

# **TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**



## **ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEINAS IMPLICADAS EN PLASTICIDAD EPITELIAL DURANTE LA PROGRESIÓN TUMORAL DE CARCINOMAS**

## **ANÁLISE E CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS NA PLASTICIDADE EPITELIAL DURANTE A PROGRESIÓN TUMORAL DE CARCINOMAS**

## **ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF PROTEINS INVOLVED IN EPITHELIAL PLASTICITY DURING CARCINOMAS TUMOR PROGRESSION**

**Alumna: M<sup>a</sup> Gloria Alfonsín Rey**

**Tutora: Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvís.**

**Curso:2020/2021**

**Máster en Biología Molecular, Celular y Genética**



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

## Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>4</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Las uniones adherentes.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Uniones adherentes: E-cadherina.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Uniones adherentes: moléculas de interacción con E-cadherina.....</b>	<b>7</b>
<b>2. La transición epitelio-mesénquima.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Hakai: Función y estructura .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Hakai: regulación de la progresión tumoral independiente de E-cadherina</b>	<b>11</b>
<b>4. Los carcinomas.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 El cáncer de próstata.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Adenocarcinomas prostáticos: incidencia y factores de riesgo.....</b>	<b>12</b>
<b>4.3 Adenocarcinomas prostáticos: histología y determinación bioquímica...</b>	<b>13</b>
<b>4.4 Histología prostática.....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Revisión bibliográfica.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Cultivo celular.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Transfección.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Extracción y cuantificación de proteína.....</b>	<b>16</b>
<b>5. Western Blot.....</b>	<b>16</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Análisis de proteínas identificadas como posibles dianas de Hakai con expresión diferencial en células prostáticas sanas y tumorales. ....</b>	<b>17</b>
<b>2. Determinación de la expresión de Hakai en distintas líneas celulares de próstata.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Caracterización de la línea celular PC-3 .....</b>	<b>23</b>
<b>4. Determinación de la capacidad de la línea PC-3 para sobreexpresar Hakai.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Determinación de la capacidad de la línea PC-3 para silenciar la expresión de Hakai.....</b>	<b>25</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>26</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>28</b>

**Bibliografía..... 29**

## **Resumen**

La mayor parte de los tumores son carcinomas que surgen como consecuencia de la alteración del fenotipo epitelial. En estadios tempranos de la progresión tumoral, uno de los tiene lugar un proceso denominado transición epitelio-mesénquima (TEM) caracterizado por la pérdida de este fenotipo epitelial como consecuencia la destrucción de las uniones adherentes, un tipo de uniones entre células adyacentes implicado no sólo en el mantenimiento de la arquitectura tisular sino también en la señalización intracelular.

La pérdida de la proteína E-cadherina en las uniones adherentes es un marcador estadios tempranos de la progresión tumoral. Uno de los mecanismos implicados en la degradación de la E-cadherina es a través de la acción de la proteína Hakai, una E3 ubiquitina-ligasa que se asocia a residuos de tirosina (Y) de la E-cadherina fosforilada por la quinasa Src, y que en consecuencia induce su ubiquitinación y posterior degradación. La pérdida de estas uniones es un marcador del proceso de TEM en que las células epiteliales pierden la polaridad apico-basal, adquieren capacidad migratoria e invasiva activándose el proceso de progresión tumoral.

Uno de los carcinomas más frecuentes entre la población masculina es el adenocarcinoma acinar de próstata, con una ratio de mortalidad asociada que lo sitúa como el quinto más letal entre los varones. Sintomatológicamente, se caracteriza por la ausencia de síntomas claros motivo por el cual se suele detectar ya en estados metastáticos. Se ha descrito extensamente el papel de la TEM en cáncer de próstata, sin embargo, se conoce poco el papel de Hakai en la progresión tumoral de este tipo de cáncer. En este trabajo se pretende determinar el posible papel de Hakai en cáncer de próstata.

## **Resumo**

A maior parte dos tumores son adenocarcinomas que surden como consecuencia da alteración do fenotipo epitelial. Un dos rasgos máis caraterísticos da perda deste fenotipo é a destrución das unións adherentes, un tipo de asociación entre células adxacentes implicado non só no mantemento da arquitectura tisular senon na sinalización intracelular.

A perda de E-cadherina nas unións adherentes é un marcador da perda destas unións. Un dos mecanismos implicados na degradación da E-cadherina é a través da acción da proteína Hakai, unha E3-ubiquitina ligasa que se asocia a residuos de tirosina (Y) da E-

cadherina fosforilados pola quinasa Src e en consecuencia induce a súa ubiquitinación e posterior degradación. A perda destas unións é un marcador do proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) no que as células epiteliais perden a polaridade apico-basal, adquiren capacidade migratoria e invasiva activándose o proceso de progresión tumoral.

Un dos carcinomas máis frecuentes entre a poboación masculina é o adenocarcinoma acinar de próstata, cunha ratio de mortalidade asociada que o sitúa como o quinto máis letal entre os homes. Sintomatolóxicamente, caracterízase pola ausencia de síntomas claros motivo polo cal se soe detectar en estadios metastáticos. Describiuse de forma extensa o papel da TEM no cancro de próstata. Non obstante, coñécese pouco sobre o papel de Hakai na progresión tumoral deste tipo de cancro. Neste traballo preténdese determinar o posible papel de Hakai no cancro de próstata.

### **Summary**

Most of the tumors are carcinomas that arise as a consequence of the alteration of the epithelial phenotype. At early stages of tumor progression, one of the most characteristic features that takes place is a process named epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) characterized by the loss of the epithelial phenotype as a consequence of the destruction of adherent junctions, a type of junction between adjacent cells involved not only in the maintenance of tissue architecture but also in intracellular signaling.

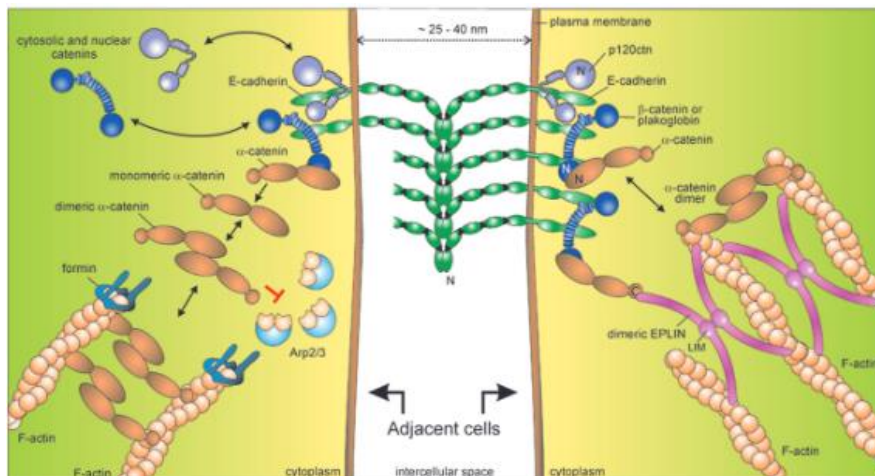
Loss of the E-cadherin protein at adherent junctions is a hallmark of early stages of tumor progression. One of the mechanisms involved in the degradation of E-cadherin is through the action of the Hakai protein, an E3 ubiquitin-ligase that is associated with tyrosine (Y) residues of E-cadherin phosphorylated by Src kinase, and consequently induces its ubiquitination and subsequent degradation. The loss of these junctions is a marker of the EMT process in which epithelial cells lose their apico-basal polarity, acquire migratory and invasive capacity, activating the process of tumor progression.

One of the most frequent carcinomas among the male population is acinar adenocarcinoma of the prostate, with an associated mortality rate being the fifth most lethal cancer disease in men. Prostate cancer is characterized by the absence of clear symptoms, which is why it is usually detected in metastatic states. The role of the EMT in prostate cancer has been extensively described, however, little is known about Hakai's role in the tumor progression of this type of cancer. This work aims to determine the potential role of Hakai in prostate cancer.

## Introducción

### 1. Las uniones adherentes

Las uniones adherentes se establecen en la región subapical de la célula. Además de este, existen otros dos tipos de uniones entre las células, las uniones estrechas en la región apical y los desmosomas en la basolateral. Sin embargo, las uniones adherentes se han revelado como la forma de contacto entre células epiteliales más importante dada su capacidad para transmitir estímulos (Aparicio *et al.*, 2012). Además, este tipo de uniones media la regulación del citoesqueleto de actina y la regulación de procesos transcripcionales. Este tipo de uniones está mediado por unas proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  llamadas E-cadherinas, así como por miembros de la familia de las cateninas: p120catenina,  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina. En conjunto, estas cuatro proteínas forman las uniones adherentes (Fig. 1) (Hartsock *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Uniones adherentes. Asociaciones entre células epiteliales mediadas por E-cadherina y cateninas. Figura obtenida de van Roy *et al.*, (2008).

