



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Evaluación de LSM4 como potencial diana terapéutica en el cáncer de próstata

Alumno: María Pascual Franco

Tutor: Leonor Puchades Carrasco

Curso 2022-2023



IIS La Fe



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

AGADECIMIENTOS

Agradecer a la Universidad Católica de Valencia, por darme la oportunidad de estudiar esta carrera tan bonita y la que tanto he disfrutado. A todos los profesores, por la relación tan cercana y las lecciones, todo lo aprendido lo llevaré siempre en mi vida y en mi camino.

A la Dra. Leonor Puchades Carrasco, por acogerme en su laboratorio y enseñarme lo que significa formar parte de un proyecto y grupo de investigación. A la Dra. Nuria Gómez Cebrián, por enseñarme y ser un ejemplo de vocación y dedicación por la ciencia. A mis compañeros de prácticas: Dani, Manu, Inés y Kato, de los que tanto he aprendido y siempre les estaré agradecida.

A todos mis compañeros de la Universidad, pero sobre todo a Adri, Ángela, Curro, Óscar y Raúl, por aprender y crecer juntos durante estos bonitos cuatro años. Gracias a cada uno por todos los buenos momentos llenos de alegría e ilusión, pero también, por cada uno de los momentos más duros, siempre estaréis presentes en mi vida, no he podido tener más suerte.

A Marta, por confiar siempre en mí y llenar mi vida de fe y buenos momentos. A Pau y Núria, por su cariño y apoyo durante estos meses, con una convivencia llena de risas, llegando a convertirse en parte de mi familia. A mis amigos de toda la vida, por estar siempre y quererme, aunque estos cuatro años hayamos estado más alejados.

A mis padres, por apoyarme siempre, por sus consejos llenos de cariño. Gracias por hacer posible que haga lo que me guste, por no cerrarme puertas y sobre todo por ser un claro ejemplo de esfuerzo y de amor incondicional. A mi hermana Rut, por escucharme siempre e interesarse por lo que hago. Aunque yo sea la mayor, eres un gran ejemplo para mí y estoy muy orgullosa de ser tu hermana. Vos estime.

A mis abuelos, que siempre están y hacen por entender el mundo de la ciencia. Gracias por todo, os quiero.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Cáncer de próstata (CaP).....	2
1.1.1	Diagnóstico.....	2
1.1.2	Estratificación.....	3
1.1.3	Tratamiento.....	4
1.2	Estrategias para la identificación de dianas terapéuticas.....	6
1.2.1	Vulnerabilidades genéticas.....	6
1.2.2	Dianas terapéuticas.....	7
2	OBJETIVOS.....	11
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1	Líneas celulares de CaP.....	13
3.1.1	Cultivos celulares.....	13
3.2	PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	14
3.3	Análisis Western blot.....	15
3.4	Generación de modelos de silenciamiento mediante ARNsh.....	17
3.4.1	Plásmidos ARNsh.....	17
3.4.2	Producción de lentivirus.....	19
3.4.3	Infección celular.....	19
3.5	Ensayo de proliferación.....	20
3.6	Ensayo de formación de colonias.....	20
3.7	Análisis estadístico.....	21
3.8	Bases de datos.....	21
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1	Relevancia biológica de LSM4.....	23
4.1.1	Funciones biológicas.....	23
4.1.2	LSM4 en los cuerpos P.....	25
4.1.3	LSM4 en cáncer.....	28
4.2	<i>Druggability</i> LSM4 y PRMT5.....	29
4.3	Sobreexpresión de LSM4 en pacientes con CaP.....	32
4.4	Expresión de LSM4 en distintos modelos celulares de CaP.....	33
4.5	Modelo de silenciamiento de <i>LSM4</i>	35
4.6	Capacidad proliferativa de modelos de silenciamiento.....	37
4.6.1	Ensayo de formación de colonias.....	37
4.6.2	Ensayo de proliferación celular.....	38
5	CONCLUSIONES.....	41
6	LÍNEAS FUTURAS.....	43
7	BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Características del cáncer.....	1
Figura 2: Localización de la próstata.....	2
Figura 3: Factores clave que contribuyen a una estrategia exitosa de la evaluación de potenciales dianas	8
Figura 4: Vector pLKO.1	18
Figura 5: Proceso de transfección e infección.....	20
Figura 6: Localización subcelular de LSM4.....	23
Figura 7: Localización subcelular y función de los complejos LSM en células eucariotas	24
Figura 8: Secuencia de aminoácidos de la proteína LSM4.....	26
Figura 9: <i>PRMT5</i> está sobreexpresado en CaP	27
Figura 10: Estructura 3D de LSM4.....	30
Figura 11: Localización subcelular de PRMT5.....	31
Figura 12: Estructura 3D de PRMT5.....	31
Figura 13: <i>LSM4</i> está sobreexpresado en CaP y asociado a un peor pronóstico.....	32
Figura 14: Expresión relativa de <i>LSM4</i> a nivel de ARNm en distintas líneas celulares de CaP respecto a la línea control.....	33
Figura 15: Niveles relativos de LSM4 a nivel de proteína en distintos modelos celulares.....	34
Figura 16: Expresión relativa ARNm de <i>LSM4</i> en la línea celular 22rv1 después de haber silenciado mediante ARNsh lentivirales	36
Figura 17: Niveles relativos de LSM4 en la línea celular 22rv1 después del silenciamiento mediante ARNsh mediado por lentivirus.....	37
Figura 18: Ensayo de la capacidad de formación de colonias de la línea celular 22rv1 tras la inhibición de <i>LSM4</i>	38
Figura 19: Ensayo MTS para evaluar la proliferación relativa de LSM4 en el modelo celular de silenciamiento frente al modelo control.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estratificación del riesgo de CaP en base a los grados Gleason, los grados ISUP y a los niveles de PSA (Adaptado de Mottet et al., 2020).	4
Tabla 2: Aproximaciones terapéuticas actuales según la estratificación de la enfermedad. Extraído de: (Sekhoacha et al., 2022).	5
Tabla 3: <i>Master Mix</i> utilizada para la transcripción reversa del ARN	14
Tabla 4: <i>Master Mix</i> utilizada para realizar la qPCR	15
Tabla 5: Secuencias de los <i>primers</i> utilizados para la qPCR.....	15
Tabla 6: Reactivos para 1 ml de <i>buffer</i> de lisis para la extracción de proteínas.	16
Tabla 7: Anticuerpos primarios utilizados en el análisis del Western blot.	17
Tabla 8: Construcciones ARNsh utilizados para el gen <i>LSM4</i>	18
Tabla 9: Características e información relevante de las potenciales dianas terapéuticas LSM4 y PRMT5.	29

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es una de las principales neoplasias malignas que afecta a la salud de millones de hombres, siendo el segundo tipo de cáncer más diagnosticado en todo el mundo. El CaP presenta un mal pronóstico y suele llevar al fracaso terapéutico en etapas avanzadas. En un estudio previo del laboratorio, a través de la identificación de vulnerabilidades genéticas específicas en CaP avanzado, se identificó *LSM4* como potencial diana terapéutica para el desarrollo de nuevos tratamientos. El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de *LSM4* como potencial diana terapéutica en el CaP avanzado.

La evaluación de *LSM4* se realizó en base a información recopilada acerca de sus funciones biológicas y su relevancia en el cáncer. A continuación, se evaluó su expresión en pacientes con CaP respecto a individuos sanos y en estadios agresivos y metastásicos a comparación de no-agresivos y primarios, también se evaluaron los niveles relativos de *LSM4* en distintos modelos celulares de próstata. Finalmente, se probaron distintos vectores de ARNsh para la generación de modelos de silenciamiento de *LSM4* en la línea celular 22rv1.

Los resultados obtenidos mostraron la implicación de *LSM4* en cáncer y su posible participación en el desarrollo del CaP. Además, se observó que *LSM4* estaba sobreexpresado en pacientes con CaP con respecto a individuos sanos y en distintas líneas celulares de CaP el gen tuvo una mayor expresión que en la línea sana. Finalmente, se obtuvo un modelo de silenciamiento de *LSM4* eficiente mediante el vector sh-8, para posteriormente evaluar su efecto en la proliferación celular.

Se concluyó que *LSM4* tiene potencial como diana terapéutica para el desarrollo de fármacos en el CaP avanzado. Además, podría estar relacionado con la proliferación tumoral, lo cual se debe seguir estudiando en futuras investigaciones.

Palabras clave: cáncer de próstata - *LSM4* - diana terapéutica - 22rv1 - desarrollo de fármacos

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is one of the main malignant neoplasms affecting the health of millions of men, being the second most diagnosed cancer worldwide. PCa has a poor prognosis and often leads to therapeutic failure in advanced stages. In a previous study of the laboratory, through the identification of specific genetic vulnerabilities in advanced PCa, *LSM4* was identified as a potential drug target for the development of new treatments. The aim of this work has been the evaluation of *LSM4* as a potential drug target in advanced PCa.

The evaluation of *LSM4* was performed based on information gathered about its biological functions and relevance in cancer. Then, its expression was evaluated in PCa patients with respect to healthy individuals and in aggressive and metastatic stages compared to non-aggressive and primary ones, and the relative levels of *LSM4* in different prostate cell models were also evaluated. Finally, different shRNA vectors were tested for the generation of *LSM4* silencing models in the 22rv1 cell line.

The results obtained showed the involvement of *LSM4* in cancer and its possible participation in the development of PCa. Furthermore, it was observed that *LSM4* was over-expressed in PCa patients with respect to healthy individuals, and in different PCa cell lines the gene had a higher expression than in the healthy line. Finally, an efficient *LSM4* silencing model was obtained using the sh-8 vector, to subsequently evaluate its effect on cell proliferation.

It was concluded that *LSM4* has potential as a drug target for drug development in advanced PCa. In addition, it could be related to tumor proliferation, which should be further studied in future research.

Key words: prostate cancer - *LSM4* - drug target - 22rv1 - drug development

LISTA DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

CaP: Cáncer de próstata

CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración

Cuerpos P: Cuerpos de Procesamiento

DRE: Examen rectal digital

EMT: Transición epitelio-mesénquima

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

ISUP: Sociedad Internacional de Patología Urológica

LSM4: *U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated*

PDB: *Protein Data Bank*

PRMT5: Proteína metiltransferasa 5

PSA: Antígeno prostático específico

RNP: Ribonucleoproteína

SBF: Suero bovino fetal

TBS-T: *Buffer Tris-buffered saline-Tween*

TDA: Terapia de privación de andrógenos

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es una patología heterogénea que agrupa una amplia variedad de enfermedades que difieren en su etiología y en sus manifestaciones clínicas. El cáncer se produce por un proceso de carcinogénesis, en el cual, las células normales se transforman en tumorales. Hanahan y Weinberg propusieron 6 características esenciales que deben ser adquiridas por las células normales a medida que pasan a los estadios de crecimiento neoplásico (Hanahan & Weinberg, 2000). En el 2011 se añadieron 2 características más (Hanahan & Weinberg, 2011) y recientemente, en el 2022, Hanahan ha incorporado 4 nuevas características esenciales: i) desbloqueo de la plasticidad fenotípica, ii) reprogramación epigenética no mutacional, iii) células senescentes y iv) microbiomas polimórficos (Hanahan, 2022), todas las características propuestas se representan en la Figura 1. Por lo tanto, las células cancerígenas tienen distintas propiedades específicas que nos permiten diferenciarlas de las células normales, entre ellas, una elevada capacidad de proliferación, resistencia a la muerte celular o activación de la invasión y metástasis (Hanahan, 2022).

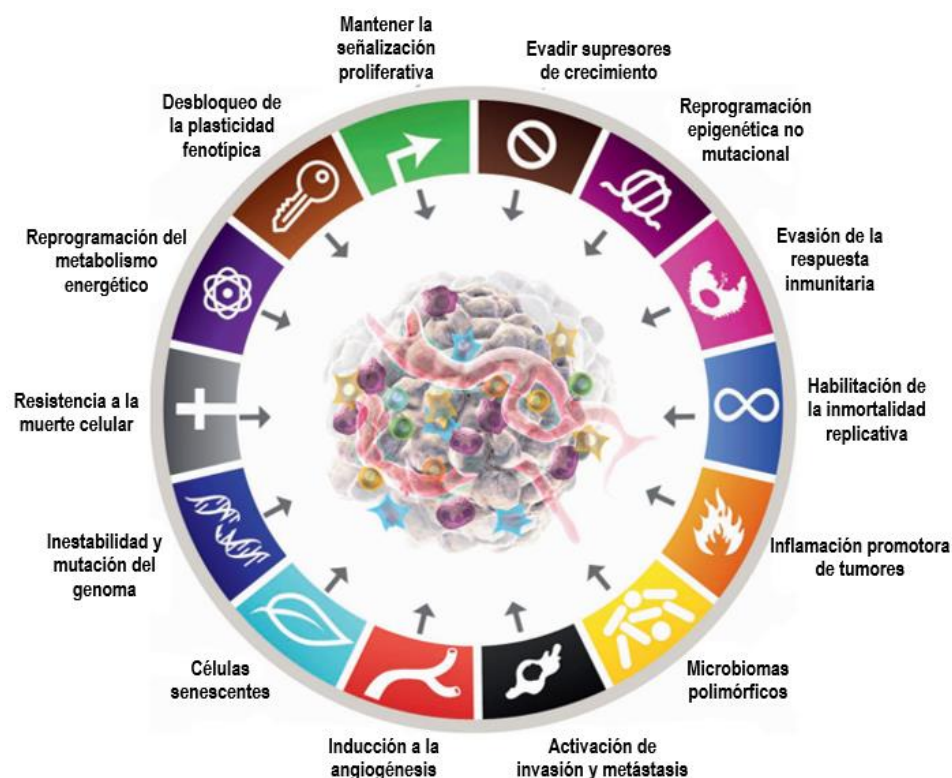


Figura 1: Características del cáncer. Propiedades que deben ser adquiridas por las células normales para su transformación en células tumorales. Extraído de: (Hanahan, 2022).

