



Universidad  
de Alcalá

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

**“PAPEL DE LAS ISOFORMAS DE AKT EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER  
DE PRÓSTATA: REGULACIÓN POR LA FOSFOTIROSINA FOSFATASA  
SHP-1”.**

**TESIS DOCTORAL.**

**Ariel Ernesto Cariaga Martinez.**

**2011.**

**Begoña Colás Escudero y María Pilar López Ruíz.**

Profesoras Titulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá.

**INFORMAN:**

Que el trabajo titulado “PAPEL DE LAS ISOFORMAS DE AKT EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA: REGULACIÓN POR LA FOSFOTIROSINA FOSFATASA SHP-1” realizado por Ariel Ernesto Cariaga Martínez ha sido llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá bajo su dirección y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que el interesado opte al grado de Doctor.

Alcalá de Henares, Madrid.

Dra. Begoña Colás Escudero

Dra. María Pilar López Ruíz.



Universidad  
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR.  
Facultad de Medicina.  
Campus Universitario.  
28871 – Alcalá de Henares (Madrid).

**María José Carmena Sierra.**

Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá.

**INFORMA:**

Que la tesis que lleva el título “PAPEL DE LAS ISOFORMAS DE AKT EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA: REGULACIÓN POR LA FOSFOTIROSINA FOSFATASA SHP-1” realizada por Ariel Ernesto Cariaga Martínez ha sido llevada a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá bajo la dirección de la Dra. Begoña Colás Escudero y la Dra. María Pilar López Ruiz y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que el interesado opte al grado de Doctor.

Alcalá de Henares, Madrid.

Dra. María José Carmena Sierra

**INVESTIGAR ES VER LO QUE TODO EL MUNDO HA VISTO**

**Y PENSAR LO QUE NADIE MÁS HA PENSADO.**

*Albert Szent-Györgi (1893-1986).*

*Bioquímico húngaro-estadounidense.*

**A MIS PADRES: ASUNCIÓN Y ERNESTINA.**

**A MI TÍA CLARA Y SUS HIJOS: BELÉN, DARÍO Y GABRIEL.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

El ejercicio de agradecer me parece la parte más satisfactoria de una Tesis Doctoral, porque me permite reflexionar en la cantidad de personas que han dejado su tiempo y conocimiento para que hoy pueda completar este paso de mi formación científica. Además es un pequeño apartado para reconocer que en realidad éste no es “mi” logro, sino que es un éxito compartido con muchos que con su presencia (ó, en algunos casos, ausencia), permitieron que mi curiosidad científica llegue tan viva hasta ésta primera meta.

En primer lugar tengo que agradecer a mi familia porque fueron los primeros que me apoyaron en mi pequeña aventura y los que en ningún momento dudaron en que debía perseguir mis sueños. Aunque a ellos les haya tocado vivir una etapa diferente, nunca me pusieron ninguna excusa para que no diera a mi vida el rumbo que yo mismo deseaba. De hecho, me prepararon para la búsqueda de mi propia independencia, y siempre me regalaron su amor incondicional. Sé el profundo dolor que les provoca mi lejanía, pero confío en que mi trabajo será motivo de su orgullo.

Estoy convencido de que las personas adecuadas llegan en los momentos adecuados. Quizás sea un convencimiento poco científico, pero incluso en la Ciencia valen las intuiciones. Por eso tengo que agradecer inmensamente a mi amigo Pedro. Cuando a los 19 años empecé a trabajar con él no me imaginé lo fructífero de su formación. Siempre le estaré agradecido por darme la oportunidad de iniciarme en el camino científico y me considero una persona afortunada por contar con él en mis primeros pasos. Siempre tendré en mente sus enseñanzas, primero como jefe en mi primer laboratorio y luego como un gran amigo. Admiro su desapego personal combinado con su pasión científica porque da como resultado una persona de quien se puede aprender constantemente, estando totalmente alejada de ése halo de superioridad que caracteriza a los mediocres.

Creo que hacer Ciencia también es crecer, madurar, cambiar y volverse cada vez más flexible desechando los dogmas que habitan en mi pensamiento. Por eso tengo que agradecer a mis Directoras: Pilar y Begoña. A ellas les tocó formarme durante una etapa de mi vida en que también me tocaba madurar. He crecido mucho con ustedes y les quiero agradecer su paciencia, así como la oportunidad de trabajar en su Laboratorio formando parte de su equipo.

Siempre sostuve que hacer un Doctorado para aprender técnicas y terminar agregando un par de letras luego de mi nombre, no me valía para nada. Investigar debe servirme para crecer como persona, para conocer y darme cuenta de lo oceánico de mi ignorancia. En cierto sentido se trata de comprender el mundo que me rodea en su conjunto, aunque en mi caso, visto desde su moléculas. Investigar debe ser un reto, algo que apasione, aunque a veces en el camino no termine de ver la “luz al final del túnel”. Sin embargo, lo bueno de ésta ignorancia increíble es que siempre hay alguien que sabe más y que sirve para nutrir mi desgastado pensamiento. Raúl ha sido aquel en quien se puede cumplir la cita que seleccioné para ésta abrir ésta Tesis: veía lo que todos ven, pero me ayudó a pensar algo que nadie pensó. Por eso quiero agradecerle, porque me ayudó a llegar más allá, a continuar aún más

---

lejos con mi aventura del conocimiento. Ojalá algún día pueda emular su siembra de energía positiva y transformadora por donde pasa. Será, sin duda, un gran modelo a seguir.