#### 1.1 Uniones adherentes: E-cadherina

Las cadherinas son proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  implicadas en el establecimiento de las uniones célula-célula. La E-cadherina es una cadherina de tipo I. Se trata de una glicoproteína de 728 residuos aminoácidos (aa) con único dominio transmembrana. La región extracelular, de 550aa se compone de 5 dominios cadherina extracelulares (EC) (van Roy *et al.*, 2008). A través de ellos se establecen las conexiones con la célula epitelial adyacente. Para que esta interacción sea eficiente se necesita la asociación de cada uno

de los EC con  $\text{Ca}^{2+}$  (Hartsock *et al.*, 2008). Además, el dominio EC5 presenta cuatro residuos de cisteína altamente conservados implicados en el establecimiento de puentes disulfuro, claves en el establecimiento de las uniones. El dominio citoplásmico, de 150aa, está compuesto por dos subdominios: el dominio juxtamembrana (JMD) al que se une p120 catenina y el dominio de unión a catenina (CBD) altamente conservados (van Roy *et al.*, 2008). Además, presenta una región en C-terminal a donde se une la  $\beta$ -catenina. Este dominio es el encargado de regular los procesos de endocitosis y degradación, señalización intracelular y regulación de la transcripción además de la regulación del citoesqueleto de actina.

La E-cadherina es la proteína central de las uniones adherentes jugando un papel clave al permitir la asociación de las cateninas. Por medio de la unión a las cateninas, la E-cadherinas establece contacto con el citoesqueleto y con diversas rutas de señalización (Hartsock *et al.*, 2008).

## **1.2 Uniones adherentes: Moléculas de interacción con la E-cadherina**

La E-cadherina establece contacto con 3 proteínas de la familia de las cateninas: p120 catenina,  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina.

La p120 catenina es un sustrato de la tirosina quinasa Src. Su unión a E-cadherina se establece a través de la secuencia YDEEGGGE de JMD. Esta unión es esencial para la estabilización de las uniones adherentes y su ausencia se asocia con aumento de la capacidad de invasión y progresión tumoral (Hartsock *et al.*, 2008). Src fosforila dos residuos de tirosina (Y) localizados inmediatamente antes de la secuencia de unión de p120 catenina a E-cadherina impidiendo la unión entre estas dos moléculas. Esto permite la unión de la E3-ubiquitina ligasa Hakai a la E-cadherina (van Roy *et al.*, 2008). Esta interacción se asocia con un incremento en los niveles de E-cadherina endocitada y ubiquitinizada.

La  $\beta$ -catenina se une a la región c-terminal del dominio citoplasmático de la E-cadherina. La unión entre la  $\beta$ -catenina y la E-cadherina se produce a nivel del retículo endoplásmico (RE) siendo necesaria para la exportación de la E-cadherina a la membrana. Esta unión también está regulada por fosforilación. La fosforilación de 3 residuos de serina (S) por GSK-3 $\beta$  determina un incremento de la afinidad de unión entre ambas proteínas.

Antagónicamente, la fosforilación de ciertos residuos de Y en la secuencia de la  $\beta$ -catenina impide su unión con la E-cadherina y reduce su afinidad con  $\alpha$ -catenina. Src es también una de las quinasas implicadas en la fosforilación de los residuos de Y de la  $\beta$ -catenina.

La  $\beta$ -catenina está sometida a un fuerte control proteolítico de tal modo que sus niveles citoplásmicos suelen ser bajos. En caso contrario la  $\beta$ -catenina iría al núcleo donde induciría la transcripción de los genes de la ruta de Wnt relacionados con proliferación celular.

La  $\alpha$ -catenina es la encargada de unir al complejo E-cadherina- $\beta$ -catenina al citoesqueleto de actina por medio de su unión a la  $\beta$ -catenina y a la actina. La  $\alpha$ -catenina también puede interactuar con el complejo Arp2/3 impidiendo la polimerización de la actina (Hartsock *et al.*, 2008).

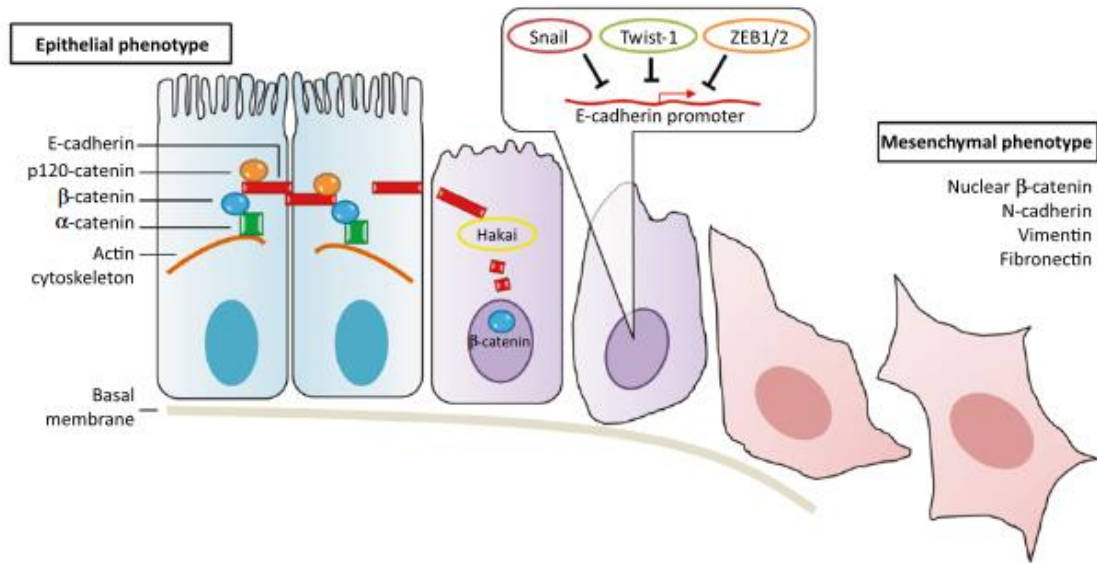
## **2 La transición epitelio mesénquima**

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso por el cual una célula epitelial sufre una serie de cambios bioquímicos que la llevan a adquirir las características de una célula mesenquimal. El fenotipo mesenquimal se caracteriza por la pérdida de la polaridad apical-basal, los contactos células-célula, la reorganización del citoesqueleto de actina y la expresión alterada de ciertos miRNAs. Estas características mesenquimales se relacionan a su vez con capacidad de migración, invasión, resistencia a apoptosis e incremento de la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular (Kalluri *et al.*, 2009; Aparicio *et al.*, 2013). Estas alteraciones se relacionan con las etapas iniciales de un proceso metastático y en muchas ocasiones se pueden emplear como biomarcadores de TEM. A este respecto destacan la reducción en los niveles de expresión de E-cadherina, así como el incremento de N-cadherina, el intercambio de citoqueratinas por vimentina o el incremento de la cantidad de  $\beta$ -catenina en el núcleo (Aparicio *et al.*, 2013).

Existen tres tipos de TEM en base al contexto en que se produzca la transición: (1) La TEM asociada a desarrollo embrionario, (2) la TEM asociada a regeneración tisular tras una lesión y (3) la TEM asociada a tumores (Kalluri *et al.*, 2009). Esta última ligada a las etapas iniciales de los procesos metastáticos (Aparicio *et al.*, 2013).



Durante la TEM la E-cadherina se encuentra fuertemente regulada por los factores transcripcionales como son Snail, Slug, Twist, ZEB1 y ZEB2 capaces de unirse al promotor génico e impedir la expresión. Asimismo, regulaciones post-traduccionales afectan al nivel de expresión de esta proteína. Destacan sobre todo la glicosilación, la fosforilación y la degradación proteolítica (Fig. 2). (Aparicio *et al.*, 2013).



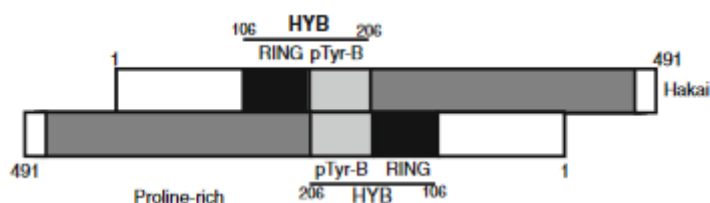
**Figura 2.** La TEM se caracteriza por el cambio de morfología de una célula que pasa de epitelial a mesenquimal. en esta transición destaca especialmente la pérdida de E-cadherina determinada por la inhibición de su expresión mediante factores de transcripción como Snail, Twist-1 o ZEB1/2 que se unen a la región promotora o mediante modificaciones post-traduccionales como la degradación proteolítica mediada por Hakai. Figura obtenida de Aparicio *et al.*, (2013).