1.1 Cáncer de próstata (CaP)

Existen numerosos tipos distintos de cáncer que causan serios problemas en la salud de los pacientes (Haffner et al., 2021), entre los cánceres de mayor incidencia se encuentra el cáncer de próstata (CaP), que es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado y con una elevada tasa de mortalidad en hombres (Sekhoacha et al., 2022). El CaP se produce por la transformación de las células normales de la glándula prostática en células cancerígenas. La glándula es un órgano masculino ubicado debajo de la vejiga y que rodea la uretra (Figura 2).

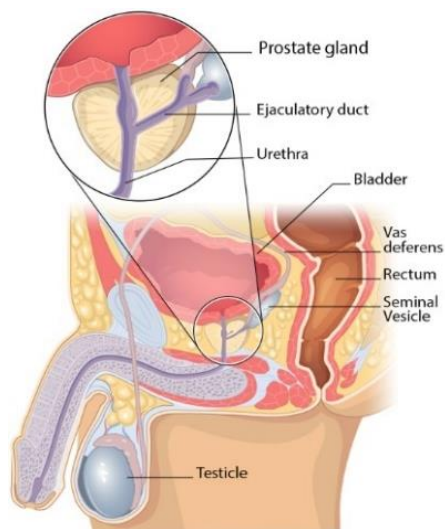


Figura 2: Localización de la próstata. Extraído de: la organización Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

Su pronóstico varía ampliamente entre los pacientes, dependiendo de su edad, antecedentes genéticos, factores ambientales y la etapa en la que se detecta la enfermedad (Rebello et al., 2021). Pacientes con características clínicas similares en el momento del diagnóstico, suelen tener pronósticos bastante heterogéneos, pudiendo haber desde una progresión lenta y localizada del tumor, hasta una progresión rápida y agresiva (Rebello et al., 2021).

1.1.1 Diagnóstico

El diagnóstico precoz del CaP es fundamental para reducir la mortalidad asociada a enfermedad, ya que su detección en etapas maduras suele llevar al fracaso terapéutico, por esta razón, es necesario realizar distintas pruebas para detectar el CaP lo antes posible (Sekhoacha et al., 2022).

Generalmente, el CaP se diagnostica mediante la prueba del antígeno prostático específico (PSA) que consiste en un análisis de sangre del paciente donde se miden los niveles PSA. El PSA es una glicoproteína secretada por las células epiteliales de la glándula prostática que se incrementa en los pacientes con CaP. En esta prueba, el PSA se utiliza como biomarcador, donde niveles de entre 4 y 10 ng/mL sugieren la necesidad de realizar más pruebas y niveles superiores a 10 ng/mL, indican una probabilidad superior al 50% de tener CaP. Sin embargo, esta prueba no es específica del CaP, ya que niveles elevados de PSA no asegura que se tenga la enfermedad, dado que puede estar incrementado a causa de otras enfermedades o problemas prostáticos sin relación con el CaP, lo que resulta en falsos positivos en el diagnóstico y como consecuencia, en la administración de tratamiento (Sekhoacha et al., 2022). Además, esta prueba no proporciona información relevante sobre la agresividad del tumor, puesto que se podría desencadenar desde una enfermedad indolente, hasta una enfermedad grave (Rebello et al., 2021).

Si se han observado niveles irregulares de PSA, se realiza un examen rectal digital (DRE), el cual consiste en una palpación física de la próstata en el que se evalúa el agrandamiento de su tamaño, la textura y la rigidez de la glándula, teniendo un valor predictivo positivo de entre el 5% y 30% de los casos (Sekhoacha et al., 2022). Si en las pruebas anteriores se han obtenido resultados anómalos, se realiza una biopsia de próstata para confirmar la presencia del tumor. La biopsia se realiza mediante un abordaje transrectal guiado por ultrasonido, con un mínimo de 10 biopsias centrales (Nguyen-Nielsen & Borre, 2016).

1.1.2 Estratificación

Una vez confirmado el diagnóstico, el CaP se estratifica en base a las características del tumor y el riesgo de progresión, clasificándose en de bajo riesgo, de riesgo intermedio y de alto riesgo (Rebello et al., 2021). Para poder determinar en cuál de los tres grupos se encuentra, se utilizan los patrones de Gleason, donde a partir de las distintas biopsias, se suma el grado primario del patrón histológico predominante y el grado secundario del patrón más alto. Ambos valores se puntúan en una escala del 1 al 5 y están basados en la observación morfológica de las células (Nguyen-Nielsen & Borre, 2016). El sumatorio da como resultado un valor de Gleason que permite clasificar a los tumores en bajo (≤ 6), intermedio (7) o alto (8-10) riesgo. Estos grupos han sido adaptados por la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) dándoles un

Introducción

grado ISUP del 1 al 5 para poder facilitar su clasificación, como podemos observar en la Tabla 1. También se incluyen los valores de PSA, ya que concentraciones elevadas pueden indicar un alto riesgo de CaP (Mottet et al., 2020).

Tabla 1: Estratificación del riesgo de CaP en base a los grados Gleason, los grados ISUP y a los niveles de PSA (Adaptado de Mottet et al., 2020).

Riesgo	Grado Gleason	Grado ISUP	PSA (ng/mL)
Bajo	2 – 6	1	<10
Intermedio	7 (3 + 4)	2	10 – 20
	7 (4 + 3)	3	
Alto	8	4	>20
	9 – 10	5	

Los pacientes con CaP localizado de bajo riesgo, se caracterizan por tener un tumor con progresión lenta y de bajo potencial metastásico, teniendo en su mayoría un pronóstico favorable y un riesgo de muerte de un 1% a los 10 años del diagnóstico (Rebello et al., 2021). En cambio, los pacientes con enfermedad de riesgo intermedio, suelen tener una progresión rápida y una probabilidad significativa de desarrollar una recurrencia sistémica o local, por tanto, existe un mayor riesgo de presentar síntomas y de muerte (Rebello et al., 2021).

En cuanto a los pacientes con riesgo alto, tienen una elevada probabilidad de desarrollar metástasis, debido a la rápida progresión y proliferación de las células tumorales (Chang et al., 2014). Cabe destacar que, tanto el Grado Gleason como el ISUP no han demostrado la capacidad de predecir si la enfermedad va a progresar de forma agresiva o indolente (Rebello et al., 2021).

1.1.3 Tratamiento

El tratamiento del CaP va a depender del riesgo, atendiendo a la estratificación anteriormente realizada. En la Tabla 2 podemos observar algunas de las aproximaciones terapéuticas que se utilizan en la actualidad, agrupadas según su administración dependiendo del riesgo de CaP (Sekhoacha et al., 2022).

Tabla 2: Aproximaciones terapéuticas actuales según la estratificación de la enfermedad. Extraído de: (Sekhoacha et al., 2022).

Riesgo de la enfermedad	Opciones de tratamiento
Riesgo bajo	Vigilancia activa Radioterapia de haz externo Braquiterapia Crioterapia Prostatectomía radical
Riesgo intermedio	Radioterapia de haz externo Braquiterapia Crioterapia Prostatectomía radical
Riesgo alto	Radioterapia de haz externo Terapia hormonal Quimioterapia

A los pacientes con CaP de bajo riesgo o aquellos que tienen una expectativa de vida larga, se les realiza vigilancia activa, que consiste en monitorizar los niveles de PSA, la realización de exámenes DRE y biopsias repetidas, con el objetivo de controlar el tumor y su posible progresión (Sekhoacha et al., 2022). Los pacientes con riesgo bajo o intermedio, aparte de la vigilancia activa, se les pueden realizar distintos tratamientos locales, tales como la prostatectomía radical, que consiste en la extirpación de la glándula prostática, la radioterapia de haz externo, la braquiterapia o la crioterapia.

El tratamiento de los pacientes con CaP de alto riesgo suele consistir en terapia hormonal, quimioterapia o radioterapia de haz externo. La terapia hormonal suele ser la más utilizada y es conocida como terapia de deprivación de andrógenos (TDA) (Sekhoacha et al., 2022). Su mecanismo terapéutico se basa en reducir los niveles de testosterona y otras hormonas masculinas, para evitar la proliferación de las células cancerígenas (Zhang et al., 2019). Esto es debido a que, los andrógenos producidos en los testículos, las glándulas suprarrenales y la próstata, son esenciales para el normal desarrollo y funcionamiento de la próstata, así como para la proliferación del CaP, por lo tanto, la supresión de los efectos androgénicos con la TDA puede usarse para prevenir la progresión del CaP. Sin embargo, el efecto de la TDA tiene una duración aproximada de 18 meses, después, los pacientes pueden desarrollar cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) (Nguyen-Nielsen & Borre, 2016).

Introducción

La enfermedad en etapa avanzada es la forma más letal de CaP, ya que el tumor deja de ser localizado y, por lo tanto, puede diseminarse a los ganglios linfáticos y sitios óseos. Las aproximaciones terapéuticas disponibles para la enfermedad avanzada, se basan en: terapia hormonal, quimioterapia, ARSIs de *next-generation* (acetato de abiraterona, enzalutamida, apalutamida y darolutamida), radionúclidos dirigidos al hueso (cloruro de radio-223) y taxanos como el cabazitaxel (Rebello et al., 2021). A pesar de esto, una vez que la enfermedad se encuentra en estadios avanzados, no existe ningún tratamiento que pueda curarla, teniendo una esperanza de vida de entre 18-20 meses, en estos casos, el tratamiento consiste en alargar la vida del paciente (Karantanos et al., 2013; Sekhoacha et al., 2022).

Es por ello que surge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para tratar el CaP.

1.2 Estrategias para la identificación de dianas terapéuticas

1.2.1 Vulnerabilidades genéticas

Una prometedora aproximación para el desarrollo de fármacos, es la identificación de genes esenciales relevantes en el desarrollo de la enfermedad. Los genes esenciales se definen como genes que son fundamentales para la proliferación y supervivencia celular (Lin & Sheltzer, 2020; Chen et al., 2017). Para la identificación de estos genes, se utilizan cribados génicos, que tienen como objetivo identificar qué genes contribuyen a enfermedades y fenotipos biológicos específicos (Shalem et al., 2015).

Los cribados génicos permiten analizar la pérdida de función de genes esenciales y observar su involucración en la proliferación y supervivencia celular. Actualmente, existen dos tecnologías para realizar los cribados génicos, que consisten en ARN de horquilla pequeña (ARNsh), donde se produce un bloqueo parcial de la actividad de un gen (*knockdown*), y CRISPR-asociado a la proteína 9 (CRISPR-Cas9, de las siglas en inglés: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), donde se produce un bloqueo total de un gen (*knockout*) (Liu & Li, 2019; Schuster et al., 2019; Shalem et al., 2015). Por lo tanto, los cribados génicos pueden ayudar a identificar perfiles moleculares específicos requeridos por las células tumorales para su proliferación (Lin & Sheltzer, 2020).

Para facilitar la identificación de genes esenciales, existen distintas bases de datos bioinformáticas de libre acceso con datos de cribados génicos. El más utilizado es el *DepMap* (<https://depmap.org/portal/>), que contiene datos de cribados génicos de silenciamiento realizados mediante ARNsh y CRISPR-Cas9. Por lo tanto, estas bases de datos podrían facilitar la identificación de genes esenciales relevantes en el desarrollo de la patología y la posterior identificación de potenciales dianas terapéuticas.

Además de lo mencionado, para el desarrollo de fármacos se puede recurrir al análisis de los niveles de expresión del gen en tejidos sanos y tumorales. A partir de estas comparaciones, los genes esenciales sobreexpresados únicamente en el tejido tumoral se pueden considerar para ser evaluados como potenciales dianas terapéuticas para el desarrollo de terapias específicas.

1.2.2 Dianas terapéuticas

Una vez identificado un gen esencial mediante cribado génico, se debe de evaluar como potencial diana terapéutica. Las dianas terapéuticas son proteínas que tienen una actividad que puede ser modulable mediante una molécula farmacológica (Santos et al., 2016). Además, la identificación de nuevas dianas terapéuticas específicas de la enfermedad es de gran interés para el desarrollo de terapias dirigidas y medicina de precisión, ya que, mediante la regulación de su actividad, se podría llegar a controlar la proliferación del tumor y la formación de metástasis (Behan et al., 2019).

Al considerar una nueva proteína diana, es fundamental evaluar distintas características químicas, moleculares y farmacológicas con el objetivo de determinar su potencial como diana terapéutica. Así como, se debe de realizar una búsqueda en la literatura para contrastar estudios y comprender sus funciones biológicas y su relevancia en el cáncer o en la patología que se está estudiando.

Las características más relevantes que se deben analizar son: i) ubicación y naturaleza de los sitios activos de la diana, ii) función de la diana y su integración en rutas biológicas, iii) mecanismos de regulación endógena, iv) localización espacial y temporal, v) interacción de dianas homólogas con posibles ligandos, vi) propiedades de moduladores conocidos y vii) estado de progresión de los moduladores (Brown et al., 2018). Además, para una adecuada evaluación de potenciales dianas farmacológicas,

Introducción

es importante conocer las características relevantes de la patología que se está investigando, los mecanismos moleculares básicos de la proteína diana y tener acceso a las distintas bases de datos bioinformáticas donde se dispone de modelos predictivos y tecnologías de apoyo (Figura 3) (Gashaw et al., 2011).

