figura 1. A la izquierda el vector LentiGuide-Puro. Tiene una longitud de 10183 pares de bases, expresa el promotor humano U6, un casete con un ARN quimérico Crispr de *S. pyogenes* con sgRNA personalizable y ofrece resistencia a la puromicina. A la derecha el vector LentiCas9-Blast. Tiene una longitud de 12860 pares de bases expresa la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* optimizada con codón humano y ofrece resistencia a la blasticidina.

Con la transfección de estos tres plásmidos se conseguirá formar las partículas lentivirales que contienen el gen que codifica para la proteína Cas9 dentro de las células 293T. Las partículas lentivirales generadas saldrán fuera de la célula al medio pasado un tiempo. Una vez conseguido este paso sembraremos las células LNCaP y VCaP a las que posteriormente les añadiremos el medio con los lentivirus para llevar a cabo la transfección de la Cas9 en estas dos líneas celulares. Las células las seleccionaremos con blasticidina para quedarnos con aquellas que a partir de ahora expresarán la proteína Cas9 de manera estable.

Para comprobar que nuestras células expresan la proteína Cas9 realizaremos un western-blot, con un anticuerpo que reconoce el epítipo Flag que, como hemos comentado anteriormente, está fusionado con la proteína Cas9.

Una vez tenemos células que expresen la proteína Cas9 de manera estable, como se ha comentado anteriormente, podremos realizar silenciamientos de cualquier proteína de manera indefinida a través de la transfección con un vector que contenga los RNAs guías específicos para el gen que queremos silenciar. En este caso, vamos a dirigirlo hacia diferentes exones del gen PTPN6 que codifica para SHP-1. El vector que utilizaremos será el LentiGuide-Puro, un vector de 10183 pb, el cual contiene el gen de resistencia a la puomicina, incluye el promotor humano U6 y expresa un ARN quimérico CRISPR de *S. pyogenes* que permite el clonaje de gRNAs personalizados, donde incluiremos los diseñados por nuestro laboratorio.

	Oligo sense 5'--> 3'	Oligo anti-sense 3'--> 5'
Oligo 1 (exón 3)	CACCGTATTCGGATCCAGAACTCAG	AAACCTGAGTTCTGGATCCGAATAC
Oligo 2 (exón 5)	CACCGAGGCGCCTTTGTCTACCTG	AAACAGGTAGACAAAGGCGCCTC
Oligo 3 (exón 6)	CACCGTATGCCACGAGGGTGAATG	AAACCATCACCTCGTGGCATAAC

Figura 2. Secuencia de los oligonucleótidos que sirven como RNAs guías para la realización del CRISPR/Cas9 del gen PTPN6. Se muestran tanto los oligos sense como los anti-sense dirigidos hacia 3 exones diferentes del gen PTPN6.

El diseño de los RNAs guías se realizó con el programa CRISPOR, el cual nos ayuda a diseñar oligonucleótidos de 19-20 nucleótidos específicos para el gen de interés (figura 2). A cada uno de los oligonucleótidos añadiremos una secuencia corta de 4 nucleótidos para facilitar su clonaje en el vector LentiGuide-Puro tras la digestión con la enzima de restricción BbsI (figura 3). Las secuencias de los oligonucleótidos tienen que ir dirigidas a diferentes exones de gen PTPN6, evitando que no se repita en el resto del genoma para evitar los posibles off-targets. Por último, la secuencia diana tiene que estar seguida por la secuencia PAM (NGG, donde N es cualquier nucleótido) para que sea reconocida por la Cas9.

La transfección de los RNAs guías específicos para el silenciamiento de SHP-1 se realizará con el mismo procedimiento comentado anteriormente para la expresión de Cas9 en nuestras células, con la salvedad de que en vez de utilizar el plásmido LentiCas9-Blast utilizaremos el plásmido LentiGuide-Puro con los diferentes RNAs guías diseñados contra diferentes exones de PTPN6.

Primero llevaremos a cabo la digestión del vector LentiGuide-Puro para poder clonar los gRNAs en él. Para ello, el plásmido será digerido con la enzima de restricción BbsI, junto con una fosfatasa alcalina, que se utilizará para desfosforilar el sitio digerido y prevenir la religación (figura 3).