### 3. Hakai: Función y estructura.

Hakai es una E3 ubiquitina-ligasa codificada por el gen CBL1. Se caracteriza por su capacidad de degradar la E-cadherina e impedir su reciclaje lo que provoca la destrucción de las uniones adherentes. Hakai marca a esta molécula de membrana determinando su procesamiento por vía lisosomal. En este proceso participan dos GTPasas de la familia

Rab: Rab5 y Rab7. La primera está implicada en la movilización de la E-cadherina desde la membrana hacia el interior celular mientras que la segunda se relaciona con la transformación de los endosomas en lisosomas y la consecuente degradación del contenido proteico.

Hakai, identificada mediante el sistema de doble híbrido de levaduras, está constituida por dos monómeros antiparalelos cada uno de los cuales presenta: (1) un dominio dedo RING, (2) un dominio de unión a Y fosforilada que deriva de un dominio de homología con Src (SH2) y (3) un dominio rico en prolina (Fig. 3). Entre los dos primeros se forma una hélice  $\alpha$  clave para llevar a cabo su función.



**Figura 3.** Hakai está constituido por dos monómeros antiparalelos cada uno de los cuales consta de un dominio RING, un dominio de reconocimiento de Y fosforiladas y un dominio rico en prolinas. Figura obtenida de Aparicio *et al.*, (2013).

Hakai reconoce secuencias específicas de proteínas con residuos de Y fosforilados. De este modo es capaz de reconocer E-cadherina e inducir su ubiquitinación. Hakai interacciona con el dominio JMD de la E-cadherina.

Hakai reconoce dianas específicas con residuos de Y fosforilados, entre ellas E-cadherina. No obstante, la asociación de E-cadherina con Hakai implica la disociación de la primera de p120catenina pues la unión de esta con la E-cadherina además de estabilizar las uniones celulares adherentes, enmascara el sitio de unión de la ubiquitina ligasa.

La p120 catenina interacciona con E-cadherina a través del dominio JMD en donde se encuentran 3 residuos de Y uno de ellos conservado en todas las familias de cadherina mientras que los otros dos son exclusivos de la E-cadherina (Aparicio *et al.*, 2012). La quinasa Src, más activa a valores de pH ácidos fosforila estos residuos de Y determinando la pérdida de afinidad de la p120 catenina por la E-cadherina. Esta alteración post-traducciona permite la unión de Hakai y la destrucción de las uniones adherentes. Además, Src también puede fosforilar a p120 catenina. Esto supone una degradación aún

más rápida de las uniones celulares favoreciendo la progresión tumoral (Cheng *et al.*, 2009).

Además, de las fosforilaciones, la interacción entre Hakai y E-cadherina está favorecida por la presencia de una serie de residuos ácidos adyacentes a la secuencia de Y, la secuencia YDEEGGGE (Aparicio *et al.*, 2012, Hartsock *et al.*, 2008).

### **3.1 Hakai: regulación de la progresión tumoral independiente de E-cadherina.**

El papel de Hakai como factor promotor de la carcinogenicidad por medio de la destrucción de uniones adherentes por marcaje de la E-cadherina para su degradación proteolítica es bien conocido. No obstante, Hakai también puede regular los procesos de progresión tumoral de un modo independiente de ubiquitinación. Ejemplo de ello es su acción sobre el factor de procesamiento asociado a PTB (PSF).

PSF es una proteína nuclear relacionada con regulación transcripcional, procesamiento de pre mARN, retención de ARN en el núcleo y relajación de ADN. Algunos estudios han demostrado que la sobreexpresión de Hakai, común en tejidos tumorales, se relaciona con una mayor asociación de PSF con sus dianas. Entre ellas mARNs relacionados con progresión tumoral, angiogénesis o regulación del citoesqueleto. Esto determina un incremento de la capacidad proliferativa de las células. Paralelamente, la inhibición de Hakai supone la no asociación entre PSF y sus sustratos.

Además, la inhibición de PSF supone una reducción de la capacidad de proliferación de las células tumorales con sobreexpresión de Hakai. Esto confirma la existencia de otra vía de regulación de la progresión tumoral mediada por Hakai, independiente de E-cadherina (Figuroa *et al.*, 2009).

## **4. Los carcinomas**

Los carcinomas son el resultado transformaciones en células epiteliales a través de las cuales las células adquieran una mayor capacidad proliferativa, de invasión y migración al mismo tiempo que sufren una alteración en sus características morfológicas destacando la pérdida de contactos entre células como consecuencia de la pérdida de E-cadherina (Pérez-Moreno *et al.*, 2003).

#### **4.1 El carcinoma de próstata**

El cáncer de próstata se origina a consecuencia de la proliferación aberrante de células epiteliales, dando lugar a la pérdida de la arquitectura del epitelio normal de la próstata y la adquisición de capacidades migratorias e invasivas de las células cancerosas en el espacio luminal del epitelio normal de las glándulas. A partir de esta lesión pre-neoplásica, el epitelio prostático puede adquirir propiedades que evitan la dependencia de andrógenos, y aumentan el potencial metastático.

#### **4.2 Adenocarcinomas prostáticos: incidencia y factores de riesgo**

Los adenocarcinomas prostáticos constituyen el segundo tipo de cáncer más común entre la población masculina a nivel mundial y el quinto en cuanto a tasas de mortalidad asociadas (WHO Urología, 2012). Dentro de estos los adenocarcinomas acinares se corresponden con el 95% de los tumores prostáticos (Bostwick, 2008).

Se trata de una patología tumoral con una incidencia variable siendo está más elevada entre la población americana, especialmente la afroamericana, aunque también entre la australiana y ciertos países europeos como Dinamarca o España. Por el contrario, la población asiática es la que tiene una incidencia menor de esta enfermedad. De un modo similar las ratios de mortalidad asociadas a este tipo tumoral son mayores entre las poblaciones de raza negra (WHO Urología, 2012).

La incidencia de esta patología aumenta de forma exponencial a partir de los 40 años. A pesar de los avances en las pruebas de detección de esta patología, la ausencia de una sintomatología clara dificulta la identificación de este tipo de tumores. De tal modo que en la mayoría de los casos se descubren en estadios muy avanzados asociados a procesos metastáticos en otras regiones corporales (Bostwick, 2008). De este modo, un 30% de los fallecidos de entre 30-50 años en EE. UU. presentaban este tipo de tumor (WHO Urología, 2012). Por otra parte, con los conocimientos actuales todavía es muy complicado predecir el modo de evolución de la enfermedad, así como el riesgo individual de padecer la enfermedad (Bostwick, 2008).

Entre los factores de riesgo que determinan una mayor incidencia de la enfermedad se encuentran: (1) la herencia genética siendo el riesgo muy superior cuando un familiar de primer orden ha padecido también la enfermedad; (2) la regulación hormonal, un aumento

en los niveles de testosterona y dihidrotestosterona suponen un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad; (3) la edad y el estrés oxidativo pues parece establecerse una relación causal entre incremento del estrés oxidativo y el incremento de la incidencia de la enfermedad (Bostwick, 2008).

### 4.3 Adenocarcinomas prostáticos.

Histológicamente, el carcinoma prostático se puede detectar por cambios en la morfología acinar, ovalada en tejidos sanos, volviéndose cada vez más redondeada conforme progresa el tumor (Fig.4). Además, se detecta una pérdida de colágeno y músculo liso (Bostwick, 2008). Otra de las características de los adenocarcinomas prostáticos es la presencia de células tumorales con morfología alterada, estructuras cristalinas de morfologías geométricas y carácter eosinofílico y nucleólos fácilmente identificables (WHO Urología, 2012).



**Figura 4.** Corte histológico de próstata en donde se ven regiones no tumorales con acinos grandes en los extremos superior e inferior y una región central tumoral (círculo rojo) con acinos de tamaño muy inferior. Figura obtenida de *Human Protein Atlas*

Bioquímicamente, los carcinomas prostáticos se pueden detectar en base a incrementos en los niveles serológicos de antígeno prostático (PSA). Esta determinación no solo permite detectar un número muy superior de tumores que las técnicas basadas en la

visualización de anomalías directamente si no que es capaz de detectar estadios tumorales más tempranos. Los niveles de PSA en sangre se correlacionan con la probabilidad de desarrollo de cáncer de próstata. Sin embargo, la capacidad de detección de este marcador también presenta ciertos límites al encontrarse elevado en otras patologías no tumorales como la prostatitis o la hiperplasia benigna. Otro marcador de detección común es PCA3 con una expresión muy superior en cáncer de próstata frente a tejidos sanos o hiperplasias benignas (WHO Urología, 2012).