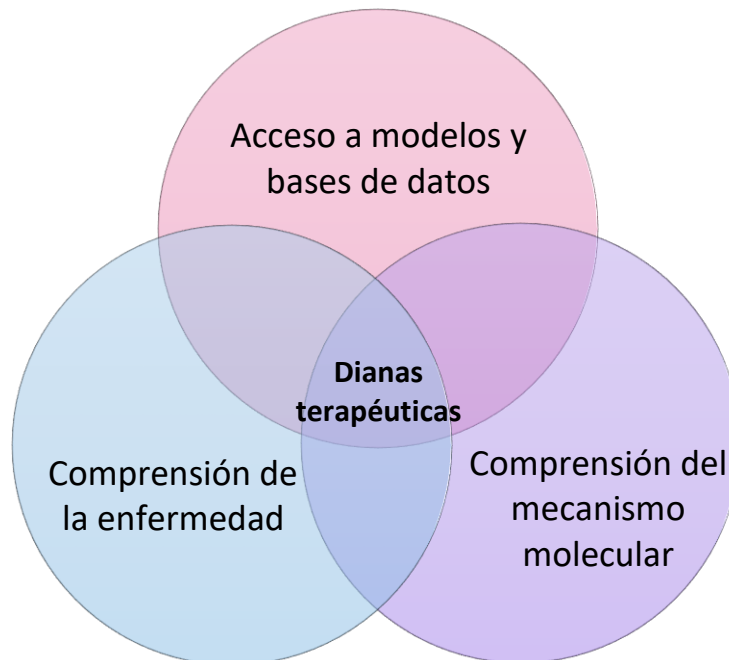


Figura 3: Factores clave que contribuyen a una estrategia exitosa de la evaluación de potenciales dianas. La relación entre la comprensión de la enfermedad, modelos y bases de datos y los mecanismos moleculares básicos, contribuyen a una evaluación exitosa de potenciales dianas terapéuticas. Adaptado de: (Gashaw et al., 2011).

Una vez se tiene información acerca del mecanismo molecular y de la relevancia de la potencial diana terapéutica en la patología, se debe evaluar la propiedad de *druggability*, que se define como la capacidad de unión de la proteína con un modulador similar a un fármaco con niveles de afinidad, eficacia y seguridad terapéuticamente relevantes (Lin et al., 2017; Brown et al., 2018). Para esto, la disponibilidad de la estructura 3D cristalina de la proteína puede ser necesaria para predecir posibles sitios de unión, permitiendo analizar distintas características estructurales como el tamaño, la forma, los aminoácidos que forman parte del sitio de unión, etc. (Gashaw et al., 2011).

Una vez se han evaluado las características anteriores, la potencial diana terapéutica puede ser validada experimentalmente mediante la generación de modelos celulares para estudiar su relevancia en la enfermedad. Para estudiar el comportamiento

celular se puede generar un modelo *knockdown* o *knockout* para bloquear parcial o totalmente la actividad de un gen. Además, se podría realizar posteriormente su evaluación en modelos animales (Gashaw et al., 2011).

Debido a la necesidad de identificar nuevas potenciales dianas terapéuticas para el CaP, en el laboratorio se llevó a cabo un análisis bioinformático combinando datos de cribados génicos en líneas celulares de CaP con datos de expresión génica y de progresión de la enfermedad. En este análisis se identificaron genes esenciales sobreexpresados en pacientes con CaP en comparación con individuos sanos y en tumores agresivos y/o metastásicos comparados con tumores indolentes y primarios, respectivamente. Finalmente, se realizó un análisis de supervivencia y se seleccionaron aquellos genes asociados con una peor progresión del CaP. Este análisis permitió identificar 16 potenciales dianas terapéuticas para el CaP, entre las cuales se encuentra el gen *U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated (LSM4)*, cuyo potencial como diana terapéutica será evaluado en este estudio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Valoración de LSM4 como potencial diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de CaP avanzado.

2.2 Objetivos específicos:

1. Estudiar la potencial implicación de LSM4 en el desarrollo y progresión del CaP.
2. Evaluar la potencial *druggability* de LSM4.
3. Determinar los niveles de expresión de LSM4 en distintos modelos celulares de CaP.
4. Generar un modelo de silenciamiento de *LSM4* en un modelo celular de CaP.
5. Evaluar el efecto de silenciamiento de *LSM4* en la capacidad proliferativa de modelos celulares de CaP.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares de CaP

Se utilizaron un total de cinco líneas celulares de próstata humana, una que representa la condición sana (RWPE-1) y cuatro modelos celulares de CaP (22rv1, DU145, LnCap y PC3) que exhiben diferentes características biológicas y moleculares. La línea RWPE-1 se define como una línea celular epitelial, derivada de la zona periférica, que expresa PSA y receptores de andrógenos (AR). La línea 22rv1 representa el estadio primario de CaP, es una línea hormono dependiente proveniente de un xenoinjerto humano que expresa PSA y AR. DU145 representa un modelo de potencial metastásico moderado, fue establecida a partir de una muestra de metástasis cerebral, exprese AR, pero es considerada castración dependiente. LnCap se establece a partir de metástasis en los ganglios linfáticos, es sensible a los andrógenos y tiene un potencial metastásico más bajo. Por último, la línea celular PC3, se establece a partir de metástasis ósea de adenocarcinoma de grado IV, se utiliza como modelo resistente a los andrógenos y se caracteriza por un alto potencial metastásico.

3.1.1 *Cultivos celulares*

La línea celular 22rv1, cedida por el Instituto Valenciano de Oncología (IVO), se cultivó en medio RPMI 1640 (Ref #11875093, Thermo Fisher), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (Ref #16141079, Thermo Fisher) y un 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (P/E) (Ref #15140122, Thermo Fisher).

También se ha utilizado la línea celular Human Embryonic Kidney (HEK) 293T, cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Ref #11965092, Thermo Fisher) suplementado con 10% de SBF y 1% de P/E. Esta línea celular ha sido utilizada en la infección mediante lentivirus, con el fin de generar los modelos de silenciamiento.

Las líneas celulares se incubaron a una temperatura constante de 37 °C y con un 5 % de CO₂. Para su mantenimiento y expansión, se les cambió el medio de cultivo cada tres días y se realizaron pases celulares de dos a tres veces por semana cuando el cultivo alcanzaba una confluencia mayor del 70%.

Para realizar los pases celulares, se retiraba el medio de cultivo para después, lavar las células con 10 ml de buffer salino con fosfato de Dulbecco (PBS) al 1X (Ref.

Material y métodos

#D8537, Sigma-Aldrich). Tras retirar el PBS, se levantaron las células con 1 ml de tripsina-EDTA (Ref #25200056, Thermo Fisher) y pasados 5 min de incubación a 37 °C se recogieron con 10 ml de medio RPMI 1640 en un tubo Falcon de 15 ml. Después, se realizó una centrifugación durante 5 min a 1000 rpm, se retiró el medio y se resuspendieron con 10 ml de medio RPMI 1640, de los cuales 1 ml se pasaba a una nueva placa junto con 9 ml de medio nuevo. El volumen del medio con células, fue dependiente de las placas requeridas o la confluencia deseada.

3.2 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Se sembraron 200.000 células en cada pocillo en placas de 6 pocillos, cada muestra se sembró por triplicado y se incubaron a 37 °C con un 5% de CO₂ durante 48 h. Después, se aspiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS frío al 1X. El ARN fue extraído utilizando el *RNeasy Mini Kit* (Ref #74004, Qiagen GmbH) y cuantificado mediante el dispositivo de Nanodrop (Ref #ND-ONE-W, Thermo Scientific). Las muestras fueron preparadas a una concentración de 500 ng.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir del ARN preparado anteriormente y se realizó la retrotranscripción siguiendo las indicaciones del *QuantiTect Reverse Transcription kit* (Ref # 205311, Qiagen GmbH). Primero, se añadieron 2 µl de *buffer wipeout* ADN genómico (ADNg) para eliminar el ADNg contaminante y a continuación, el ARN total se incubó a 42 °C durante 2 min. Después, se añadió la *Master Mix* preparada con el kit de Qiagen (Tabla 3) y las muestras se incubaron a 42 °C durante 15 min.

Tabla 3: *Master Mix* utilizada para la transcripción reversa del ARN

Reactivo	Volumen (µl)
<i>Buffer retrotranscripción</i>	4
<i>Primers</i>	1
<i>Enzima retrotranscriptasa</i>	1

Después de la transcripción reversa, se añadió la *Master Mix* de *TB Green*® *Premix EX Taq™ kit* (Ref # RR82WR, Takara) y los *primers* sentido y atisentido a 10 ng de ADNc (Tabla 4).

Tabla 4: Master Mix utilizada para realizar la qPCR

Reactivo	Volumen (μl)
ADN	2
ROX Dye II (50X)	0,2
Primer Sentido (10X)	0,3
Primer Antisentido (10X)	0,3
ADN master SYBR Premix Ex Taq Takara (2X)	5
H ₂ O	2,2

La qPCR se realizó mediante el sistema *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Ref # 4453543, Applied Biosystems), con una temperatura de hibridación de 60 °C y con 40 ciclos de amplificación. Además, se realizaron duplicados técnicos de cada muestra.

Los valores de expresión se cuantificaron utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y se normalizaron con los niveles de expresión del *housekeeping gene*, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). Las secuencias de los primers utilizados en la qPCR para cada gen, se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5: Secuencias de los *primers* utilizados para la qPCR

Gen	Primer Sentido	Primer Antisentido
<i>GAPDH</i>	5'- ATGCTGGCGCTGAGTACGTC -3'	5'- GGGCAGAGATGATGACCCTT -3'
<i>LSM4</i>	5'- CGGCACCATGTTGGTGGA -3'	5'- CCTGGACGTGCAGATGACTT -3'

3.3 Análisis Western blot

Se sembraron $1,5 \times 10^6$ células en placas de 100 mm y se incubaron a 37 °C con un 5% de CO₂ durante 48 h. Se realizaron 3 réplicas biológicas de cada condición. Después, se aspiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS frío al 1X. Las proteínas fueron extraídas añadiendo 150 μ l de *lisis buffer* a cada placa (Tabla 6) y utilizando

Material y métodos

raspadores de células tipo *scraper*. A continuación, las células lisadas fueron transferidas a tubos de centrifuga.

Tabla 6: Reactivos para 1 ml de *buffer* de lisis para la extracción de proteínas.

Reactivo	Volumen (μl)
<i>RiPA buffer</i>	980
β -Glicerolfosfato (25 mM)	10
DTT (1M)	1
<i>Leupeptina</i> (1mg/ml)	4
PMSF (20 mM en isopropanol)	2
<i>Caliculina</i> (100 μ M en DMSO)	1
Ortovanadato (Na_3Vo_4 500 mM)	2
<i>Pepstatina</i> (0,4 μ M)	4

Los tubos de centrifuga con las células lisadas, se incubaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 min a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y la concentración de proteínas se calculó utilizando el kit de Ensayo de Proteínas BCA Pierce™ (Ref #23227, Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, las alícuotas de proteínas fueron preparadas a una concentración final de 1 μ g/ μ l. Se cargaron 20 μ g de proteína y se separaron por tamaño utilizando un gel de poliacrilamida al 4-15% (Ref #4561086, Bio-Rad Laboratories Inc.). Una vez corrido el gel, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Ref #1704157EDU, Bio-Rad Laboratories Inc.). Las uniones no específicas de la membrana fueron bloqueadas con el *buffer Tris-buffered saline-Tween* (TBS-T) al 1X (100 ml 10X TBS (200 mM Tris pH = 7,5, 1,5 M NaCl), 900 ml H₂O, 1 ml Tween 20%), con 5% de leche a temperatura ambiente durante 1 h. Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (diluido 1:1000 en TBS-T 1X con 5% BSA) a 4° *overnight*. Las condiciones de dilución y los anticuerpos utilizados para la determinación de los niveles de proteínas están incluidas en la Tabla 7.

Tabla 7: Anticuerpos primarios utilizados en el análisis del Western blot.

Anticuerpos	Referencia	Dilución
GAPDH	2118 (Cell Signaling Technology)	1:1000
LSM4	ab153959 (abcam)	1:1000

Tras la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-T 1X en agitación a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario de anti-*rabbit* (Ref #1706515, Bio-Rad Laboratories Inc.) conjugado con peroxidasa, con 5% de leche en TBS-T 1X a temperatura ambiente en agitación durante 1 h. Se les realizaron 3 lavados más con TBS-T 1X de 10 min en agitación a temperatura ambiente.

Finalmente, las bandas fueron detectadas utilizando un sistema altamente sensible de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Ref #1705061, Bio-Rad Laboratories Inc.), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4 Generación de modelos de silenciamiento mediante ARNsh

3.4.1 Plásmidos ARNsh

El vector utilizado para la generación de los modelos de silenciamiento celular ha sido el pLKO.1 (Horizon discovery group pl.), como se muestra en la Figura 4. Este vector es un plásmido basado en lentivirus del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el cual permite la producción de partículas virales en una línea celular para posteriormente, infectar con las partículas lentivirales producidas a la línea celular de interés.

Material y métodos

El vector se integra en el cromosoma, pudiendo generar un modelo celular de silenciamiento estable. La selección de las células que integren el vector se realizó mediante puromicina, ya que el plásmido contiene un marcador de resistencia a este antibiótico.