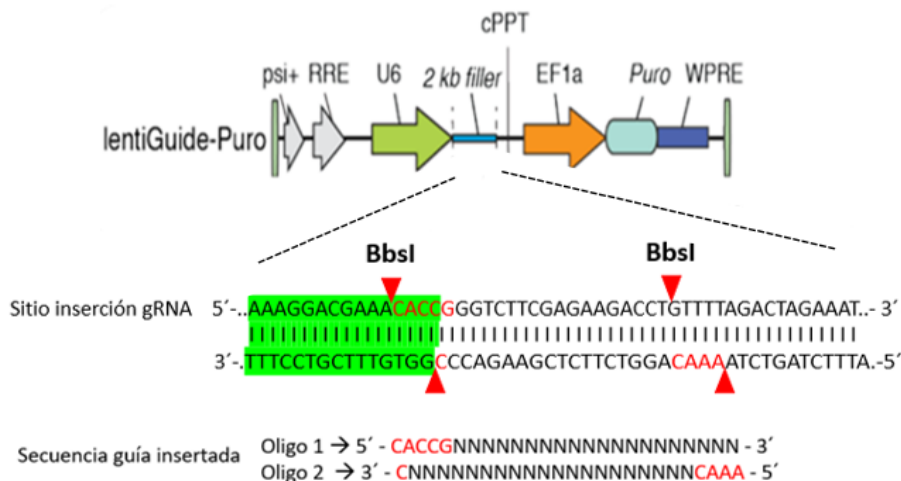


Figura 3. Vector LentiGuide-Puro y RNA guía. El vector contiene el promotor humano U6 y expresa un cassette para el RNA guía quimérico, el cual tiene una secuencia superpuesta que incluye el sitio de restricción para la enzima BbsI donde los oligonucleótidos diseñados pueden ser clonados. La parte de debajo de la figura muestra el sitio exacto de corte de la enzima BbsI, y los nucleótidos en rojo muestran la secuencia que hay que añadir a nuestros RNAs guías para el buen clonaje en el vector debido al sitio de corte por esta enzima.

Para comprobar que la digestión del vector se ha realizado correctamente, los productos de la digestión se separarán en un gel de agarosa, una técnica usada para separar ácidos nucleicos en función de su tamaño. Las moléculas más pequeñas serán retenidas con menor fuerza por la agarosa y avanzarán más en el gel. Como control se utilizará un plásmido sin digerir. A continuación, purificaremos el fragmento de DNA correspondiente al vector digerido, que será utilizado para la reacción de ligación con los RNAs guías.

Cuando tengamos nuestro plásmido digerido se llevará a cabo el anillamiento de los oligonucleótidos diseñados y su ligación en el vector. El anillamiento se llevará a cabo poniendo la misma cantidad de los oligos sense y anti-sense, junto con la ligasa T4. Cuando estén anillados correctamente los ligaremos a nuestro vector LentiGuide-Puro, cuya reacción contendrá nuestro plásmido digerido junto con los oligos dúplex diluidos 1:200 y la ligasa T4. Como control se intercambiarán los oligos por agua. El producto de la ligación se utilizará para la transformación de bacterias Stbl3, una cepa bacteriana usada habitualmente para reducir la frecuencia de recombinación homóloga de secuencias largas terminales repetidas (LTRs) que se encuentran en nuestro vector lentiviral. Esta cepa tiene una mutación en el gen de la recombinasa, enzima encargada de la recombinación del DNA. Al no tener esta enzima se podrá evitar que se eliminen los fragmentos repetidos por recombinación. Para seleccionar las células se crecerán en medio LB con ampicilina. Por último, se aislará el plásmido mediante un kit comercial.

Para comprobar que los gRNAs se han insertado de manera correcta, llevaremos a cabo una secuenciación por el método Sanger [22], donde el DNA será amplificado usando los primers específicos de nuestro vector (Hu6-F y EF1a-R) y los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) junto con dideoxinucleótidos trifosfato marcados con fluorescencia que nos facilitará determinar la secuencia del plásmido.