#### **4.4 Histología prostática**

La próstata está constituida por tres regiones tisulares diferenciadas: una zona periférica mayoritaria, una zona de transición y una zona central. La región periférica se asocia con la localización de entre el 75-80% de los carcinomas prostáticos seguida por la región central mientras que la zona de transición se erige como la región con menor susceptibilidad a desarrollar un tumor (WHO Urología, 2012). La diferenciación de las tres regiones se puede llevar a cabo en base a diferencias en la forma de los acinos. La zona central tiene acinos de mayor tamaño y complejidad que la región periférica presentando típicamente pliegues y arcos epiteliales. La zona de transición presenta unas morfologías acinares más similares a las de la zona periférica, pero con una cantidad de tejido estromal muy superior. La zona periférica, presenta grandes acinos con una morfología ovalada.

#### **Objetivos**

A día de hoy, se sabe poco sobre el papel de Hakai en cáncer de próstata, por ello es de gran interés encontrar potenciales dianas de Hakai cuya expresión pueda estar regulada por dicha proteína en tumores. Con el fin de poder estudiar el papel de Hakai en cáncer de próstata, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- 1- Revisar bibliográficamente y en bases de datos la expresión diferencial de proteínas relacionadas con Hakai y la EMT en líneas celulares cancerosas y no cancerosas de adenocarcinomas prostáticos.
- 2- Determinar cuáles de las líneas celulares seleccionadas a estudio son capaces de sobreexpresar Hakai.

3- Establecimiento de una línea celular capaz de down-regular Hakai.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Revisión bibliográfica**

A partir de un estudio de interactoma llevado a cabo con anterioridad por miembros del grupo, se identificaron diferentes proteínas que mostraban una interacción con Hakai. Así mismo, otro estudio proteómico realizado también dentro del grupo mostro una relación de proteínas que presentaban niveles de expresión alterados en células sobre Hakai también presentaba un patrón de sobreexpresión. En base a estos resultados, realizamos una revisión en bases bibliográficas entre ellas Pubmed con el fin de analizar como se veía afectada la expresión de estas en carcinomas prostáticos en comparación con tejidos sanos.

### **2. Cultivo celular**

Las líneas celulares PC-3, DU-145, PNT-2, VCaP y LNCaP fueron cultivadas utilizando el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Thermofisher) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se mantuvieron en incubador a 37°C, humedad regulada y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3. Transfección celular**

Los experimentos de transfección se realizaron empleando el kit comercial Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) y medio de cultivo Opti- MEM (Gibco, Thermofisher) no suplementado. Para los ensayos se emplearon placas de 6 pocillos (MW6) sembrando 500.000 células por pocillo que se dejaron incubar durante 24h para permitir su fijación.

Para la sobreexpresión de Hakai se establecieron 3 condiciones de tratamiento: 1) Control en la que se adicionó 1µg de pcDNA por pocillo; 2) Se añadieron 0.75µg Flag y 0.25µg de pcDNA por pocillo; 3) Se añadieron 0.75µg de Flag y 0.25µg de Src por pocillo. Los plásmidos se añadieron sobre 83µL de Opti-MEM sobre el cual se añadieron otro 83µL de Opti-MEM con 2µL de lipofectamina para cada condición. Tras la mezcla de volúmenes se dejó incubar 10 minutos antes de la incorporación a la placa de cultivo previamente lavada y que presentaba 1mL de OptiMEM. Tras 5,5 horas tal como indica



el protocolo se procedió a la retirada del medio y su sustitución por el medio de cultivo propio de la línea celular, DMEM. 24h después del tratamiento se procedió al raspado de la placa y la extracción de la proteína.

Para el silenciamiento de Hakai se establecieron también 3 condiciones: 1) Control negativo con oligo de siRNA; 2) transfección de un oligonucleótido siRNA Hakai 1 (5'TCGATCGGTCAGTCAGGAAA) y 3) transfección de un oligonucleótido siRNA Hakai 2 (5'CACCGCGAACTAAAGAACTA). Se añadieron 2 $\mu$ L de un stock 100 $\mu$ M de los oligonucleótidos (200pmol) en un volumen de 83 $\mu$ L de Opti-MEM. Sobre este volumen se incorporaron otros 83 $\mu$ L de Opti-MEM con el doble de volumen de lipofectamina que de plásmido empleado, 4 $\mu$ L, por cada pocillo. Para este ensayo de silenciamiento se procedió de igual modo que en caso de transfección para sobreexpresión, levantando las células 24h tras la transfección.

#### **4. Extracción y cuantificación de la proteína**

La extracción de proteínas se realizó empleando el tampón de lisis 1% Triton X-100 (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl y 1% Triton X-100) suplementado con 1mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 1mM de leupeptina y 0.1mM de aprotinina. Las muestras se incubaron durante 20 minutos con el tampón agitando cada 5 minutos mediante vórtex. Seguidamente se procedió a su centrifugación a 12500 rpm, 4°C durante 10 minutos. Tras recuperar el sobrenadante con el contenido proteico se procedió a la cuantificación. Para ello se empleó el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermofisher) que induce un cambio en la coloración de las muestras en función de la cantidad de proteína presente virando de verde a violeta. Se realiza una recta patrón con concentraciones conocidas de BCA con el fin de poder extrapolar los resultados y determinar las concentraciones proteicas problema. La cuantificación se realiza tras incubar 2 $\mu$ L de volumen proteico con 200 $\mu$ L de reactivo comercial durante 30 minutos a 37°C midiendo los valores de absorbancia a 570nm.

#### **5. Western Blot**

Se cargaron 20 $\mu$ L en geles de poliacrilamida de 10 pocillos y 1.5mm de grosor. La electroforesis se realizó en 2 fases: 1) 10 minutos a 80v y 2) 1h y 15 minutos a 180v. Seguidamente se procede a realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF. La transferencia se lleva a cabo a un amperaje constante de 0.2A durante 1 hora. Para realizar la electroforesis y la transferencia se emplea un Mini-PROTEAN Tetra Cell



(Bio-Rad). Tras la transferencia se realizó un bloqueo de 1 hora con leche desnatada (Sigma-Aldrich) al 5% en TBST-1x (0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl; 0.05% Tween-20, 500 mL H<sub>2</sub>O destilada; pH=7.4) en las membranas se incubaron *overnight*, a 4°C y girando con los anticuerpos primarios frente a Hakai (ThermoFisher Scientific; dilución 1:1000) y GAPDH (ThermoFisher Scientific; 1:1000) y 1h a RT con anticuerpos secundarios anti-ratón para GAPDH (Sigma-Aldrich; dilución 1:10000) y anti-conejo para Hakai (Sigma-Aldrich; dilución 1:10000).

## **Resultados**

### **1. Identificación de posibles dianas de Hakai con expresión diferencial en células prostáticas sanas y tumorales.**

En base a estudios de interactoma y proteómicos realizados con anterioridad en el laboratorio hemos podido identificar ciertas proteínas con posible relación con Hakai que presentaban niveles de expresión aumentados o reducidos en estadios tumorales en comparación con sus valores en condiciones normales, no tumorales. Realizamos un estudio de 17 proteínas teniendo en cuenta para ello los resultados que en relación con ellas se publicaron en las revistas de mayor impacto.

Las 17 proteínas seleccionadas inicialmente por su implicación con Hakai y el adenocarcinoma prostático fueron: FASN, FASCIN, OLFM4, PIM2, TRIM28, TMEFF2, mTOR, MIC-1, ACTN4, ENOA/ENO1, GSTP1, KLF5, PP1 $\alpha$ , EPLIN, PTPL1,  $\delta$ -Catenina y AJUBA. Todas ellas se pueden clasificar en dos grandes grupos: las que están sobreexpresadas en carcinomas y las que presentan una reducción en su expresión en estas condiciones. Al primer grupo pertenecen: FASN, FASCIN, PIM-2, TRIM-28, MIC-1, mTOR, ACTN4, la forma ENOA/ENO1, PP1 $\alpha$  y  $\delta$ -catenina. Al segundo grupo pertenecen: OLFM4, GSTP1, KLF5, la forma MBP1, EPLIN, PTPL1 y Ajuba.