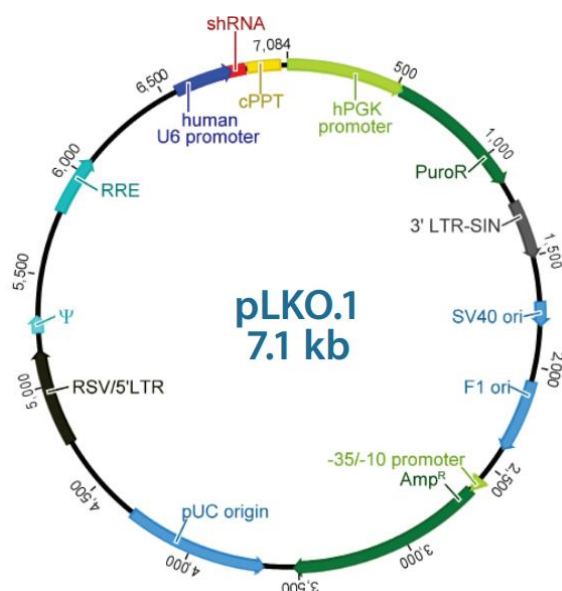


Figura 4: Vector pLKO.1. Contiene el promotor humano U6, la región ARNsh que sirve para la *knockdown* de genes, Puro^R que le confiere resistencia a puromicina, Amp^R le confiere resistencia a la ampicilina, entre otras regiones necesarias para el empaquetamiento de las partículas virales, como la región Ψ y la RRE. Figura extraída de: (Horizon discovery group pl.).

La información acerca de cada ARNsh utilizado para la generación de modelos de silenciamiento se encuentra en la Tabla 8.

Tabla 8: Construcciones ARNsh utilizados para el gen *LSM4*

Nombre	Secuencia	Identificación	Región de unión al vector
sh-C	-	-	-
sh-8	TTTCTAACCGGAGAATTGCCG	TRCN0000072308	3'UTR
sh-11	TAATGTTTCATCCAGTTGTCGC	TRCN0000072311	ORF

3.4.2 Producción de lentivirus

Para cada vector lentiviral, se cultivaron 1.5×10^6 células HEK 293T en placas y se dejaron incubando *overnight*. Después, para cada uno de ellos, se preparó un *mix* con 544 μ l de medio DMEM libre de SBF y 24 μ l de FuGENE, se dejó reposar durante 5 min y se añadió a un *mix* de transfección de ADN, el cual contenía los siguientes plásmidos: 100 ng/ μ l de v-SVG, 1 μ g/ μ l de Gag/Pol, 1 μ g/ μ l de Rev y 1 μ g/ μ l del vector lentiviral. La mezcla de FuGENE junto con el *mix* de transfección de ADN se dejó reposar durante 25-35 min.

A continuación, se reemplazó el medio de cultivo de las HEK 293T por medio DMEM completo (con P/E y SBF) y se añadió poco a poco el *mix* de transfección, intentando expulsar el medio de la pipeta gota a gota y abarcando toda la placa. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Pasadas 6 h, se descartó el medio y se cambió por medio completo de DMEM, dejándolas incubar durante 48 h.

3.4.3 Infección celular

Las células 22rv1 fueron cultivadas en placas 6-well dos días antes de la infección, sembrando 4×10^5 células en cada pocillo e incubándolas a 37 °C y 5% de CO₂. Tras 48 h, se recogió el medio de las HEK 293T donde se encontraban los lentivirus producidos, se filtraron mediante una jeringuilla por un filtro de 0.45 μ m y se centrifugaron a 300 g durante 3 min. A cada uno de los pocillos de las 22rv1, se les descartó el medio de cultivo y se añadieron 2 ml del medio anterior, suplementado con 4 μ g/ml del reactivo de transfección (polibreno). Se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ y después de 8 h, el medio se reemplazó por medio RPMI y se dejaron incubando *overnight*.

Pasadas 24 h, se descartó el medio de cultivo y se añadió medio de selección, que consistía en RPMI suplementado con puromicina a una concentración de 1.5 μ g/ml. En la Figura 5 podemos observar un esquema del proceso de producción e infección de lentivirus descrito anteriormente.

Material y métodos

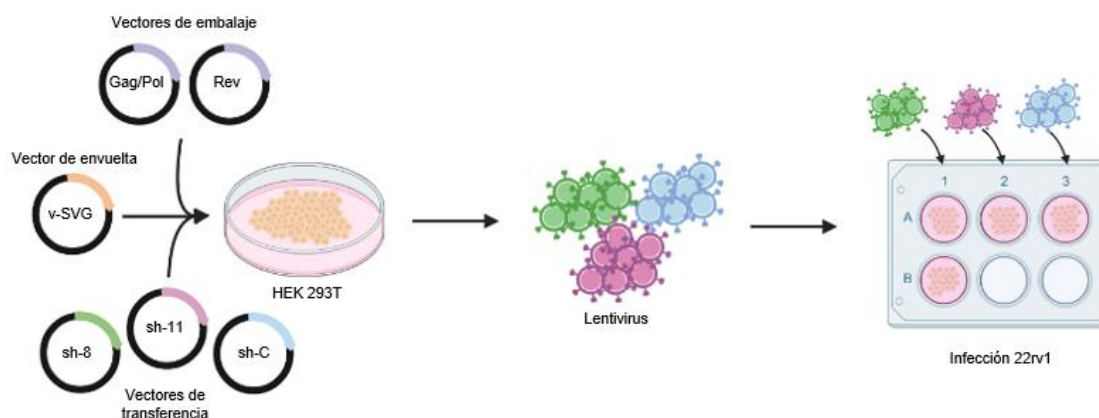


Figura 5: Proceso de transfección e infección. Representación de la transfección de las HEK 293T y posterior infección de las 22rv1.

3.5 Ensayo de proliferación

La proliferación celular se midió mediante colorimetría, utilizando el ensayo *CellTiter 96 Cell Proliferation MTS* (Ref #G3582, Promega). Se sembraron 1000 células por pocillo en placas de 96 pocillos, realizando 12 réplicas por condición en un total de 4 placas y se cultivaron durante 5 días a 37 °C en CO₂ al 5%. Para el ensayo MTS, se agregaron 20 µl de reactivo MTS a cada pocillo de cultivo, el reactivo contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3- carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio; MTS], y se dejó incubar la placa con el reactivo durante 3 h a 37 °C. Los tiempos de medición fueron en el día 0, en el día 1, el día 3 y el 5. Pasadas las 3 h, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de microplacas (Synergy H1, BioTek Instruments).

3.6 Ensayo de formación de colonias

Se sembraron 2000 células por pocillo en placas de 6 pocillos realizando triplicados para cada condición y se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5%. Después de dos semanas, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con 5 ml de agua y se tiñeron con Sulforhodamina B durante 20 min. A continuación, se lavaron 5 veces con 3 ml de ácido acético al 2% y se dejaron secar al aire overnight. Finalmente, la Sulforhodamina B se solubilizó con base Tris 10 mM y se midió la absorbancia a 570 nm (Synergy H1, BioTek Instruments).

3.7 Análisis estadístico

Para realizar los análisis estadísticos de los datos obtenidos en la RT-qPCR, se utilizó GraphPad Prism (versión 9.3.0, GraphPad Software Inc., USA). Los diferentes grupos celulares de CaP se evaluaron mediante la prueba ANOVA, teniendo un valor significativo cuando $P\text{-value} < 0.05$. La comparación del control de manera independiente con cada uno de los grupos celulares, se realizó mediante la prueba *T-student*, teniendo un valor significativo cuando el $P\text{-value} < 0.05$.

3.8 Bases de datos

Para la evaluación de LSM4, se utilizaron distintas bases de datos. La estructura tridimensional de la proteína se obtuvo de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/search>). Conocer la estructura 3D de la proteína que se está estudiando, es una clara ventaja para la evaluación de potenciales dianas terapéuticas, ya que mediante bases de datos como canSAR (<https://cansar.ai/>) se pueden predecir sus posibles sitios activos. Para la evaluación de la posible diana, canSAR utiliza una gran cantidad de características en su algoritmo predictivo, incluido el volumen, tamaño, donantes de enlaces de hidrógeno, fracción hidrofóbica, etc. Además, la base de datos compara los aspectos funcionales de la proteína de interés, con otras proteínas o dianas terapéuticas ya estudiadas, las cuales son estructuralmente similares y relevantes en ciertas patologías.

UniProt (<https://www.uniprot.org/>) se utilizó para obtener información relevante acerca de la proteína, como su localización celular o sus funciones.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Relevancia biológica de LSM4

4.1.1 Funciones biológicas

La evaluación de LSM4 como potencial diana terapéutica se debe iniciar a partir de una búsqueda en bases de datos y literatura acerca de su localización subcelular, identificación de sus funciones biológicas, complejos en los que está relacionada...etc.

LSM4 es una pequeña ribonucleoproteína nuclear que forma parte de una familia de 13 proteínas de tipo Smith de unión al ARN (LSM1 ~ LSM14B) (Chen et al., 2022). La proteína se encuentra localizada en el núcleo y en el citoplasma celular, tal y como se muestra en la Figura 6.

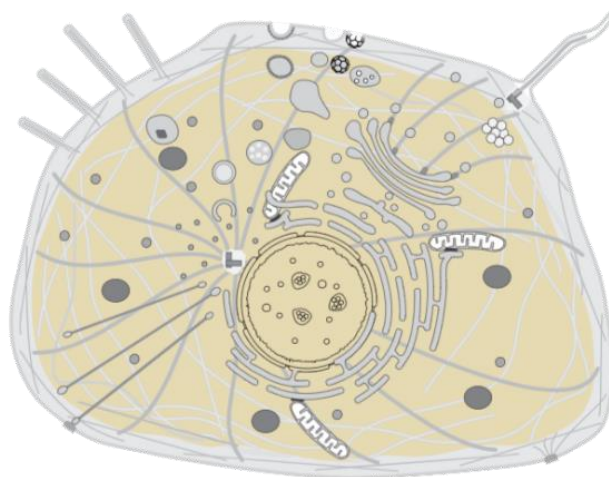


Figura 6: Localización subcelular de LSM4. Representación esquemática de la localización de LSM4 en la célula, se indica en amarillo las zonas celulares en las que se encuentra, estando en el núcleo y en el citoplasma. Extraída de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/> acceso el 4 de abril del 2023).

Dependiendo de la localización subcelular, LSM4 realiza dos funciones relevantes, representadas en la Figura 7.

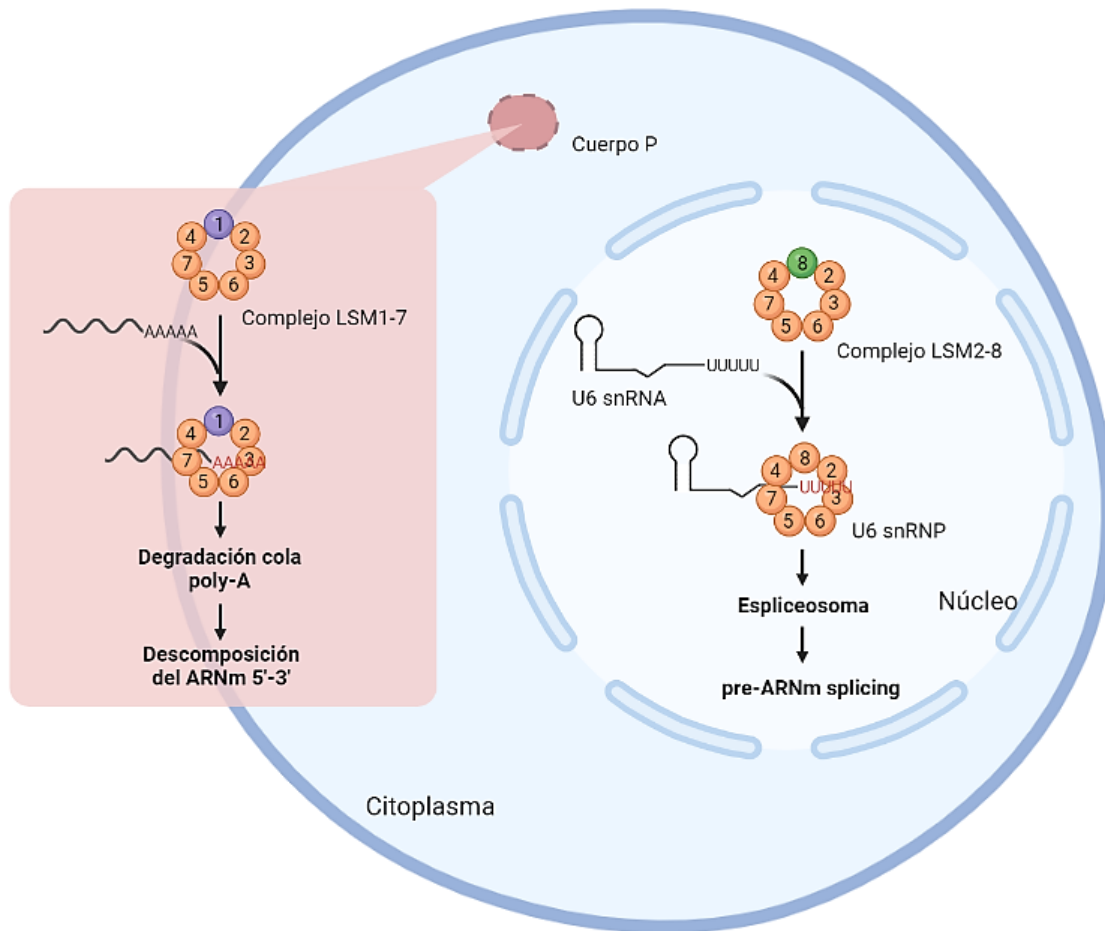


Figura 7: Localización subcelular y función de los complejos LSM en células eucariotas.

En el núcleo, el complejo LSM2-8 interactúa con el oligo-U de la subunidad U6 del espliceosoma, para bloquear su degradación por exonucleasas. Además, el complejo LSM2-8 es un componente central del espliceosoma y participa en la reacción de *splicing*. En el citoplasma, el complejo LSM1-7 forma parte de la maquinaria de los cuerpos P, jugando un papel esencial en la ruta de descomposición del ARNm 5'-3'. Creación propia con Biorender.com adaptada de: (Catalá et al., 2019). Disponible en <https://www.biorender.com/> (acceso el 4 de abril del 2023).