Por último, una vez hemos comprobado que los RNA guías se han clonado correctamente se procederá a la transfección del plásmido en nuestras células LNCaP y VCaP que expresan de modo estable la Cas9 realizando el mismo procedimiento mencionado anteriormente y seleccionaremos las células con puromicina ya que el LentiGuide-Puro contiene el gen de resistencia a este antibiótico. En este proceso llevaremos a cabo la selección de varios clones. Determinaremos la eficiencia del silenciamiento por western-blot (utilizando el anticuerpo anti-SHP-1) en cada uno de los clones y seleccionaremos aquel en el que el silenciamiento ha sido más efectivo para proseguir con los demás experimentos.

Objetivo 2. Determinar el papel de SHP-1 en la fosforilación y actividad del AR

Una vez generado el modelo de trabajo, determinaremos el papel de esta fosfatasa en la actividad de AR y en las distintas vías de señalización que regulan su fosforilación. Primero de todo veremos si en LNCaP y VCaP el AR interacciona de forma directa con SHP-1, para, a continuación, ver cómo afecta SHP-1 a la fosforilación de AR de manera directa. Para ello, se llevará a cabo una co-inmunoprecipitación. En estos ensayos se incubarán las células LNCaP y VCaP que expresen SHP-1 con un anticuerpo anti-SHP-1 para unir la proteína y gracias a la proteína G-Sepharosa precipitar los complejos formados por el anticuerpo contra SHP-1 y la propia proteína SHP-1 junto con las proteínas con las que interaccione. Una vez realizado esto podremos ver si SHP-1 interacciona de forma directa con AR en nuestras dos líneas celulares mediante un western-blot donde utilizaremos un anticuerpo anti-AR que nos confirme la existencia de esta interacción.

Una vez analizada esta posible interacción veremos el estado de fosforilación del AR en presencia y ausencia de SHP-1. Para ello, se llevará a cabo una inmunoprecipitación gracias a la incubación de nuestras células con un anticuerpo anti-AR para unir la proteína y precipitarla. Una vez tengamos el AR de forma aislada se llevará a cabo un western-blot para observar su grado de fosforilación en tirosinas mediante un anticuerpo anti-Tyr fosforiladas. Esta técnica se realizará tanto en células que expresen SHP-1 de forma normal como en células en las que se encuentre silenciado para poder analizar y comparar el papel que juega SHP-1 en el nivel de fosforilación del receptor tanto en LNCaP como en VCaP.

En el caso de que SHP-1 no interaccione con el AR, pero su ausencia modifique la fosforilación de AR, de modo paralelo analizaremos cómo afecta la pérdida de expresión de SHP-1 a las distintas rutas de señalización que en última instancia fosforilarán al receptor. Hoy en día se conocen varias vías implicadas, donde las más conocidas son PI3K/AKT, MAPKs o la vía de los receptores de factores de crecimiento donde participa la proteína quinasa Src. Para determinar la función de SHP-1 en estas vías nos centraremos en las principales proteínas de cada vía tanto aguas arriba como abajo de la vía. Un estudio de 2011 demostró que la sobreexpresión de una SHP-1 catalíticamente defectuosa en el sistema de grelina/GHSR1a aumentaba la fosforilación en tirosina de la subunidad reguladora PI3K p85, lo que llevaba a un aumento en la fosforilación de cSrc y la proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos, lo que finalmente provocaba la activación de Akt [23]. Para ver si SHP-1 regula esta vía en nuestro sistema de estudio y si conlleva un efecto en la fosforilación del AR, determinaremos la fosforilación de las proteínas AKT y Src mediante Western Blot con anticuerpos anti-pAKT y anti-Ser416 de Src (principal residuo de su activación) en nuestro sistema de estudio. A modo de comprobación de que este efecto en

las vías conlleva un cambio en la fosforilación de AR de manera indirecta miraremos también la fosforilación de distintos residuos de Ser/Thr del receptor por Western Blot.

Una vez comprobemos que SHP-1 regula la fosforilación del receptor veremos si estos cambios conllevan cambios en su actividad. Para ello, determinaremos la expresión de distintos genes regulados por AR, como por ejemplo los genes PSA y FKBP5. Los niveles de expresión de PSA y FKBP5 se determinarán cuantificando su RNA mensajero (RNAm) a través de una RT-PCR cuantitativa comparando las células con y sin SHP-1. En primer lugar, se obtendrá todo el RNA celular con el método del Trizol (Invitrogen) y gracias a una enzima retrotranscriptasa, utilizando un kit comercial, obtendremos el cDNA. A continuación, se realizará una PCR con oligonucleótidos que amplifiquen el cDNA de los genes que queremos determinar (PSA y FKBP5). Con esta técnica podremos comparar posibles variaciones en los RNAm de los genes regulados por AR en células con expresión de SHP-1 y en las que se ha silenciado para ver cuál es el efecto de la fosfatasa en la actividad del receptor.