FASN se relaciona con progresión tumoral de tal modo que su inhibición ha demostrado que reduce el tamaño de organoides y de tumores generados a través de xenoinjertos (Zadra *et al.*, 2019) así como de factores antiapoptóticos y promotores de ciclo celular como la ciclina D1 o NFkB (Chuang *et al.*, 2019).

FASCIN se relaciona con procesos de EMT, así como con los fenotipos cancerosos más agresivos al modular las interacciones entre los filamentos de actina (Liu *et al.*, 2021). Su

inhibición ha demostrado reducir las capacidades de adhesión e invasión de las células tumorales, así como reducir el tamaño tumoral en ratones (Darnel *et al.*, 2019).

PIM-2, una quinasa que induce progresión tumoral afectando sobre todo a eIF4B, una de las dianas conocidas de Hakai (referencia EMBO J). Su sobreexpresión, que determina un aumento de los niveles de eIF4B fosforilada, se asocia con un descenso en los niveles de apoptosis y, en consecuencia, con progresión tumoral (Ren *et al.*, 2013).

TRIM-28 induce la progresión del adenocarcinoma prostático por dos vías diferentes. Por un lado, inhibiendo la degradación proteolítica de un factor relacionado, TRIM24, al unirse directamente a él impidiendo el reconocimiento por una ubiquitina ligasa. TRIM24, por su parte inducirá la transcripción de genes de respuesta a andrógenos relacionados a su vez con progresión tumoral. Por otro lado, puede favorecer directamente los procesos tumorales mediante su interacción directa con secuencias génicas relacionadas con estos procesos. Se ha demostrado que su inhibición se correlaciona con una caída en la proliferación celular, así como una reducción en el tamaño tumoral de xenoinjertos (Fong *et al.*, 2018).

MIC-1, una citoquina inhibitoria de macrófagos sobreexpresada también en cáncer de próstata que determina un incremento en los niveles de RhoA, proteínas que se ha comprobado en nuestro grupo que sufre un descenso en sus niveles de expresión cuando se sobreexpresa Hakai al menos en cáncer de colon. La sobreexpresión de RhoA inducida por MIC-1 determina un incremento en la motilidad de las células tumorales por alteración de los microfilamentos de actina (Senapati *et al.*, 2009).

mTOR una de los factores típicamente asociados con progresión tumoral dado su papel como proangiogénico, promotor de ciclo celular y de supervivencia celular. Se ha demostrado que la sobreexpresión de cualquiera de los dos complejos mTOR, mTORC1 o mTORC2, se relaciona con un peor pronóstico. Además, al igual que MIC-1 mTOR puede inducir la progresión tumoral actuando sobre RhoA (Chen *et al.*, 2014).

ACTN4 es una proteína de unión a actina que también se ha encontrado sobreexpresada en casos de cáncer de próstata. Se trata de un coactivador de NFκB que determina un incremento en los niveles de β-catenina, uno de los principales implicados en la regulación de EMT, lo que supone un incremento de la motilidad celular y en la proliferación celular (Park *et al.*, 2020). En los estudios realizados previamente en el grupo se ha demostrado que Hakai también está implicada en su regulación, aunque en

este caso el papel de la ubiquitin-ligasa parece asociarse con una reducción en los niveles de ACTN4.

ENOA/ENO1 una proteína que deriva de un gen con dos pautas de lectura alternativas una de las cuales da lugar a ENOA/ENO1 y la otra a una proteína ligeramente menor MBP1. En base a los conocimientos actuales parece ser que los carcinomas prostáticos se correlacionan con una sobreexpresión de ENOA y una reducción en los niveles de MBP1 en comparación con los tejidos sanos (Almaguel *et al.*, 2021). La sobreexpresión de ENOA se correlaciona con un incremento de la capacidad migratoria de las células tumorales mientras que su inhibición puede reducir estos efectos en hasta un 83% (Yu *et al.*, 2012).

PP1 $\alpha$  se trata de una serina/treonina fosfatasa que mediante procesos de desfosforilación inactiva a enzimas ubiquitina ligasas implicadas en la degradación de genes de respuesta a andrógenos. Paralelamente, PP1 $\alpha$  activa rutas de MAPK mediante la desfosforilación de ERK que se relacionan con un incremento de la proliferación celular (Liu *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2018)

$\delta$ -catenina es una proteína sobreexpresada en cáncer de próstata. Está relacionada con EMT al inducir la degradación de E-cadherina y aumentar la concentración de  $\beta$ -catenina a nivel nuclear. Además, se vio que sufre degradación proteolítica y autofágica. La inducción de la degradación autofágica de  $\delta$ -catenina mediante acetilaciones demostró asociarse con un descenso de la capacidad de crecimiento, migración e invasión celular, así como una reducción de los niveles de  $\beta$ -catenina nuclear (Zhou *et al.*, 2019).

OLFM4 un factor relacionado con inflamación y cáncer cuyos niveles se encuentran reducidos en cáncer de próstata. Un descenso en los niveles de expresión en tejidos prostáticos se relaciona con un incremento en la expresión de genes de las rutas de MYC (Li *et al.*, 2020), Sonic Hedgehog (SHH) (Li *et al.*, 2015). Además, OLFM4 se relaciona con EMT. OLFM4 interacciona con cadherinas y lectinas facilitando la adhesión celular. Paralelamente, un descenso en sus niveles de expresión determina un incremento en los niveles de vimentina y TWIST, marcadores de EMT (Li *et al.*, 2019). Además, se ha visto que OLFM4 determina una reducción del crecimiento tumoral por interacción con SDF-1 al impedir que este fosforile a Akt (Cheng *et al.*, 2011).

GSTP1 un miembro de la familia de la glutatión-S-transferasa interacciona con factores que median procesos de proliferación diferenciación y apoptosis. Se ha observado un

descenso en los niveles de expresión de la proteína en tejidos tumorales en donde su expresión es prácticamente nula, en comparación con tejidos sanos donde es fácilmente detectable. La causa de esta expresión diferencial parece estar ligada con un evento de hipermetilación del promotor génico en las células tumorales que impide la transcripción y expresión de la proteína (Martignano *et al.*, 2016).

KLF5 un factor de transcripción implicado en proliferación, diferenciación e invasión cuya delección determina progresión tumoral en cáncer de próstata. La reducción en los niveles de KLF5 determina a su vez un incremento en los niveles de IGF1 y STAT3 lo que favorece los procesos de invasión (Ma *et al.*, 2020).

EPLIN (LIMA-1) se trata de una proteína con dominios LIM. Está relacionada con motilidad celular inhibiendo la despolimerización de los filamentos de actina. Su reducción en cáncer de próstata se relaciona con la destrucción de uniones adherentes y la activación de la ruta de  $\beta$ -catenina. Esto se asocia con un descenso en los niveles de E-cadherina y el aumento paralelo de la expresión de vimentina. Así mismo, la reducción de EPLIN determina un incremento en la tasa de infiltración y una reducción de hasta 8 veces la eficiencia de los tratamientos quimioterápicos (Zhang *et al.*, 2015). Estudios de interacción realizados con anterioridad por nuestro grupo han establecido la existencia de interacción entre esta proteína y Hakai.

PTPL1 una tirosina fosfatasa cuya ausencia determina un incremento en la resistencia celular a los procesos de apoptosis. Un descenso de PTPL1 se correlaciona también con un descenso en los niveles de PKC- $\delta$  un intermediario de la ruta de PTPL1 (Castilla *et al.*, 2013). Datos previos obtenidos en nuestro grupo han determinado la existencia de una interacción entre PKC- $\delta$  y Hakai.

Ajuba otra proteína con dominio LIM, al igual que EPLIN, que también presenta un descenso en los niveles de expresión en cáncer de próstata. Estudios de interactoma realizados en el grupo han mostrado resultados positivos para la asociación entre esta proteína y Hakai. Parece que la reducción de Ajuba en tumores prostáticos viene determinada por la asociación de un miRNA, miR193a-3p en dos posiciones diferentes en la región 3'UTR del gen que codifica para la proteína (Jia *et al.*, 2017).

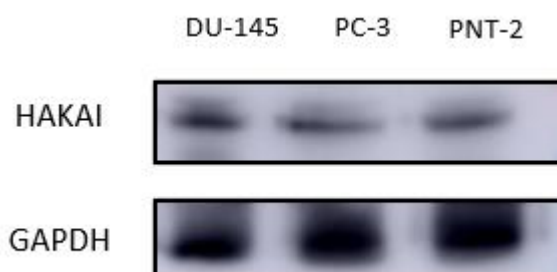
Una vez analizada toda la información recopilada sobre estas proteínas realizamos un proceso de selección de aquellas que parecían tener mayor interés por su posible interacción con Hakai para poder en algún momento, posterior a este Trabajo de Fin de

Máster, continuar con la determinación de su relación o no con Hakai y la progresión tumoral en adenocarcinomas prostáticos.