En el núcleo, LSM4 participa en el ensamblaje del espliceosoma, formando parte de un complejo de 7 proteínas de la familia tipo Smith (LSM2-8), el cual a su vez forma parte de la unidad U4/U6-U5 tri-snRNP del espliceosoma. El espliceosoma es un complejo de corte y empalme encargado de realizar el *splicing* del pre-ARNm (Ta et al., 2021). Por lo tanto, el espliceosoma debe reconocer de forma adecuada las secuencias de intrones de los distintos ARN para eliminarlos, ya que se podrían dar como resultado defectos del procesamiento del pre-ARNm (Verma et al., 2018).

En el citoplasma, LSM4 forma parte de un complejo formado por LSM1-7, el cual se encuentra dentro de orgánulos llamados cuerpos de procesamiento (cuerpos P)

(Arribas-Layton et al., 2016). Los cuerpos P, son oligonucleótidos citoplasmáticos no membranosos y dinámicos, formados por gránulos de ribonucleoproteínas (RNP), los cuales están involucrados en la degradación del ARN y almacenamiento de ARNm (Lavalée et al., 2021). Además, los cuerpos P también se relacionan en la regulación postranscripcional (Jeon et al., 2022). Por otro lado, el análisis del transcriptoma de los cuerpos P reveló un enriquecimiento de ARNm reprimidos traduccionalmente que codifican proteínas reguladoras relacionadas con la transcripción, división celular y regulación de la cromatina. Por lo tanto, los cuerpos P podrían estar implicados en la proliferación celular (Hubstenberger et al., 2017).

El espliceosoma y los cuerpos P han sido relacionados con el cáncer y la progresión tumoral (Lavalée et al., 2021). Por un lado, errores en el proceso de *splicing* a causa de mutaciones en subunidades del espliceosoma, producen un *splicing* aberrante. Este fenómeno se ha observado en muchos tipos de cáncer, incluido el de páncreas, el de pulmón, el de mama, el colorrectal, el de próstata, entre otros (Yang et al., 2022). Por otro lado, en los cuerpos P se ha observado que durante la tumorigénesis y las situaciones de estrés, las células tumorales utilizan estos gránulos para prosperar, adaptarse a las condiciones del microambiente tumoral y protegerse de distintos tratamientos contra el cáncer, como la quimioterapia (Lavalée et al., 2021).

Dado que se está valorando LSM4 como potencial diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos, se van a seguir investigando los cuerpos P y la relación que tienen con LSM4, ya que, al estar ubicada en el citoplasma, va a ser mucho más accesible para los fármacos. Esto se debe a que, en el citoplasma, los fármacos solo deben atravesar la membrana plasmática y en el núcleo, deben atravesar también la membrana nuclear.

4.1.2 LSM4 en los cuerpos P

Para evaluar la relación de LSM4 en los cuerpos P, se debe destacar que las células cancerosas se caracterizan por una acumulación de mutaciones somáticas, epigenéticas y alteraciones transcriptómicas. Además, durante la transformación celular y la progresión del cáncer, la alteración de la transcripción y la traducción resultan en un aumento del nivel de ARN y proteínas, entre ellas ribonucleoproteínas como LSM4, lo cual promueve la formación y acumulación de los cuerpos P (Horvathova et al., 2017; Jeon et al., 2022; Lavalée et al., 2021). Por otro lado, el ensamblaje y degradación de

Resultados y discusión

los cuerpos P está regulado por varios factores, en particular por ARNm que se disocia del ribosoma a través de la inhibición de la traducción. Por lo tanto, la sobreexpresión de fragmentos de ARNm que no se traducen, dan lugar a un aumento en número y tamaño de los cuerpos P (Jeon et al., 2022; Pitchiaya et al., 2019).

Estas alteraciones, indirectamente, ofrecen a las células tumorales mecanismos de adaptación para facilitar la supervivencia y la proliferación y a su vez, una plataforma para responder rápidamente al estrés ambiental (Lavalée et al., 2021). En este sentido, los cuerpos P favorecen la proliferación de las células tumorales protegiéndolas contra la apoptosis, especialmente, durante el tratamiento quimioterapéutico (Lavalée et al., 2021). Asimismo, promueven la transición epitelio-mesénquima (EMT) y mantienen el inicio, progresión y metástasis del tumor (Lavalée et al., 2021). Por lo tanto, los cuerpos P son de gran interés ya que, al limitar la acción de los fármacos y favorecer los mecanismos de escape inmunitarios, promueven y mejoran el crecimiento tumoral.

Un estudio realizado por Arribas-Layton et al (2016) sobre el papel que juega LSM4 en los cuerpos P, probó que la eliminación del dominio RGG (arginina, glicina, glicina) de la región C-terminal de LSM4, disminuye la formación de cuerpos P, determinando que se requiere el dominio RGG para su formación. Al mismo tiempo, los autores también observaron que este dominio no impedía el ensamblaje de LSM4 con el complejo LSM1-7, por lo tanto, LSM4 podía seguir realizando sus funciones. Por otro lado, las argininas de dominios R/G de LSM4, son relevantes para la acumulación de cuerpos P, ya que son objetivos para la metilación de la arginina, y el dominio RGG para la dimetilación de arginina simétrica (Brahms et al., 2001). En la Figura 8 están indicadas las regiones R/G y RGG de LSM4.

MLVELKNGETYNGHLVSCDNWMNINLREVICTSRDGDKFWRMPE
LSM4 CYIR**RG**STIKYLRIIPDEIIDMVKEEVVAKGR**RGRG**GLQQKQK**GRGM**
GGAG**RGV**FGG**RGRG**GIPGTGRGQPEKKPGRQAGKQ

Figura 8: Secuencia de aminoácidos de la proteína LSM4. Las regiones RG y RGG de la secuencia de LSM4, están resaltadas de color rosa y azul respectivamente. Creación propia.

La metilación de los grupos RGG/RG en proteínas de unión a ARN, como LSM4, regula las fases de separación y la dinámica de los gránulos de ribonucleoproteínas

como los cuerpos P. La proteína encargada de metilar el dominio RGG de LSM4 es la proteína metiltransferasa 5 (PRMT5), la cual promueve la formación de cuerpos P mediante la metilación (Jeon et al., 2022).

En el estudio llevado por Gu et al. (2012), se determinó que la PRMT5 citoplasmática es esencial para el crecimiento de las células del CaP, mientras que la PRMT5 nuclear inhibe el crecimiento de las células del CaP (Gu et al., 2012). Por tanto, la PRMT5 citoplasmática, que es la encargada de metilar los dominios RGG/RG de LSM4, está relacionada con la tumorigénesis prostática y se encuentra sobreexpresada en los tejidos premalignos de la próstata.

Basándonos en esta información, utilizamos datos de transcriptómica de la base de datos GTExPortal (<https://gtexportal.org/home/>) que contiene datos de tejidos sanos de próstata, y de la base de datos *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA, <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>) que contiene datos de tejidos de CaP, con el objetivo de evaluar las diferencias de expresión de *PRMT5* en tejidos sanos frente tejidos de CaP (Figura 9).

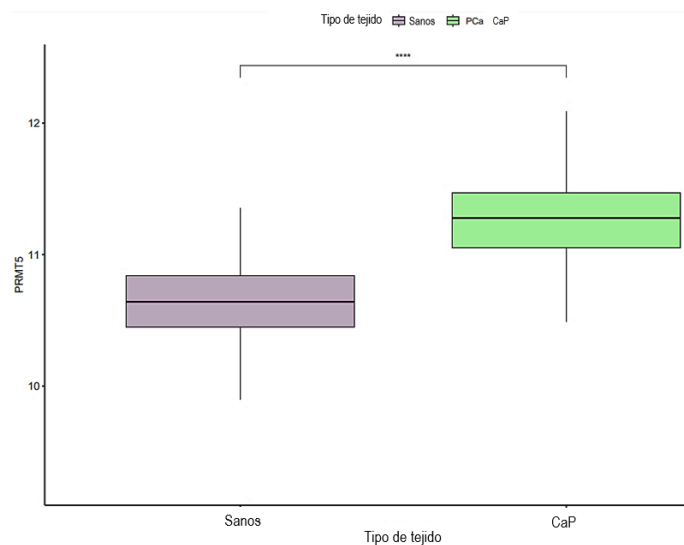


Figura 9: *PRMT5* está sobreexpresado en CaP. A partir de datos de tejidos sanos del portal GTEx y de tejidos de CaP de la base de datos TCGA, se han evaluado las diferencias de expresión de *PRMT5*. **** p-valor < 0.0001. Extraída de: (Gómez-Cebrián, 2023).

En la Figura 9, se representa la expresión de *PRMT5* en tejidos sanos y enfermos, donde se muestra una sobreexpresión de *PRMT5* en pacientes con CaP en comparación con los pacientes sanos, lo que hace que esté gen sea de gran interés.

En paralelo a este estudio, surgió el interés de evaluar la posible *druggability* de PRMT5, ya que, tal vez se podrían dirigir fármacos a esta proteína y abordar de forma indirecta a LSM4, que sigue siendo la proteína de interés en este estudio.

4.1.3 LSM4 en cáncer

Después de identificar las funciones biológicas de LSM4, se realizó una búsqueda en la literatura para relacionarla con el cáncer. En distintos estudios se relacionan las proteínas de la familia tipo Smith, incluida LSM4, con la tumorigénesis y la metástasis de múltiples tipos de cánceres, entre ellos, el cáncer de mama, el mesotelioma y el carcinoma de células escamosas de pulmón (Li et al., 2020; Streicher et al., 2007; Ta et al., 2021; Watson et al., 2008).

Anteriores investigaciones han demostrado que LSM4 está involucrada en la aparición y progresión maligna del cáncer de mama (Ta et al., 2021; Yin et al., 2021), el de páncreas (Xue et al., 2018) y el de ovario (Hou & Zhang, 2021). En la investigación de Yin et al. (2021) y en la de Ta et al., (2021), se analizó la expresión de *LSM4* en el cáncer de mama y observaron que su expresión aumentó significativamente con respecto a tejido sano. Además, una mayor expresión se vio relacionada con metástasis en los ganglios linfáticos y con un aumento de la proliferación de células tumorales. Asimismo, el estudio realizado por Xue et al. (2018) determinó que los niveles de proteína LSM4 fueron más elevados en tejidos de cáncer de páncreas que en tejidos de páncreas normales. Y en el estudio de Hou y Zhang (2021), se realizó un *knockdown* de *LSM4*, lo que bloqueó la capacidad de formación de colonias, la migración e invasión celular en células de cáncer de ovario.

Resultados similares fueron obtenidos por Chen et al. en su estudio de 2022 sobre LSM4 en carcinoma hepatocelular, donde indican que la expresión de *LSM4* en este tipo de cáncer es mayor en estadios clínicos avanzados, relacionando su expresión con el estadio del cáncer, el grado del tumor y el estado de metástasis en los ganglios linfáticos. Finalmente, concluyeron que *LSM4* podría servir como un prometedor biomarcador en el diagnóstico y pronóstico de este tipo de cáncer.

A pesar de que *LSM4* está muy relacionado con distintos tipos de cánceres, no hay estudios sólidos sobre este gen en CaP, lo que hace que sea de gran interés su evaluación en este estudio.

4.2 *Druggability* LSM4 y PRMT5

Una vez identificadas las funciones biológicas de LSM4 y la relación con distintos tipos de cáncer, se evaluó su *druggability*. En este contexto, se consideró relevante incluir también a la proteína PRMT5, dada su relación con LSM4 y su posible abordaje farmacológico de forma indirecta.

En la Tabla 9 se recoge información relevante acerca de LSM4 y PRMT5 relacionada con su peso molecular, localización celular, estructura 3D, cavidad de ligandos, etc.

Tabla 9: Características e información relevante de las potenciales dianas terapéuticas LSM4 y PRMT5.

	LSM4	PRMT5
Peso molecular	15,35 kDa	72 kDa
Localización subcelular	Núcleo / Citoplasma	Núcleo / Citoplasma / Aparato de Golgi
Estructura 3D disponible	Sí	Sí
Cavidad de ligandos	Sí	Sí
Ligandos/inhibidores	Ninguno conocido	Sí
Involucración en el cáncer	Sobreexpresado en cáncer de páncreas, mama, pulmón y ovario (Li et al., 2020; Streicher et al., 2007; Ta et al., 2021; Watson et al., 2008)	Vías reguladoras del desarrollo, progresión y respuesta a las terapias de distintos tipos de cáncer (Kim & Ronai, 2020)
Involucración en el CaP	-	Relacionada con la tumorigénesis prostática y está sobreexpresada en tejidos premalignos de la próstata (Gu et al., 2012)

LSM4 tiene un peso molecular de 15,35 kDa y una longitud de 139 aminoácidos (UniProt). En la base de datos PDB, se puede visualizar la estructura 3D de la proteína junto a la subunidad pre-catalítica del complejo B del espliceosoma, la cual ha sido

Resultados y discusión

obtenido mediante microscopía electrónica, teniendo una resolución de 5.70 Å (ID: 6AHO). En la Figura 10 podemos observar la proteína LSM4 aislada del complejo.

Por otro lado, no se han descrito ligandos o inhibidores asociados con la proteína, pero mediante la base de datos canSAR, se ha predicho una posible cavidad de ligandos para LSM4, que ocupa toda su cadena peptídica, como podemos observar en la Figura 10B.