No olvido a mis compañeros del laboratorio: Javi y Mali, que durante 4 años me soportaron estoicamente. A Mali quiero agradecerle por mostrarme a cada paso que, en realidad, todo es más sencillo de lo que me planteo inicialmente y que los pequeños logros merecen tanta importancia como los grandes. A Javi no terminaré de agradecerle por grabarme a fuego su pregunta antes de cualquier planificación ó experimento: “¿Cuál es tu hipótesis?”. Gracias a los dos por haberme permitido crecer como persona durante éstos años.

Trabajar en investigación también es formar parte de un equipo. Por eso quiero agradecer a todas aquellas personas que con su trabajo han permitido que yo desarrolle el mío. Gracias a España, que ha sido mi casa durante éstos años, y a su gente sencilla, cordial y afable que tan bien me ha tratado. Este país representará siempre para mí un punto de referencia para mi vida y para mi formación. Siempre lo asociaré a la alegría porque tengo la suerte de llevarme en mi mochila muchas amistades. En el lugar del mundo en que me encuentre ya me será imposible ver una película española y no reconocer calles de Madrid ó escuchar un “telediario” y no interesarme por el tema, e incluso dejar escapar alguna “lagrimilla” de alegría. Ya siempre me encantará el acento español que, lamentablemente, no puedo llevarme.

Quiero agradecer a la Universidad de Alcalá y a los Catedráticos y Profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por todo el apoyo brindado, tanto académico como científico. También quiero incluir a muchas personas que me facilitaron enormemente el desarrollo de ésta Tesis, tanto desde el punto de vista técnico como administrativo como Juan y Guillermo de la Instalación de tratamiento de isótopos radiactivos, Isa de la Unidad de Cultivos (¡Gracias por acompañarme tantas mañanas y tardes en el paseillo hasta la Facultad de Medicina y por las horas de confocal!) y a Angélica cuya buena predisposición siempre permitió la rápida solución de todos los temas que surgieran.

Finalmente quiero agradecer a la Fundación Carolina por confiar en mí en 2005 y 2006, así como al pueblo de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, que a través de su Consejería de Educación y Ciencia han financiado mi estancia y hoy me permiten presentar esta Tesis Doctoral.

## Índice general

---

<b>SUMMARY.</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS.</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>8</b>
<b>EL CÁNCER DE PRÓSTATA.</b>	<b>9</b>
Aspectos clínicos. . . . .	9
Metástasis. . . . .	10
<b>MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL.</b>	<b>12</b>
El ciclo celular. . . . .	12
Regulación del ciclo celular. . . . .	13
CDKs . . . . .	14
Ciclinas de fase G1. . . . .	15
Complejos ciclinas:CDK y la regulación del ciclo celular. . . . .	15
Disponibilidad de ciclinas de G1. . . . .	16
Fosforilación y desfosforilación de CDK. . . . .	20
Unión de CKIs. . . . .	21
Regulación de la transición G1/S. . . . .	24
<b>MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA MIGRACIÓN Y ADHESIÓN CELULAR.</b>	<b>26</b>
Contactos célula-matriz. . . . .	27
Aspectos moleculares de la migración celular. . . . .	32
<b>EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN POR FOSFOINOSÍTIDOS.</b>	<b>37</b>
La vía de PI3K. . . . .	37
PI3K clase I: . . . . .	38
La quinasa AKT. . . . .	40
Efectores de AKT. . . . .	43