## 2. Determinación de la expresión de Hakai en distintas líneas celulares de próstata.

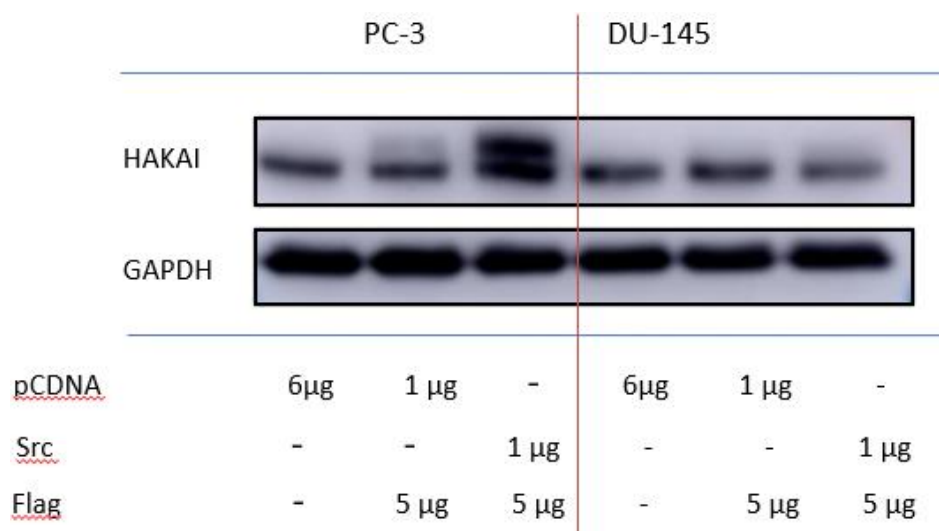
Iniciamos este estudio con cinco líneas celulares prostáticas cuatro de ellas tumorales: DU-145, LNCaP, PC-3 y VCaP y una sana: PNT-2. Uno de los objetivos era determinar cuál de ellas presentaba una mayor expresión de Hakai así como cual presentaba una mayor transfectabilidad. Sin embargo, nos encontramos con ciertos inconvenientes. El primero de ellos fue la imposibilidad de crecer a la línea LNCaP. Esto probablemente debido a la antigüedad de las células descongeladas, así como al reducido volumen de células contenido en el vial. De tal manera que no pudimos incluir a esta línea en el ensayo de Western Blot. Tampoco fue posible incluir a las VCaP en el ensayo dado que la reducida velocidad de crecimiento de las células exigía de unos tiempos de espera para alcanzar los niveles de confluencia adecuados para la extracción de proteína excesivamente grandes. Por estos motivos decidimos trabajar inicialmente con las líneas PC-3, DU-145 y PNT-2.

Comenzamos realizando un ensayo de Western Blot con el fin de determinar las variaciones en la expresión de Hakai en las diferentes líneas celulares sin someterlas a ningún tipo de tratamiento (Fig.5). Para asegurarnos de que la cantidad de proteína cargada en cada uno de los pocillos era la misma incubamos las membranas con GAPDH, una proteína cuyos niveles de expresión son idénticos en todas las células, como control de carga. Pudimos comprobar que apenas se observaban diferencias en la expresión de Hakai en las 3 líneas. Aunque esta era ligeramente mayor en la línea DU-145.



**Figura 5.** Análisis de la expresión de Hakai en líneas celulares prostáticas (PC-3 y DU-145 tumorales y PNT-2 sana) mediante Western Blot. GAPDH fue empleado como control de carga.

Una vez confirmada la expresión de Hakai en próstata decidimos comprobar, de estas 3 líneas cual presentaba un mejor patrón de transfectabilidad (Fig. 6). Para ello decidimos inducir la sobreexpresión de la proteína Hakai en las tres líneas celulares. La sobreexpresión de Hakai se logra mediante la incorporación de plásmidos que codifican Flag- Hakai y Src. Introdujimos este ADN exógeno con ayuda de lipofectamina. De este modo pretendíamos seleccionar una de las líneas para llevar a cabo ensayos de sobreexpresión y silenciamiento de Hakai.



**Figura 6.** Ensayo de transfección en donde se induce la sobreexpresión de Hakai, junto con el inductor Src. Se observa como a diferencia de las PC-3 las células DU-145 no presentan alteración en la expresión de la proteína Hakai indicando ineficiencia de la transfección. GAPDH fue empleado como control de carga.

Una vez realizadas las transfecciones pudimos comprobar que, bajo las mismas condiciones de transfección, las PNT-2 eran las más sensibles. En esta línea la lipofectamina es especialmente tóxica presentando unos niveles de mortalidad asociados muy elevados. De este modo cuando intentamos recoger las células para extraer la proteína, a las 24h, comprobamos que la densidad celular existente en la placa era muy

reducida. Por ello, no recuperamos suficiente proteína como para poder realizar un ensayo de WB con el que revelar los resultados de la transfección de esta línea.

La densidad celular de PC-3 y DU-145 a las 24h tras la transfección era elevada permitiendo la obtención de una cantidad de proteína suficiente como para realizar ensayos de WB. A través de ellos pudimos comprobar que a diferencia de PC-3, la línea DU-145 no había sido transformada. Esto nos indica que la línea DU-145 requiere, aparentemente, de unas concentraciones de lipofectamina y plásmidos mayores que las requeridas por las PC-3 para ser transformadas.

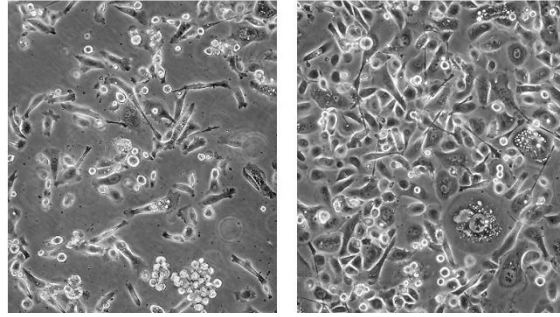
Tras estos análisis preliminares, en los que la línea celular PC-3 mostraba no sólo una facilidad de cultivo, con una velocidad de crecimiento relativamente rápida, sino que también una buena capacidad de transfección, determinamos que para continuar con este trabajo emplearíamos esta línea celular.

Además, pudimos comprobar que la incorporación de Flag-Hakai es suficiente para inducir la sobreexpresión de Hakai. No obstante, la incorporación simultánea de Flag-Hakai y Src por la célula determina un incremento muy notable de los niveles de expresión de Hakai. De este modo se confirma a Src como un inductor de la expresión de Hakai en células de adenocarcinoma prostático.

### **3. Caracterización de la línea celular PC-3.**

PC-3 (ATCC CRL-1435) es una línea celular humana obtenida de adenocarcinoma prostático en estadio IV (Fig. 7). De crecimiento rápido, pueden alcanzar una confluencia cercana al 100% en unos 4 días tras sembrar  $\approx 1.5$  millones de células en una P100. Así mismo, presentan una gran facilidad para el pase necesitando únicamente unos 3 minutos a 37°C para despegarse tras incorporar 1mL de tripsina al 2% en una placa P100.

Otra de las características que presentan y que fue clave para nuestra elección, es su capacidad para ser transfectadas.



**Figura 7.** Línea celular PC-3 en estado de baja confluencia (izqda.) y elevada confluencia (dcha.). Figura obtenida de *ATCC*.

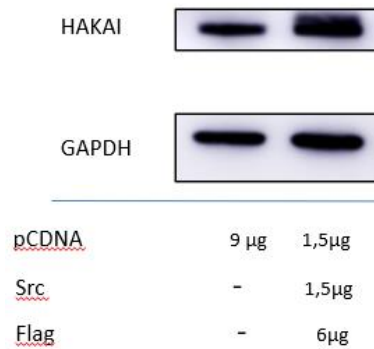
#### **4. Determinación de la capacidad de la línea PC-3 para sobreexpresar Hakai.**

Aunque la bibliografía hacía mención a la capacidad de la línea PC-3 para ser transfectada, fue necesario comprobar que efectivamente éramos capaces de inducir la incorporación de un ácido nucleico exógeno en nuestras células en cultivo. Para ello probamos distintas concentraciones tanto de plásmidos como de lipofectamina (el tipo de transfección que llevamos a cabo fue la lipofección). Finalmente, determinamos que las condiciones que mejor nos funcionaban eran aquellas en las que la cantidad de ADN incorporado no superaba los 9 $\mu$ g. Resultados positivos de sobreexpresión se lograron tanto en el caso de incorporación de 6 $\mu$ g (Fig. 6) como de 9 $\mu$ g de ADN exógeno (Fig. 8).