Objetivo 3. Determinar el papel de SHP-1 en la supervivencia, proliferación y ciclo celular de las células LNCaP y VCaP

Como se comentaba en la introducción, hay estudios que indican que SHP-1 puede regular la proliferación y el ciclo celular en algunas células del cáncer de próstata, lo que nos lleva a plantearnos si este efecto también se produce en nuestro sistema de estudio. Para ello, una vez hayamos realizado el silenciamiento con CRISPR/Cas9 de esta fosfatasa determinaremos el papel que juega en la supervivencia y proliferación de las líneas celulares utilizadas en este estudio. Los siguientes ensayos se realizarán en células LNCaP y VCaP con y sin SHP-1 para poder determinar el efecto de esta fosfatasa en células sensibles y resistentes a los tratamientos hormonales. Primero llevaremos a cabo un ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol), el cual nos ayuda a determinar la viabilidad celular. El MTT es una sal transformada por las oxido-reductasas mitocondriales en un compuesto denominado formazán que absorbe a 595 nm, por lo que la viabilidad celular es proporcional a la absorbancia a esta longitud de onda.

A continuación, realizaremos ensayos de citometría de flujo para determinar el efecto de la pérdida de expresión de SHP-1 sobre el ciclo celular y la apoptosis celular. Para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo las células se tratarán con RNAsa y se les adicionará un detergente que permita crear poros en sus membranas celulares para permitir la entrada del yoduro de propidio (un agente intercalante del DNA que emite fluorescencia roja al unirse a estas moléculas) que añadiremos después de este paso. Con esta técnica podremos cuantificar el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular, prestando especial atención a la fase SubGo, indicadora de una parada del ciclo celular y una apoptosis tardía.

También determinaremos la apoptosis temprana mediante el ensayo de TMRM. Para ello, se realizará el mismo procedimiento descrito anteriormente, con la diferencia de que en vez de yoduro de propidio se añadirá la sonda TMRM, que nos permitirá analizar el potencial de membrana mitocondrial. Una bajada del potencial de membrana mitocondrial es un indicador de apoptosis temprana de la célula.

Con todos estos ensayos de viabilidad, análisis del ciclo y apoptosis celular se espera encontrar diferencias entre las células que expresan SHP-1 y las células que lo tienen silenciado, lo que nos permitirá definir el papel de SHP-1 en la regulación de la supervivencia y proliferación celular del cáncer de próstata. Dado que trabajaremos con dos líneas celulares que responden de diferente manera al tratamiento hormonal podremos asociar mejor el papel de SHP-1 sobre las distintas fases del CP. Al ser LNCaP dependiente de andrógenos la activación del AR se producirá por la vía canónica (el receptor se activa a través de su unión a andrógenos) y por tanto su inactivación a través de SHP-1 cabría esperar que se realice de manera directa. Sin embargo, VCaP al ser independiente de andrógenos, la activación del AR se realizará a través de fosforilaciones llevadas a cabo por las vías de señalización ya comentadas, lo que llevaría a pensar que la inactivación del AR por SHP-1 en esta situación se realice de manera indirecta a inactivar estas vías. Por tanto, los datos derivados de este proyecto ayudarán a obtener información sobre el papel de SHP-1 en la regulación de la actividad del AR y su efecto sobre la supervivencia y proliferación celular en células dependientes (LNCaP) e independientes de andrógenos (VCaP).

Perspectivas futuras

Hoy en día, numerosos fármacos y dianas son estudiados contra multitud de enfermedades. Pero la cruda realidad es que un número muy ínfimo llega a comercializarse. Actualmente uno de los tratamientos más comunes para el cáncer de próstata es la ablación androgénica. Aunque la mayoría de los tumores, en un primer momento, responden al tratamiento y se consigue la regresión del tumor, con el tiempo gran parte de estos pacientes recaen con la aparición en muchos casos de metástasis a distancia, pasando por tanto a ser tumores muy agresivos cuyo crecimiento se hace independiente de andrógenos. Por ello, la búsqueda de nuevas terapias encaminadas a solventar este problema es un tema de salud prioritario.