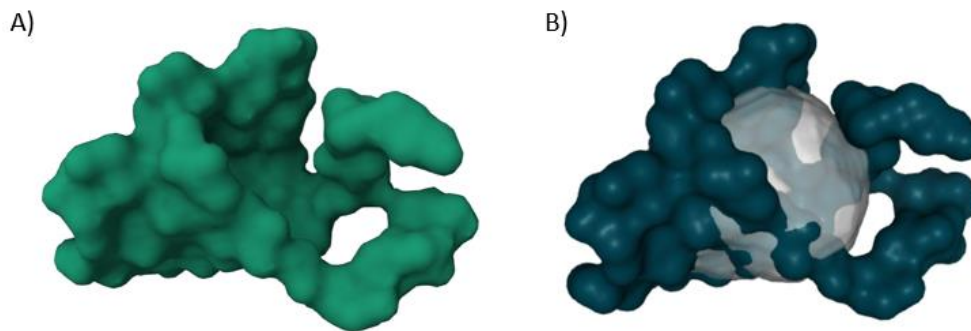


Figura 10: Estructura 3D de LSM4. A) Estructura 3D de LSM4, la imagen se ha extraído del PDB con código ID: 6AHO. B) Estructura 3D de LSM4 indicando la posible cavidad para un ligando, obtenida de canSAR.

Como podemos observar en la Figura 10 LSM4 podría tener un sitio activo ocupando toda su cadena, lo cual lo hace apto para poder seguir estudiándolo, ya que podría ser susceptible a ser modulado por un fármaco.

En cuanto a la proteína PRMT5, tiene un peso molecular de 72 kDa y una longitud de 637 aminoácidos (UniProt). Su disposición celular, como se puede observar en la Figura 11, se encuentra en el núcleo, citoplasma y aparato de Golgi. La estructura 3D de la proteína, se puede visualizar en el PDB y se ha obtenido mediante microscopía electrónica, con una resolución de 2.06 Å (ID:4GQB). En el PDB, la enzima se encuentra cristalizada en el complejo PRMT5:MEP50 humano. En la Figura 12 se encuentra PRMT5 aislada del complejo y con su sitio de unión.

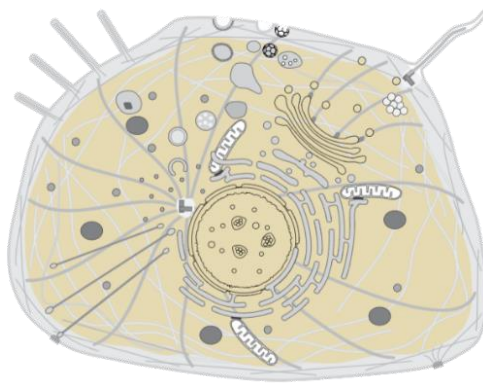


Figura 11: Localización subcelular de PRMT5. Representación esquemática de la localización subcelular de PRMT5, se indica en amarillo la localización, siendo en el núcleo, citoplasma y en el aparato de Golgi. Extraída de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/> acceso el 8 de mayo del 2023).

La proteína tiene un único sitio activo, el cual se puede observar en la Figura 12, donde se ha generado un ligando mediante la base de datos canSAR. Además, PRMT5 tiene un ligando conocido asociado, el cual se une a su sitio de unión, este se conoce como 0XU ($C_{15}H_{21}N_7O_5$).

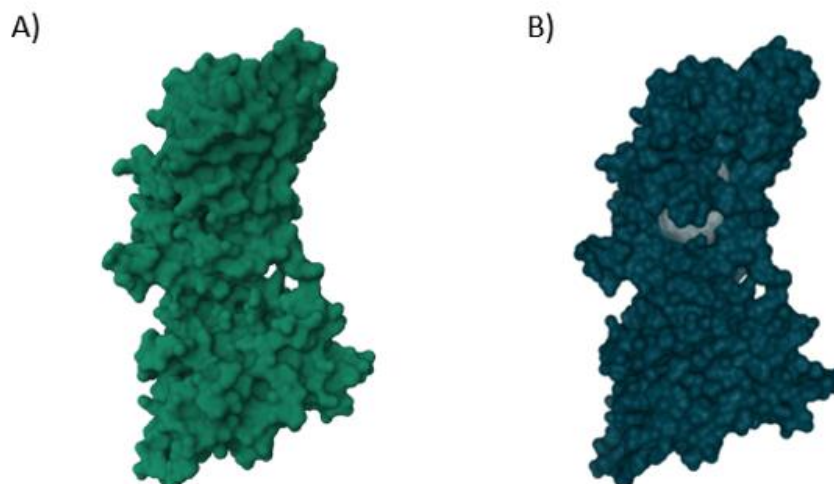


Figura 12: Estructura 3D de PRMT5. A) Estructura 3D de PRMT5, imagen obtenida del PDB, con código ID: 4GQB. B) Estructura 3D de PRMT5 indicando su sitio de unión, extraída de canSAR.

Las propiedades y diferencias de ambas proteínas se resumen en la Tabla 9. Siendo la característica más significativa que la proteína PRMT5, a diferencia de LSM4, ya dispone de una molécula que se sabe que interaccionan en su sitio activo como ligando, lo que hace más fácil su estudio y el posterior desarrollo de pequeños compuestos dirigidos.

4.3 Sobreexpresión de LSM4 en pacientes con CaP

Una vez evaluada la *druggability* de LSM4, para determinar si está sobreexpresado en CaP, se llevó a cabo un análisis previo en el laboratorio donde se comparó la expresión de *LSM4* en tejido sano y en tejido de CaP, así como la expresión en tumores de tipo no-agresivo con agresivo y tumores primarios con metastásicos. Analizándose también la correlación entre la expresión de *LSM4* y la progresión de la enfermedad mediante curvas de Kaplan-Meier.

Los resultados obtenidos en la Figura 13, muestran una sobreexpresión de *LSM4* en pacientes con CaP respecto a individuos sanos. Se observó a su vez, que la expresión de *LSM4* estaba significativamente correlacionada con un peor pronóstico, ya que una mayor expresión estaba asociada a un menor tiempo libre de recurrencia bioquímica.

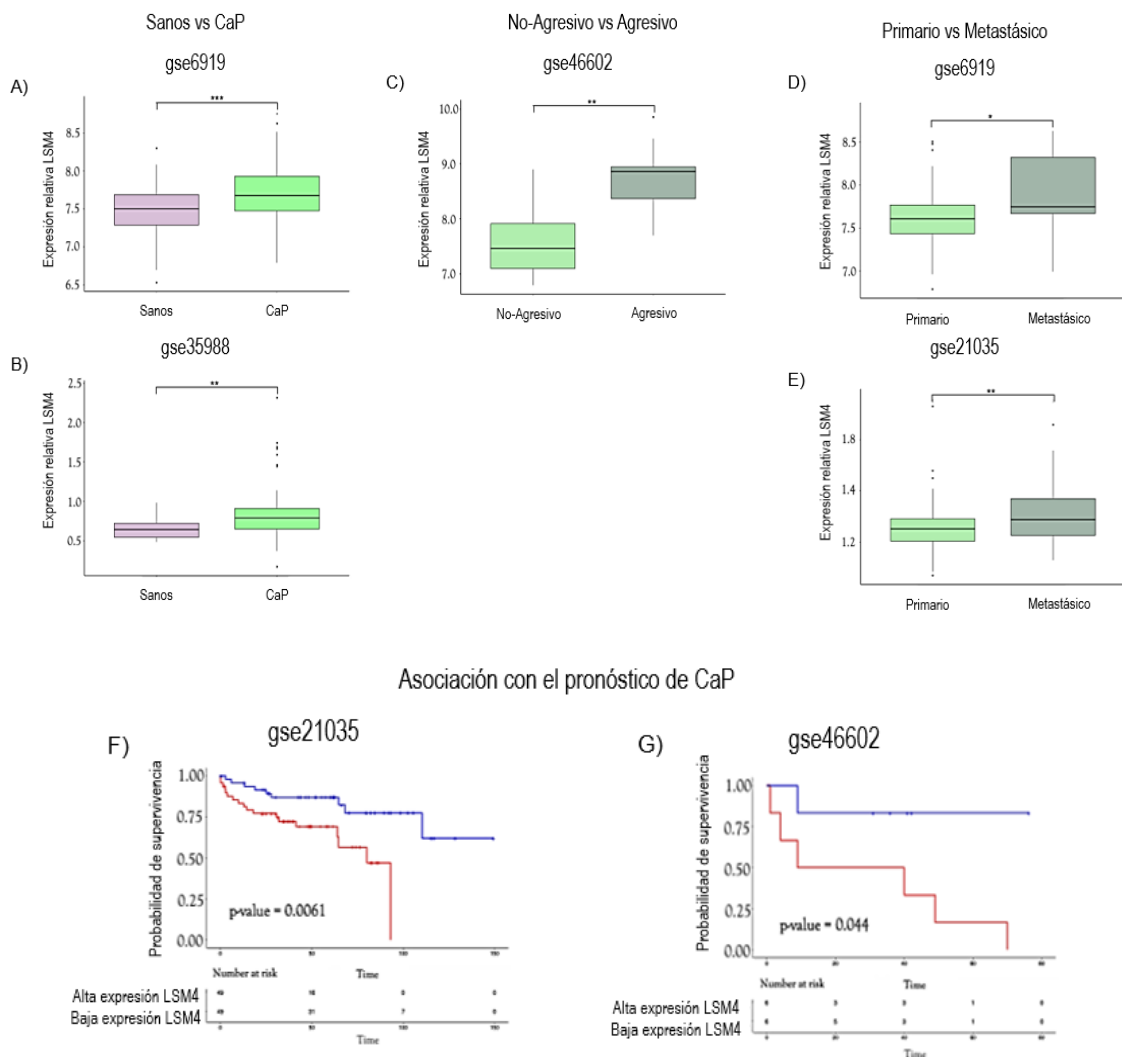


Figura 13: *LSM4* está sobreexpresado en CaP y asociado a un peor pronóstico. A) y B) expresión relativa de *LSM4* en CaP y tejido sano basado en los datos publicados por la base de

datos GEO de gse6919 y gse35988. Expresión relativa *LSM4* en distintos estadios de CaP, donde en la C) gse46602, en la D) gse6919 y en la E) gse21035. En la F y G) se ha asociado la expresión relativa de *LSM4* en el pronóstico del CaP, en una con gse21035 y en la otra gse46602. *** p-valor < 0.001, ** p-valor < 0.01, * p-valor < 0.05. Extraído de: (Gómez-Cebrián, 2023).

Los resultados de la Figura 13, mostraron una sobreexpresión de *LSM4* en estadios agresivos y metastásicos de la enfermedad y se correlacionó significativamente con una supervivencia global deficiente.

4.4 Expresión de *LSM4* en distintos modelos celulares de CaP

Con el objetivo de determinar los niveles de ARNm y proteína de *LSM4* en distintos modelos celulares de CaP, se llevó a cabo una RT-qPCR y un Western blot. En ambos casos, se analizaron líneas celulares de CaP (22rv1, LnCap, Du145 y PC3) comparándolas con la expresión de *LSM4* en células normales de próstata (RWPE-1).

Como se muestra en la Figura 14, los niveles de ARNm de *LSM4* fueron evaluados mediante RT-qPCR. Observándose una expresión significativa en las líneas celulares LnCap y 22rv1.

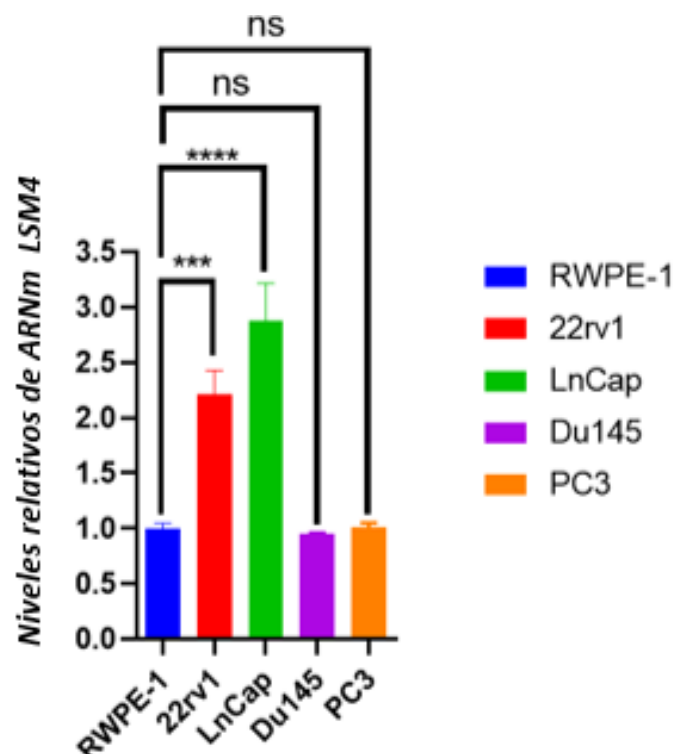


Figura 14: Expresión relativa de *LSM4* a nivel de ARNm en distintas líneas celulares de CaP respecto a la línea control. RT-qPCR, donde se representa la expresión relativa de *LSM4* a nivel de ARNm en células con CaP (22rv1, LnCap, Du145 y PC3) en comparación con células normales (RWPE-1). Los valores están expresados como la media \pm error estándar (ES). Análisis estadístico: *T-student*; **** p-value < 0.0001 y *** p-value < 0.001 frente al grupo de referencia.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en la RT-qPCR y posteriormente analizados estadísticamente, se muestran en la Figura 14, donde se obtuvo una sobreexpresión significativa de los niveles relativos de ARNm de *LSM4* en la línea celular 22rv1 y en la LnCap, mostrando en esta última línea la mayor expresión. Cabe destacar que, las dos líneas celulares con mayor expresión de *LSM4* son dependientes de andrógeno y la 22rv1 es una línea primaria de CaP. Este resultado puede indicar que *LSM4* podría tener una función relevante en el desarrollo temprano del CaP.