Los resultados de transfección analizados mediante Western Blot nos muestran que la incorporación exógena de Flag-Hakai, donde Flag es una etiqueta molecular que se emplea para monitorizar la expresión exógena de Hakai, es suficiente para inducir sobreexpresión de Hakai. Sin embargo, el incremento en los niveles de Hakai empleando únicamente este plásmido es bastante reducido.

En este caso hemos empleado como control de carga a la proteína GAPDH que no presenta alteración en su expresión como consecuencia del tipo de célula prostática de que se trata, sana o tumoral.





**Figura 8.** Sobreexpresión de Hakai mediante la incorporación de Flag-Hakai (6µg), y Src (1.5µg), GAPDH fue empleado como control de carga

### 5. Determinación de la capacidad de la línea PC-3 para silenciar la expresión de Hakai.

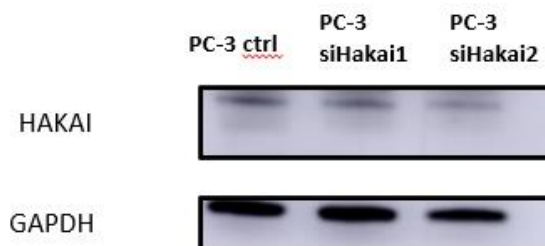
Tras haber comprobado que podíamos inducir la sobreexpresión de Hakai en PC-3 decidimos analizar la capacidad de llevar a cabo el silenciamiento de la expresión de la proteína. Llevamos a cabo un experimento de silenciamiento transitorio de la expresión génica empleando pequeños ARN de interferencia (siRNA), pequeñas moléculas de RNA lineales que se asocian con los mARN impidiendo la traducción su traducción y, en consecuencia, la expresión de la proteína. De acuerdo con este procedimiento la mayor reducción en la expresión proteica se logra entre 24-48h después del tratamiento. Transcurrido este tiempo la expresión de la proteína comenzará a recuperarse. En nuestro caso optamos por recuperar la proteína 24h después del tratamiento.

Para llevar a cabo este ensayo empleamos dos siRNA diferentes con secuencias complementarias a Hakai (si-Hakai1 y si-Hakai2). Aunque sabíamos que los dos eran efectivos pues lo habían demostrado en ensayos previos para el silenciamiento de Hakai en líneas colorrectales, desconocíamos cual proporcionaría mejores resultados en nuestra línea de estudio.

Por medio de ensayos de Western Blot (WB), empleando anticuerpo frente a Hakai y también frente al tag Flag, observamos la expresión diferencial de esta proteína en muestras control obtenidas de cultivos celulares sin tratar con respecto a muestras derivadas de células tratadas con si-Hakai1 o si-Hakai2. Pudimos comprobar que en esta línea celular el siRNA que mejores resultados nos proporciona es siHakai 2. Empleando

este siRNA logramos una reducción de la expresión génica mucho mayor que empleando siHakai1. Esto se refleja como una banda mucho más débil en los ensayos de WB (Fig.9).

Nuevamente y al igual que hicimos en el caso del revelado de los ensayos de transfección para sobreexpresión de Hakai, empleamos GAPDH como control de carga en el Western Blot al no existir variaciones en sus niveles de expresión independientemente de la condición experimental.



**Figura 9.** Reducción de la expresión proteica de Hakai empleando dos oligos de siRNA de secuencia diferente. El silenciamiento de la expresión génica es mayor empleando siHakai2. GAPDH fue empleado como control de carga

## Discusión

La carcinogénesis es el proceso mediante el cual las células adquieren un fenotipo tumoral. Uno de los procesos más característicos asociados a este fenotipo es la TEM. Uno de los rasgos más característicos de la TEM es la pérdida de las uniones adherentes que mantenía a las células unidas. De este modo, se altera la señalización celular lo que supone entre otras alteraciones, un incremento en la capacidad migratoria de las células (Kalluri *et al.*, 2009).

La pérdida de las uniones adherentes entre las células se debe principalmente a la destrucción de la E-cadherina una proteína de un único paso transmembrana. Esta presenta un dominio extracelular con cinco subdominios (5EC) a través de los que interacciona con moléculas de E-cadherina en la membrana de la célula epitelial adyacente (Fig. 1) y un dominio citoplasmático con dos subdominios, JMD y CBD y una región C-termina a la que se unen los miembros de la familia de las catenina p120catenina,  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina respectivamente (van Roy *et al.*, 2008). Tanto la E-cadherina como la p120 catenina son susceptibles de ser ubiquitinizadas por la tirosina quinasa Src que actúa sobre todo en bajo condiciones de pH ácido, comunes en el

ambiente tumoral (Chen *et al.*, 2009). Estas fosforilaciones impiden la interacción de la E-cadherina y la p120 catenina al tiempo que permiten la unión de Hakai, una E3 ubiquitina ligasa. Hakai reconoce los residuos Y fosforilados de la E-cadherina y se une a ella marcándola para su degradación por vía proteolítica en un proceso en el que intervienen dos GTPasas de la familia Rab, Rab5 y Rab7 (Fig. 2) (Aparicio *et al.*, 2012).

La sobreexpresión de Hakai se ha comprobado que en ciertos tipos de carcinoma como el colorrectal, está relacionada con la promoción de la progresión tumoral y la metástasis (Castosa *et al.*, 2017). Sin embargo, el papel de Hakai como inductor de la progresión tumoral no ha sido caracterizado en carcinomas prostáticos. A través de este estudio hemos podido confirmar la existencia de diferencias en la expresión de la proteína Hakai en diferentes líneas celulares de adenocarcinomas acinares de próstata y una línea de próstata sana, no observándose diferencias notables en los niveles de expresión de Hakai en las diferentes líneas.

Los adenocarcinomas acinares de próstata constituyen entre el 75-80% de la totalidad de carcinomas prostáticos. Se localizan mayoritariamente en la zona periférica de la próstata y son difícilmente detectables en estadios tempranos por la ausencia de una sintomatología asociada clara (WHO Urology). Por este motivo encontrar marcadores que puedan funcionar como detectores de la enfermedad resulta clave y, tal vez Hakai se puede ser una proteína implicada en la transformación de líneas celulares de próstata tal u como se ha demostrado previamente en líneas tumorales de colon (Figueroa *et al.*, 2009; Castosa *et al.*, 2018, Aparicio *et al.*, 2012).

Nuestro objetivo a más largo plazo sería utilizar Hakai como diana terapéutica para tratar esta patología. Para ello es esencial poder regular la expresión de esta quinasa en las células tumorales. Para confirmar la factibilidad de esta modulación, primero llevamos a cabo un estudio de la expresión de Hakai en distintas líneas celulares prostáticas, tanto sanas como tumorales para determinar la expresión de Hakai en ellas (Fig. 5). A continuación, indujimos la sobreexpresión de Hakai mediante la incorporación de plásmidos codificantes para Src y Flag por lipofección (Fig.6), con el objetivo de determinar cuál de ellas presentaba una mayor facilidad de trabajo, determinando que PC-3 era la línea con mejor transfectabilidad. Dado que las diferencias en cuanto a velocidad de crecimiento entre las tres líneas, PC-3, DU-145 y PNT-2 son apenas inexistentes, optamos por la línea PC-3 para continuar con este trabajo. Para ello buscamos establecer las condiciones de transfección más adecuadas valorando tanto la sobreexpresión de

Hakai como la tasa de mortalidad de las células asociada a la toxicidad de la lipofectamina empleada para introducir el ADN exógeno en las células (Fig. 6, 8). Al igual que indujimos la sobreexpresión de Hakai también forzamos el silenciamiento de la expresión de Hakai mediante la incorporación, por medio de lipofección de dos siRNA diferentes frente a Hakai para así determinar cuál era más efectivo (Fig.9). En ambos casos empleamos GAPDH, cuya expresión no varía independientemente del tratamiento, como control de carga. Como se puede ver en las figuras, se demostró que la expresión de Hakai es modulable mediante la incorporación por lipofección de ácidos nucleicos exógenos en células tumorales de próstata.