Centrándonos en el cáncer de próstata, actualmente no hay tratamientos efectivos en las fases más agresivas de este, debido, entre otras cosas, a la complejidad que supone el estudio de los mecanismos moleculares que implican el avance del cáncer hacia estas fases. Este estudio intentará demostrar que la fosfatasa SHP-1 juega un papel fundamental en estas fases del cáncer independientes de andrógenos, a través de la regulación de la actividad del AR. Actualmente se está analizando la eficacia de nuevos fármacos como el Sorafenib, un inhibidor multiquinasa, que ya ha ofrecido buenos resultados en otros tipos de cáncer como el hepático o renal [24], y que para el cáncer de próstata se encuentra en estudio clínico en fase II [25,26]. Además, sería muy interesante determinar la eficacia que se puede obtener al combinarlo con las terapias dirigidas contra el AR en las células utilizadas en este estudio.

Finalmente, con este trabajo se espera, además de todo lo expuesto anteriormente, conseguir expresar de manera estable la proteína Cas9 en diferentes células de cáncer de próstata, para después poder redirigir la técnica CRISPR/Cas9 no solo a la fosfatasa SHP-1 sino a multitud de proteínas relacionadas con la progresión del cáncer de próstata con el simple hecho de diseñar los RNAs guías para las proteínas deseadas. Todo dirigido a conocer con detalle los mecanismos moleculares por los cuales el cáncer desarrolla esta resistencia y así poder diseñar nuevos tratamientos que mejoren la vida de los pacientes.

Bibliografía

1. Siegel, R., Miller, K. and Jemal, A., 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 69(1):7-34.
2. Ferlay, J., Parkin, D. and Steliarova-Foucher, E., 2010. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*. 46(4):765-781.
3. Kohli, M. and Tindall, D., 2010. New Developments in the Medical Management of Prostate Cancer. *Mayo Clinic Proceedings*. 85(1):77-86.
4. Dehm, S. and Tindall, D., 2007. Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Molecular Endocrinology*. 21(12):2855-2863.
5. Matsumoto, T., Sakari, M., Okada, M., Yokoyama, A., Takahashi, S., Kouzmenko, A. and Kato, S., 2013. The Androgen Receptor in Health and Disease. *Annual Review of Physiology*. 75(1):201-224.
6. Massie, C., Lynch, A., Ramos-Montoya, A., Boren, J., Stark, R., Fazli, L., Warren, A., Scott, H., Madhu, B., Sharma, N., Bon, H., Zecchini, V., Smith, D., DeNicola, G., Mathews, N., Osborne, M., Hadfield, J., MacArthur, S., Adryan, B., Lyons, S., Brindle, K., Griffiths, J., Gleave, M., Rennie, P., Neal, D. and Mills, I., 2011. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *The EMBO Journal*. 30(13):2719-2733.
7. Huang, Y., Jiang, X., Liang, X. and Jiang, G., 2018. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer (Review). *Oncology Letters*. 15(5):6063-6076.
8. Kharaziha, P., Rodriguez, P., Li, Q., Rundqvist, H., Björklund, A., Augsten, M., Ullén, A., Egevad, L., Wiklund, P., Nilsson, S., Kroemer, G., Grander, D. and Panaretakis, T., 2012. Targeting of distinct signaling cascades and cancer-associated fibroblasts define the efficacy of Sorafenib against prostate cancer cells. *Cell Death & Disease*. 3(1):262-262.
9. Ferraldeschi, R., Nava Rodrigues, D., Riisnaes, R., Miranda, S., Figueiredo, I., Rescigno, P., Ravi, P., Pezaro, C., Omlin, A., Lorente, D., Zafeiriou, Z., Mateo, J., Altavilla, A., Sideris, S., Bianchini, D., Grist, E., Thway, K., Perez Lopez, R., Tunariu, N., Parker, C., Dearnaley, D., Reid, A., Attard, G. and de Bono, J., 2015. PTEN Protein Loss and Clinical Outcome from Castration-resistant Prostate Cancer Treated with Abiraterone Acetate. *European Urology*. 67(4):795-802.
10. Zhu, M. and Kyprianou, N., 2008. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocrine Related Cancer*. 15(4):841-849.
11. Rocha, J., Zouanat, F., Zoubeidi, A., Hamel, L., Benidir, T., Scarlata, E., Brimo, F., Aprikian, A. and Chevalier, S., 2013. The Fer tyrosine kinase acts as a downstream interleukin-6 effector of androgen receptor activation in prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 381(1-2):140-149.
12. Guo, Z., Dai, B., Jiang, T., Xu, K., Xie, Y., Kim, O., Nesheiwat, I., Kong, X., Melamed, J., Handratta, V., Njar, V., Brodie, A., Yu, L., Veenstra, T., Chen, H. and Qiu, Y., 2006. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell*. 10(4):309-319.
13. Tonks, N., 2013. Protein tyrosine phosphatases - from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS Journal*. 280(2):346-378.
14. Valencia, A., Oliva, J., Bodega, G., Chiloeches, A., López-Ruiz, P., Prieto, J., Susini, C. and Colás, B., 1997. Identification of a protein-tyrosine phosphatase (SHP1) different from that associated with acid phosphatase in rat prostate. *FEBS Letters*. 406(1-2):42-48.