Por otro lado, para evaluar los niveles relativos de proteína *LSM4* en los distintos modelos celulares de CaP, se realizó un Western blot, utilizando GAPDH como control de carga. Como se muestra en la Figura 15, la línea celular de CaP con los mayores niveles relativos de *LSM4* a nivel de proteína era la 22rv1. Por otro lado, las líneas LnCap y PC3 muestran niveles inferiores a los del modelo celular control (RWPE-1).

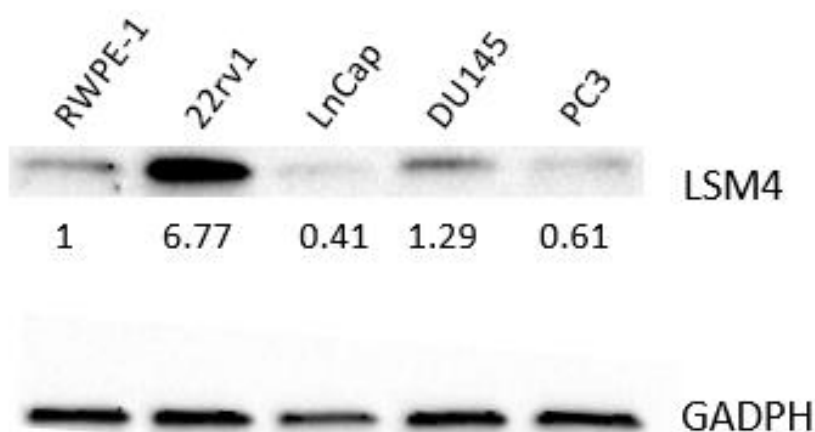


Figura 15: Niveles relativos de *LSM4* a nivel de proteína en distintos modelos celulares. Se representan los niveles de proteína de *LSM4* en células con CaP (22rv1, LnCap, Du145 y PC3) en comparación de células normales (RWPE-1). Utilizando GAPDH como control de carga. Los valores numéricos indican las intensidades de bandas normalizadas respecto a los niveles de proteína relativos del modelo celular control (RWPE-1).

A nivel de proteína, *LSM4* se mostró aumentado en las líneas celulares 22rv1 y DU145. A pesar de que los resultados de la RT-qPCR mostraron la expresión más significativa a nivel de ARNm en la línea celular LnCap, a nivel de proteína muestra menores niveles que la línea control de próstata. Esto puede ser debido a que la proteína se degrada con rapidez en esta línea celular de CaP, es decir, que no sea estable.

Estudios anteriores indican que las líneas celulares de CaP son muy heterogéneas entre sí, expresando proteínas exclusivas en cada una de ellas (Sardana et al., 2008), lo que sostiene nuestros resultados. En el estudio de Sardana et al., (2008) se compararon los perfiles metabólicos de las líneas celulares PC3, LnCap y 22rv1, observando solamente un 21% de proteínas comunes en las tres líneas celulares. Esto indica la importancia de investigar el CaP en múltiples líneas celulares para obtener un perfil completo del proteoma del CaP.

Por lo tanto, las diferencias entre los niveles de *LSM4* de ARNm y proteínas puede ser debido a lo mencionado anteriormente. Con los resultados obtenidos, se decidió seguir con la línea 22rv1 de CaP, ya que es la línea celular donde *LSM4* está sobreexpresado de forma más significativa tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína.

4.5 Modelo de silenciamiento de *LSM4*

Una vez identificada la línea celular de CaP con la que seguir trabajando, se generaron modelos de silenciamiento mediante distintos ARNsh lentivirales en la línea celular 22rv1, con el fin de estudiar el potencial de *LSM4* en CaP. Se utilizaron un control ARNsh (sh-C) y dos ARNsh (sh-8 y sh-11).

Para confirmar el silenciamiento de *LSM4* a nivel de ARNm y de proteína, se llevó a cabo, en primer lugar, una RT-qPCR. Como se observa en la Figura 16, las células infectadas con los vectores sh-8 y sh-11 presentan unos niveles de expresión de *LSM4* significativamente menores en comparación con el vector sh-C, con un silenciamiento del 91,87% y 96,7% respectivamente. Este silenciamiento fue mayor con el vector sh-11 en comparación con el sh-8, indicando una mayor eficiencia en este vector.

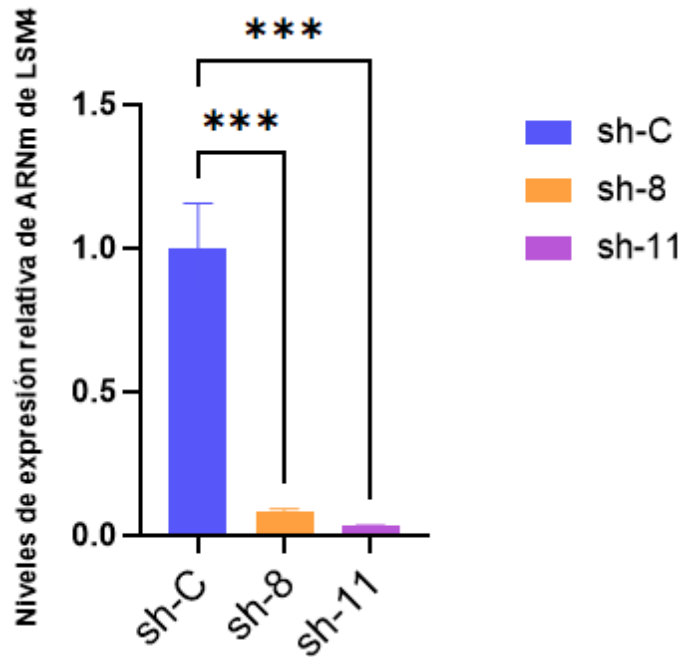


Figura 16: Expresión relativa ARNm de LSM4 en la línea celular 22rv1 después de haber silenciado mediante ARNsh lentivirales. Se representan los modelos celulares de silenciamiento (sh-8 y sh-11) en comparación con un modelo control (sh-C) después de la infección lentiviral. Los resultados de la RT-qPCR están expresados como la media \pm error estándar (ES). Análisis estadístico: *T-student*, *** p-value < 0.001 frente al grupo de referencia.

Posteriormente, para comprobar los niveles de silenciamiento de LSM4 a nivel de proteína, se realizó un Western blot. En este caso, solamente se analizó en el modelo de silenciamiento sh-8, debido a que el modelo celular silenciado con el vector sh-11 presentó un crecimiento muy lento y no se pudo sembrar a tiempo.

En la Figura 17 se observó que después de la inhibición con sh-8, los niveles de proteína de LSM4 habían disminuido en un 91,84% y 88,69% respecto al control en cada una de las réplicas biológicas.

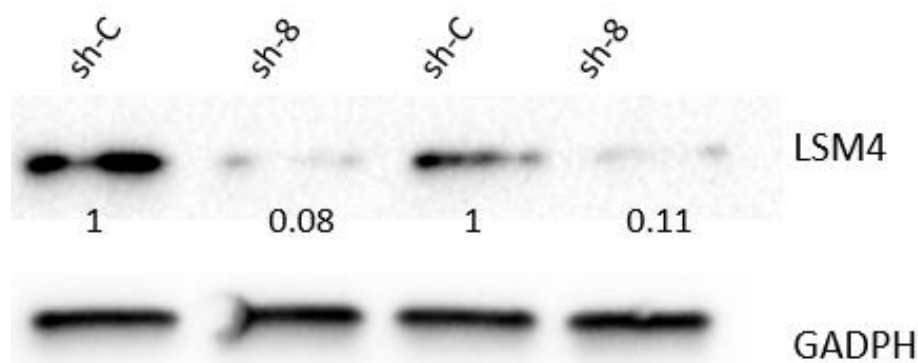


Figura 17: Niveles relativos de LSM4 en la línea celular 22rv1 después del silenciamiento mediante ARNsh mediado por lentivirus. Los valores numéricos indican la cuantificación de las intensidades de bandas normalizadas, expresando los niveles relativos de proteína entre el modelo control (sh-C) y el modelo de silenciamiento mediante el vector sh-8.

Los resultados obtenidos en la RT-qPCR y el Western blot coinciden, por lo tanto, se puede afirmar que el silenciamiento mediante el vector sh-8 inhibió de forma eficiente la expresión del gen tanto a nivel de proteína, como de ARNm. Además, los resultados indican que los vectores sh-8 y sh-11 muestran eficacia para la generación de modelos *knockdown* de *LSM4*, a pesar de que el ARNsh sh-11 no ha podido ser comprobado a nivel de proteína.

4.6 Capacidad proliferativa de modelos de silenciamiento respecto al modelo celular de CaP

4.6.1 Ensayo de formación de colonias

A continuación, una vez generado un modelo de silenciamiento eficaz en la línea celular 22rv1, se evaluó el efecto de *LSM4* en la capacidad clonogénica. Para esto, se realizó un ensayo de formación de colonias utilizando el modelo de silenciamiento sh-8 respecto al modelo sh-C.

Como se muestra en la Figura 18, las tres réplicas del modelo control han dado resultados similares, en cambio, las tres réplicas del modelo *knockdown* sh-8 muestran diferencias significativas a simple vista. En el modelo de silenciamiento sh-8, se puede observar que cada réplica tiene un número distinto de colonias (Figura 18). Por lo tanto, los resultados del ensayo de formación de colonias no son representativos, ya que se ha producido un error experimental en la siembra del modelo de silenciamiento sh-8.

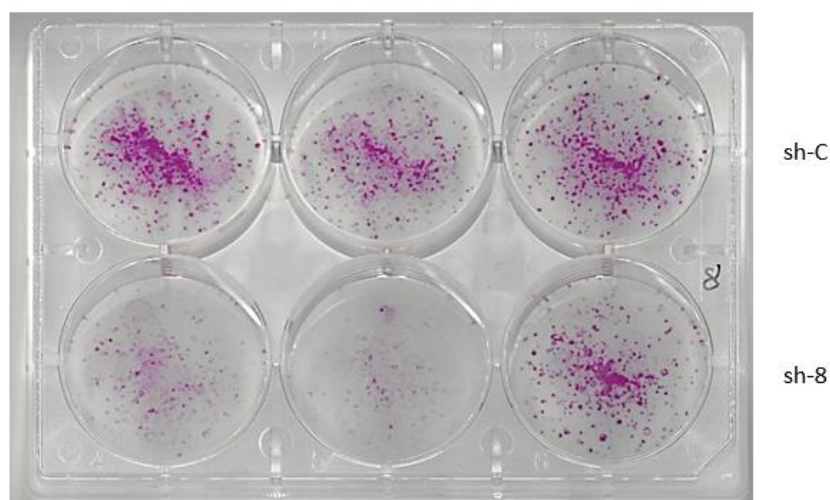


Figura 18: Ensayo de la capacidad de formación de colonias de la línea celular 22rv1 tras la inhibición de *LSM4*. Se ha realizado este ensayo con el modelo celular control y el modelo celular de silenciamiento con el vector sh-8. Los resultados obtenidos no son significativos, ya que se observa un error experimental en la siembra.

Debido a las diferencias observadas con respecto al número de colonias formadas entre las réplicas del modelo de silenciamiento de *LSM4* utilizando el vector sh-8, este ensayo se debería de volver a realizar para poder obtener resultados robustos en cuanto al efecto de la inhibición de *LSM4* en la capacidad clonogénica de las células 22rv1.

4.6.2 Ensayo de proliferación celular

Finalmente, para evaluar el efecto del silenciamiento de *LSM4* en la proliferación celular, se realizó un ensayo MTS, utilizando el modelo de silenciamiento sh-8 de la línea celular 22rv1 respecto al modelo sh-C.

En la Figura 19 se muestran los resultados de la proliferación a tiempo 0, 1 y 3 de los modelos sh-8 y sh-C. En esta figura se observa cómo no hay ninguna diferencia significativa en la proliferación relativa de ambos modelos, además, mostraron un crecimiento mínimo entre el día 0 y el día 3.

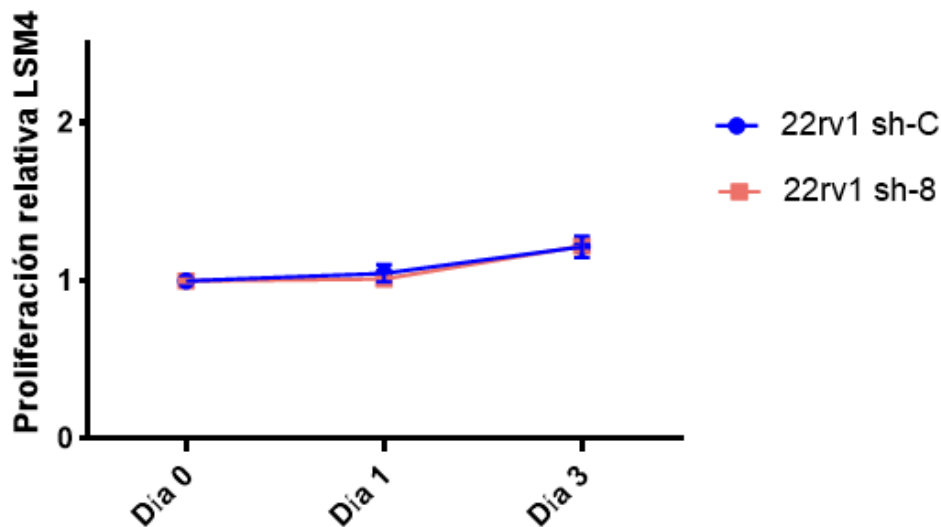


Figura 19: Ensayo MTS para evaluar la proliferación relativa de LSM4 en el modelo celular de silenciamiento frente al modelo control. Se realizó el ensayo MTS a tiempo 0, 1 y 3. Se muestran resultados entre la proliferación del modelo de silenciamiento sh-8 frente al sh-C no significativos, ya que las diferencias en la proliferación son mínimas debido a una siembra de células menor a la necesaria.