De este modo se abre una vía de investigación con respecto a la posibilidad de analizar si Hakai puede ser un biomarcador temprano de carcinomas prostáticos, así como de encontrar posibles mecanismos de inhibición del avance de la enfermedad. Con este objetivo, realizamos una búsqueda, en base a resultados previos de proteínas que muestran interacción o patrones de expresión alterados en presencia de Hakai, de proteínas cuya expresión en carcinomas prostáticos está alterada. Encontramos una serie de candidatas que pueden ser susceptibles a un proceso de modulación por Hakai que serán analizadas a continuación. La investigación de esta posibilidad constituye el siguiente paso de esta línea de investigación.

## **Conclusión**

Tras la realización de este trabajo se concluyó lo siguiente:

- 1- Se ha llevado a cabo un estudio bibliográfico en donde se han localizado numerosas dianas potenciales de Hakai que presentan una alteración en su expresión en tejidos prostáticos
- 2- Se ha comprobado la expresión de Hakai en las líneas celulares de próstata DU-145, PC-3 y PNT-2, siendo las dos primeras tumorales y la última, sana.
- 3- Se ha determinado que PC-3 presenta una mayor facilidad de transfección que DU-145 y PNT-2. Paralelamente, se ha comprobado que PNT-2 es mucho más sensible a la lipofectamina que cualquiera de las otras dos líneas celulares pues en bajo las mismas condiciones de tratamiento la tasa de mortalidad asociada es muy superior. Así como el hecho de que, aparentemente, DU-145 bajo estas condiciones no se transfectan.

- 4- Se ha demostrado la posibilidad de inducir tanto la sobreexpresión de Hakai como su silenciamiento en la línea celular prostática PC-3

## **Bibliografía**

**Almaguel F, Sanchez T, Ortiz-Hernandez G, Casiano C. Alpha-Enolase: Emerging Tumor-Associated Antigen, Cancer Biomarker, and Oncotherapeutic Target. *Frontiers in Genetics*. 2021;11.**

**Aparicio L, Abella V, Valladares M, Figueroa A. Posttranscriptional regulation by RNA-binding proteins during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;70(23):4463-4477.**

**Aparicio L, Valladares M, Blanco M, Alonso G, Figueroa A. Biological influence of Hakai in cancer: a 10-year review. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2012;31(1-2):375-386.**

**Castilla C, Chinchón D, Medina R, Torrubia F, Japón M, Sáez C. PTPL1 and PKC $\delta$  contribute to proapoptotic signalling in prostate cancer cells. *Cell Death & Disease*. 2013;4(4):e576-e576.**

**Castosa R, Martinez-Iglesias O, Roca-Lema D, Casas-Pais A, Díaz-Díaz A, Iglesias P et al. Hakai overexpression effectively induces tumour progression and metastasis in vivo. *Scientific Reports*. 2018;8(1).**

**Chen X, Cheng H, Pan T, Liu Y, Su Y, Ren C et al. mTOR regulate EMT through RhoA and Rac1 pathway in prostate cancer. *Molecular Carcinogenesis*. 2014;54(10):1086-1095.**

**Chen Y, Chen C, Tung P, Huang S, Wang S. An acidic extracellular pH disrupts adherens junctions in HepG2 cells by Src kinases-dependent modification of E-cadherin. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009;108(4):851-859.**

**Chen L, Li H, Liu W, Zhu J, Zhao X, Wright E et al. Olfactomedin 4 suppresses prostate cancer cell growth and metastasis via negative interaction with cathepsin D and SDF-1. *Carcinogenesis*. 2011;32(7):986-994.**

**Cheng L, MacLennan G, Bostwick D. Urologic surgical pathology. 2nd ed. MOSBY Elsevier; 2008.**

**Chen M, Wan L, Zhang J, Zhang J, Mendez L, Clohessy J et al. Deregulated PP1 $\alpha$  phosphatase activity towards MAPK activation is antagonized by a tumor suppressive failsafe mechanism. *Nature Communications*. 2018;9(1).**

**Chuang H, Lee Y, Lin W, Lin Y, Hwang J. Fatty Acid Inhibition Sensitizes Androgen-Dependent and -Independent Prostate Cancer to Radiotherapy via FASN/NF- $\kappa$ B Pathway. *Scientific Reports*. 2019;9(1).**

**Darnel A, Behmoaram E, Vollmer R, Corcos J, Bijian K, Sircar K et al. Fascin Regulates Prostate Cancer Cell Invasion and Is Associated with Metastasis and Biochemical Failure in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(4):1376-1383.**

**Figuroa A, Kotani H, Toda Y, Mazan-Mamczarz K, Mueller E, Otto A et al. Novel Roles of Hakai in Cell Proliferation and Oncogenesis. *Molecular Biology of the Cell*. 2009;20(15):3533-3542.**

**Fong K, Zhao J, Song B, Zheng B, Yu J. TRIM28 protects TRIM24 from SPOP-mediated degradation and promotes prostate cancer progression. *Nature Communications*. 2018;9(1).**

**Hartsock A, Nelson W. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2008;1778(3):660-669.**

**Kalluri R, Weinberg R. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(6):1420-1428.**

**Li H, Chaitankar V, Zhu J, Chin K, Liu W, Pirooznia M et al. Olfactomedin 4 mediation of prostate stem/progenitor-like cell proliferation and differentiation via MYC. *Scientific Reports*. 2020;10(1).**

**Jia L, Gui B, Zheng D, Decker K, Tinay I, Tan M et al. Androgen receptor-regulated miRNA-193a-3p targets AJUBA to promote prostate cancer cell migration. *The Prostate*. 2017;77(9):1000-1011.**

**Li H, Kim C, Liu W, Zhu J, Chin K, Rodriguez-Canales J et al. Olfactomedin 4 downregulation is associated with tumor initiation, growth and progression in human prostate cancer. *International Journal of Cancer*. 2019;146(5):1346-1358.**

**Li H, Liu W, Chen W, Zhu J, Deng C, Rodgers G. Olfactomedin 4 deficiency promotes prostate neoplastic progression and is associated with upregulation of the hedgehog-signaling pathway. *Scientific Reports*. 2015;5(1).**

**Liu X, Han W, Gulla S, Simon N, Gao Y, Cai C et al. Protein phosphatase 1 suppresses androgen receptor ubiquitylation and degradation. *Oncotarget*. 2015;7(2):1754-1764.**

**Liu H, Zhang Y, Li L, Cao J, Guo Y, Wu Y et al. Fascin actin-bundling protein 1 in human cancer: Promising biomarker or therapeutic target?. *Molecular Therapy - Oncolytics*. 2021; 20:240-264.**

**Ma J, Bai J, Zhang H, Jia J, Shi Q, Yang C et al. KLF5 inhibits STAT3 activity and tumor metastasis in prostate cancer by suppressing IGF1 transcription cooperatively with HDAC1. *Cell Death & Disease*. 2020;11(6).**

**Martignano F, Gurioli G, Salvi S, Calistri D, Costantini M, Gunelli R et al. GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications. *Disease Markers*. 2016; 2016:1-6.**

**Moch H, Humphrey P, Ulbright T. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; 2016.**

**Park S, Kang M, Kim S, An H, Gettemans J, Ko J.  $\alpha$ -Actinin-4 Promotes the Progression of Prostate Cancer Through the Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8.**

**Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky Business: Orchestrating Cellular Signals at Adherens Junctions. *Cell*. 2003;112(4):535-548.**

**Ren K, Gou X, Xiao M, Wang M, Liu C, Tang Z et al. The over-expression of Pim-2 promote the tumorigenesis of prostatic carcinoma through phosphorylating eIF4B. *The Prostate*. 2013;73(13):1462-1469.**

**Senapati S, Rachagani S, Chaudhary K, Johansson S, Singh R, Batra S. Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK–RhoA signaling pathway. *Oncogene*. 2009;29(9):1293-1302.**

**van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65(23):3756-3788.**

**Yu L, Shi J, Cheng S, Zhu Y, Zhao X, Yang K et al. Estrogen Promotes Prostate Cancer Cell Migration via Paracrine Release of ENO1 from Stromal Cells. *Molecular Endocrinology*. 2012;26(9):1521-1530.**

**Zadra G, Ribeiro C, Chetta P, Ho Y, Cacciatore S, Gao X et al. Inhibition of de novo lipogenesis targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;116(2):631-640.**

**Zhang S, Wang X, Osunkoya A, Iqbal S, Wang Y, Chen Z et al. EPLIN downregulation promotes epithelial–mesenchymal transition in prostate cancer cells and correlates with clinical lymph node metastasis. *Oncogene*. 2011;30(50):4941-4952.**

**Zhou R, Yang Y, Park S, Seo Y, Jung S, Kim K et al. p300/CBP-associated factor promotes autophagic degradation of  $\delta$ -catenin through acetylation and decreases prostate cancer tumorigenicity. *Scientific Reports*. 2019;9(1).**