15. Zapata, P., Ropero, R., Valencia, A., Buscail, L., López, J., Martín-Orozco, R., Prieto, J., Angulo, J., Susini, C., López-Ruiz, P. and Colás, B., 2002. Autocrine Regulation of Human Prostate Carcinoma Cell Proliferation by Somatostatin through the Modulation of the SH2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase (SHP)-1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87(2):915-926.
16. Rodríguez-Ubrea, F., Cariaga-Martínez, A., Cortés, M., Romero-De Pablos, M., Ropero, S., López-Ruiz, P. and Colás, B., 2010. Knockdown of protein tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits G1/S progression in prostate cancer cells through the regulation of components of the cell-cycle machinery. *Oncogene*. 29(3):345-355.
17. Fan, L., Shiau, C., Tai, W., Hung, M., Chu, P., Hsieh, F., Lin, H., Yu, H. and Chen, K., 2015. SHP-1 is a negative regulator of epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 34(41):5252-5263.
18. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. and Horvath, P., 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(5819), pp.1709-1712.
- Chen, T., Wang, L.H. and Farrar, W.L., 2000. Interleukin 6 activates androgen receptor mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 60(8):2132 -2135.
19. Wei, C., Wang, F., Liu, W., Zhao, W., Yang, Y., Li, K., Xiao, L. and Shen, J., 2017. CRISPR/Cas9 targeting of the androgen receptor suppresses the growth of LNCaP human prostate cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. 17(2):2901-2906.
20. Deveau, H., Garneau, J. and Moineau, S., 2010. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. *Annual Review of Microbiology*. 64(1):475-493.
21. Rojo, F.P., Nyman, R., Johnson, A., Navarro, M., Ryan, M., Erskine, W. and Kaur, P., 2018. CRISPR-Cas systems: ushering in the new genome editing era. *Bioengineered*. 9(1):214-221.
22. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(12):5463-5467.
23. Lodeiro, M., Alén, B., Mosteiro, C., Beiroa, D., Nogueiras, R., Theodoropoulou, M., Pardo, M., Gallego, R., Pazos, Y., Casanueva, F. and Camiña, J., 2011. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates Akt signaling in the ghrelin/GHSR1a system. *Molecular Biology of the Cell*. 22(21):4182-4191.
24. Zhu, Y., Zheng, B., Wang, H. and Chen, L., 2017. New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*. 38(5):614-622.
25. Aragon-Ching, J., Jain, L., Gulley, J., Arlen, P., Wright, J., Steinberg, S., Draper, D., Venitz, J., Jones, E., Chen, C., Figg, W. and Dahut, W., 2009. Final analysis of a phase II trial using sorafenib for metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU International*. 103(12):1636-1640.
26. Dahut, W., Scripture, C., Posadas, E., Jain, L., Gulley, J., Arlen, P., Wright, J., Yu, Y., Cao, L., Steinberg, S., Aragon-Ching, J., Venitz, J., Jones, E., Chen, C. and Figg, W., 2008. A Phase II Clinical Trial of Sorafenib in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 14(1):209-214.