El ensayo se diseñó tal y como se indica en el punto 3.5 del apartado de material y métodos, pero tras el tercer día de ensayo, se observó un número muy reducido de células, dando a entender que no se sembraron el número adecuado de células, como consecuencia se interrumpió el estudio al tercer día, dando resultados no significativos. Una posible explicación se debe a que el protocolo utilizado en este trabajo pertenece a células metastásicas, las cuales poseen una mayor capacidad proliferativa que las utilizadas en este estudio.

Por lo tanto, este ensayo se debería repetir sembrando un mayor número de células y añadiéndole un tiempo más de medición, para finalmente poder obtener resultados más sólidos y finalmente encontrar la siembra óptima en esta línea celular.

5 CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este estudio son las siguientes:

1. Las funciones más relevantes de LSM4 se han visto relacionadas con procesos de desarrollo y proliferación en el cáncer, por lo tanto, LSM4 presenta potencial como diana terapéutica para el tratamiento de CaP.
2. La evaluación de la *druggability* de LSM4, ha indicado que la actividad de LSM4 podría ser susceptible a ser modulada por un fármaco debido a su tamaño, la cavidad de unión predicha para ligando y la estructura 3D.
3. LSM4 se ha visto sobreexpresado en pacientes con CaP respecto a individuos sanos, así como también en distintos modelos celulares de CaP con respecto al modelo celular control, lo que indica su importancia en el cáncer. En concreto, la línea celular 22rv1 presenta niveles más elevados de LSM4 a nivel de ARNm y proteína.
4. El vector sh-8 ha mostrado tener una elevada eficiencia para inhibir el gen *LSM4* tanto a nivel de ARNm como de proteína en la línea celular 22rv1.
5. No ha sido posible evaluar el efecto de LSM4 en la capacidad proliferativa del modelo celular de CaP.

6 LÍNEAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que LSM4 podría ser considerada una potencial diana terapéutica para el CaP. En este contexto, se debería seguir evaluando la capacidad proliferativa, clonogénica y de migración en el modelo celular 22rv1 tras el silenciamiento de *LSM4* utilizando el vector sh-8. Estos estudios se podrían realizar mediante ensayos MTS de proliferación, ensayos de formación de colonias y de cicatrización de herida.

Por otro lado, para futuros proyectos se podrían generar modelos de silenciamiento en líneas celulares de CaP en estadios avanzados, con el objetivo de evaluar el efecto de LSM4 en la progresión del CaP.

En cuanto a la enzima PRMT5, debido a su relación con la tumorigénesis prostática y su sobreexpresión en tejidos premalignos de la próstata, observados en otros estudios, se podrían generar modelos de silenciamiento en líneas celulares de CaP, con el objetivo de evaluar su interacción al metilar los grupos RG/RGG de LSM4 y su involucración en CaP. A su vez, PRMT5 podría ser una forma de abordar indirectamente a LSM4 impidiendo su interacción y analizando su implicación en la tumorigenicidad y desarrollo del CaP.

Los resultados obtenidos en los futuros proyectos podrían confirmar el potencial de LSM4 como diana terapéutica e incluso identificar proteínas o enzimas que interaccionan con LSM4, como PRMT5, para desarrollar terapias alternativas mediante el abordaje de estas proteínas.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Arribas-Layton, M., Dennis, J., Bennett, E. J., Damgaard, C. K., & Lykke-Andersen, J. (2016). The C-Terminal RGG Domain of Human Lsm4 Promotes Processing Body Formation Stimulated by Arginine Dimethylation. *Molecular and Cellular Biology*, 36(17), 2226-2235. <https://doi.org/10.1128/mcb.01102-15>
- Behan, F. M., Iorio, F., Picco, G., Gonçalves, E., Beaver, C. M., Migliardi, G., Santos, R., Rao, Y., Sassi, F., Pinnelli, M., Ansari, R., Harper, S., Jackson, D. A., McRae, R., Pooley, R., Wilkinson, P., van der Meer, D., Dow, D., Buser-Doepner, C., ... Garnett, M. J. (2019). Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature*, 568(7753), 511-516. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1103-9>
- Brahms, H., Meheus, L., De Brabandere, V., Fischer, U., & Luhrmann, R. (2001). *with the SMN protein protein B/B' and the Sm-like protein LSM4, and their interaction Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm.* <http://www.rnajournal.org/subscriptions/>
- Brown, K. K., Hann, M. M., Lakdawala, A. S., Santos, R., Thomas, P. J., & Todd, K. (2018). Approaches to target tractability assessment-a practical perspective. En *MedChemComm* (Vol. 9, Número 4, pp. 606-613). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7md00633k>
- Catalá, R., Carrasco-López, C., Perea-Resa, C., Hernández-Verdeja, T., & Salinas, J. (2019). Emerging roles of lsm complexes in posttranscriptional regulation of plant response to abiotic stress. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00167>
- Chang, A. J., Autio, K. A., Roach, M., & Scher, H. I. (2014). High-risk prostate cancer-Classification and therapy. En *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 11, Número 6, pp. 308-323). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.68>
- Chen, L., Lin, Y. H., Liu, G. Q., Huang, J. E., Wei, W., Yang, Z. H., Hu, Y. M., Xie, J. H., & Yu, H. Z. (2022). Clinical Significance and Potential Role of LSM4 Overexpression in Hepatocellular Carcinoma: An Integrated Analysis Based on Multiple Databases. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.804916>

- Chen, L., Zhang, Y. H., Wang, S. P., Zhang, Y. H., Huang, T., & Cai, Y. D. (2017). Prediction and analysis of essential genes using the enrichments of gene ontology and KEGG pathways. *PLoS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184129>
- Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A., & Asadullah, K. (2011). What makes a good drug target? En *Drug Discovery Today* (Vol. 16, Números 23-24, pp. 1037-1043). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.007>
- Gómez-Cebrián, N. (2023). *Characterization of the metabolic profile and identification of potencial therapeutic targets in advanced prostate cancer patients* [Tesis Doctoral en Biomedicina y Biotecnología, Universitat de València]. RODERIC-Universitat de València.
- Gu, Z., Li, Y., Lee, P., Liu, T., Wan, C., & Wang, Z. (2012). Protein arginine methyltransferase 5 functions in opposite ways in the cytoplasm and nucleus of prostate cancer cells. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044033>
- Haffner, M. C., Zwart, W., Roudier, M. P., True, L. D., Nelson, W. G., Epstein, J. I., de Marzo, A. M., Nelson, P. S., & Yegnasubramanian, S. (2021). Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. En *Nature Reviews Urology* (Vol. 18, Número 2, pp. 79-92). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00400-w>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. En *Cancer Discovery* (Vol. 12, Número 1, pp. 31-46). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. En *Cell* (Vol. 100).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. En *Cell* (Vol. 144, Número 5, pp. 646-674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Horvathova, I., Voigt, F., Kotrys, A. V., Zhan, Y., Artus-Revel, C. G., Eglinger, J., Stadler, M. B., Giorgetti, L., & Chao, J. A. (2017). The Dynamics of mRNA Turnover Revealed by Single-Molecule Imaging in Single Cells. *Molecular Cell*, 68(3), 615-625.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.030>

- Hou, W., & Zhang, Y. (2021). Circ_0025033 promotes the progression of ovarian cancer by activating the expression of LSM4 via targeting miR-184 . *Pathology, research and practice*, 217.
- Hubstenberger, A., Courel, M., Bénard, M., Souquere, S., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., Yi, Z., Morlot, J. B., Munier, A., Fradet, M., Daunesse, M., Bertrand, E., Pierron, G., Mozziconacci, J., Kress, M., & Weil, D. (2017). P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Molecular Cell*, 68(1), 144-157.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.003>
- Jeon, P., Ham, H. J., Park, S., & Lee, J. A. (2022). Regulation of Cellular Ribonucleoprotein Granules: From Assembly to Degradation via Post-translational Modification. En *Cells* (Vol. 11, Número 13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11132063>
- Karantanos, T., Corn, P. G., & Thompson, T. C. (2013). Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: Mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. En *Oncogene* (Vol. 32, Número 49, pp. 5501-5511). <https://doi.org/10.1038/onc.2013.206>
- Kim, H., & Ronai, Z. A. (2020). PRMT5 function and targeting in cancer. En *Cell Stress* (Vol. 4, Número 8, pp. 199-215). Shared Science Publishers OG. <https://doi.org/10.15698/cst2020.08.228>
- Lavalée, M., Curdy, N., Laurent, C., Fournié, J. J., & Franchini, D. M. (2021). Cancer cell adaptability: turning ribonucleoprotein granules into targets. En *Trends in Cancer* (Vol. 7, Número 10, pp. 902-915). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.05.006>
- Li, W., Li, X., Gao, L. N., & You, C. G. (2020). Integrated Analysis of the Functions and Prognostic Values of RNA Binding Proteins in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00185>
- Lin, A., & Sheltzer, J. M. (2020). Discovering and validating cancer genetic dependencies: approaches and pitfalls. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 21, Número 11, pp. 671-682). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0247-7>

- Lin, Y., Saurabh, M., Hande, K.-M., Turner, J. P., Vidovic, D., Forlin, M., Koleti, A., Nguyen, D. T., Jensen, L. J., Guha, R., Mathias, S. L., Ursu, O., Stathias, V., Duan, J., Nabizadeh, N., Chung, C., Mader, C., Visser, U., Yang, J. J., ... Schürer, S. C. (2017). Drug target ontology to classify and integrate drug discovery data. *Journal of Biomedical Semantics*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13326-017-0161-x>
- Liu, J. qing, & Li, T. (2019). CRISPR-Cas9-mediated loss-of-function screens. *Frontiers in Life Science*, 12(1), 1-13. <https://doi.org/10.1080/21553769.2019.1670739>
- Mottet, N., van den Bergh, R. C. N., Briers, E., van den Broeck, T., Cumberbatch, M. G., de Santis, M., Fanti, S., Fossati, N., Gandaglia, G., Gillissen, S., Grivas, N., Grummet, J., Henry, A. M., van der Kwast, T. H., Lam, T. B., Lardas, M., Liew, M., Mason, M. D., Moris, L., ... Catto, J. (2020). *EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent*. <https://doi.org/10.1016/j>
- Nguyen-Nielsen, M., & Borre, M. (2016). Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. En *Seminars in Nuclear Medicine* (Vol. 46, Número 6, pp. 484-490). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.07.002>
- Pitchiaya, S., Mourao, M. D. A., Jalihal, A. P., Xiao, L., Jiang, X., Chinnaiyan, A. M., Schnell, S., & Walter, N. G. (2019). Dynamic Recruitment of Single RNAs to Processing Bodies Depends on RNA Functionality. *Molecular Cell*, 74(3), 521-533.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.001>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I., & Overington, J. P. (2016). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 19-34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>
- Sardana, G., Jung, K., Stephan, C., & Diamandis, E. P. (2008). Proteomic analysis of conditioned media from the PC3, LNCaP, and 22Rv1 prostate cancer cell lines: Discovery and validation of candidate prostate cancer biomarkers.

Journal of Proteome Research, 7(8), 3329-3338.
<https://doi.org/10.1021/pr8003216>

Schuster, A., Erasmus, H., Fritah, S., Nazarov, P. V., van Dyck, E., Niclou, S. P., & Golebiewska, A. (2019). RNAi/CRISPR Screens: from a Pool to a Valid Hit. En *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Número 1, pp. 38-55). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.002>

Sekhoacha, M., Riet, K., Motloug, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. En *Molecules* (Vol. 27, Número 17). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/molecules27175730>

Shalem, O., Sanjana, N. E., & Zhang, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. En *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, Número 5, pp. 299-311). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3899>

Streicher, K. L., Yang, Z. Q., Draghici, S., & Ethier, S. P. (2007). *Transforming function of the LSM1 oncogene in human breast cancers with the 8p11-12 amplicon.*

Ta, H. D. K., Wang, W. J., Phan, N. N., Ton, N. T. A., Anuraga, G., Ku, S. C., Wu, Y. F., Wang, C. Y., & Lee, K. H. (2021). Potential therapeutic and prognostic values of lsm family genes in breast cancer. *Cancers*, 13(19).
<https://doi.org/10.3390/cancers13194902>

Verma, B., Akinyi, M. v., Norppa, A. J., & Frilander, M. J. (2018). Minor spliceosome and disease. En *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 79, pp. 103-112). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.036>

Watson, P. M., Miller, S. W., Fraig, M., Cole, D. J., Watson, D. K., & Boylan, A. M. (2008). CaSm (LSm-1) overexpression in lung cancer and mesothelioma is required for transformed phenotypes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(6), 671-678. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0205OC>

Xue, R., Hua, L., Xu, W., Gao, Y., Pang, Y., & Hao, J. (2018). Derivation and validation of the potential core genes in pancreatic cancer for tumor-stroma crosstalk. *BioMed Research International*, 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/4283673>

- Yang, H., Beutler, B., & Zhang, D. (2022). Emerging roles of spliceosome in cancer and immunity. En *Protein and Cell* (Vol. 13, Número 8, pp. 559-579). Higher Education Press Limited Company. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00856-5>
- Yin, J., Lin, C., Jiang, M., Tang, X., Xie, D., Chen, J., & Ke, R. (2021). CENPL, ISG20L2, LSM4, MRPL3 are four novel hub genes and may serve as diagnostic and prognostic markers in breast cancer. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95068-6>
- Zhang, D., Hu, Q., Ji, Y., Chao, H.-P., Tracz, A., Kirk, J., Buonamici, S., Zhu, P., Wang, J., Liu, S., & Tang, D. G. (2019). Dysregulated Alternative Splicing Landscape Identifies Intron Retention as a Hallmark and Spliceosome as a Therapeutic Vulnerability in Aggressive Prostate Cancer. *bioRxiv*.