Papel de la ruta PI3K/AKT en el desarrollo y progresión tumoral. . . . .	45
<b>FOSFOTIROSINAS FOSFATASAS.</b>	<b>48</b>
Clasificación. . . . .	48
PTPs con dominios SH2. . . . .	49
SHP-1. . . . .	50
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>54</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>56</b>
Materiales. . . . .	57
Métodos. . . . .	60
<b>RESULTADOS.</b>	<b>70</b>
Papel de las isoformas de AKT en la proliferación celular. . . . .	71
Regulación de la proliferación celular de la línea PC-3 por las isoformas de AKT. . . . .	71
Regulación del punto de control G1/S por isoformas de AKT. . . . .	74
Regulación de la proliferación celular de otras líneas cancerígenas prostáticas por las isoformas de AKT. . . . .	84
Distribución subcelular de isoformas AKT en PC-3, LNCaP y DU-145. . . . .	85
Papel de las isoformas de AKT en la regulación de la adhesión, extensión y migración celular.	90
Regulación de la adhesión y la extensión celular por las isoformas de AKT. . . . .	90
Regulación de la migración celular por las isoformas de AKT. . . . .	94
Regulación de efectores moleculares de la adhesión, la extensión y la migración por las isoformas de AKT. . . . .	95
Regulación de las GTPasas pequeñas RhoA y Rac1 por las isoformas de AKT. . . . .	97
Regulación de la vía PI3K/AKT por la fosfotirosina fosfatasa SHP-1. . . . .	99
Interacción de SHP-1 con las isoformas de AKT. . . . .	99
Regulación de PI3K y PDK1 por SHP-1. . . . .	101
Regulación de las interacciones de las isoformas de AKT con otras moléculas mediada por SHP-1 . . . . .	103
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>108</b>
Papel diferencial de las isoformas de AKT en el control de la proliferación celular. . . . .	109
Implicación de las isoformas de AKT en la regulación de la adhesión, extensión y migración celular. . . . .	114
Interrelación entre las vías PI3K/AKT y la fosfotirosina fosfatasa SHP-1. . . . .	117

<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO.</b>	<b>141</b>

## SUMMARY.

---

---

**BACKGROUND:** Prostate cancer is one of the most frequent malignancies between men both in Europe and Spain, although the death of patients is caused for metastatic neoplasm in other organs different from primary tumoral site. So, understanding the metastatic cascade of intracellular signaling is highly necessary for developing new therapeutic targets. PI3K/AKT is a well established signaling pathway, which leads to phosphoinositol generation. This second messenger is involved in controlling several cell features like cell cycle, cellular adhesion and migration. On the other hand, SHP-1 is a phosphotyrosine phosphatase, mainly expressed in non-hematopoietic tissues and moderately expressed in epithelial tissues, whose roles in cancer progression are currently being unraveled. In this sense, our group described that SHP-1 regulates cell proliferation by an interrelationship with PI3K/AKT pathway in PC-3 cells. However, we did not describe the roles of the main PI3K downstream effector, the AKT kinase. Three AKT isoforms has been described, and recent studies were focused in its non-redundant functions indicating that exists an isoform-dependent control, for instance, of glucose homeostasis or cellular migration. **AIMS:** To establish the role of different AKT isoforms in regulating cellular process implied in tumour progression, as well as to analyse whether SHP-1 acts as a PI3K/AKT regulator, studying the context and consequences of that relationship. **METHODS:** We use RNA interference to downregulate the expression of AKT isoforms and evaluate their impact on PC-3 cells proliferation, adhesion and migration and the AKT-related effectors involved in regulating the aforementioned processes. We also used siRNA sequences to knockdown SHP-1 and analyse its contribution to the PI3K/AKT pathway regulation. **CONCLUSIONS:** AKT isoforms exert non-redundant roles with regard to cell cycle regulation. In this sense, AKT2 promotes CDK6/cyclin D1 complexes formation, through regulating cyclin expression. This isoform also controls pRb expression and cyclin E levels. AKT2 promotes p27 expression and its nuclear localization, too. Taken together, these results points to an AKT2-dependent cell cycle regulation in PC-3 cells, with no contribution of AKT1 or 3 in this role. On the other hand, AKT1 showed to be involved in the fine control of cellular adhesion and migration, by its interactions with effectors of paramount importance for those characteristics like FAK, small GTPases of Rho family and Src. Although two AKT isoforms presented differential roles, we did not observe any specific role for AKT3 in controlling PC-3 cells proliferation, adhesion or migration. With regard to SHP-1, we confirmed that this phosphatase regulates PI3K kinase activity, interacting specifically with AKT1, and affecting its activation. We also observed that its presence is necessary for the maintenance of complex platforms of signaling nucleated around Src, FAK, p85 and AKT1. In summary, our work demonstrated that SHP-1 is a new and key regulator of PI3K/AKT enzymatic function, and that AKT isoforms could be considered as an innovative therapeutic target for metastatic disease.

## ABREVIATURAS.

---

---

<b>BSA:</b> albúmina sérica bovina.	<b>PIP2:</b> Fosfatidilinositol bifosfato.
<b>CDK(s):</b> Quinasa(s) dependiente(s) de ciclina.	<b>PIP3:</b> Fosfatidilinositol trifosfato.
<b>CKI(s):</b> Inhibidor(es) de CDK(s).	<b>PLC:</b> Fosfolipasa C.
<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido.	<b>PLD:</b> Fosfolipasa D.
<b>ERK:</b> Quinasa regulada por señales extracelulares.	<b>pRb:</b> Proteína del retinoblastoma.
<b>FAK:</b> Quinasa de adhesión focal.	<b>PSA:</b> Antígeno específico prostático.
<b>FBS:</b> Suero fetal bovino.	<b>PTEN:</b> fosfatasa cuyo sustrato son los PIP3 para generar PIP2. Su nombre proviene del acrónimo en inglés <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i> .
<b>FDGF:</b> Factor de crecimiento derivado de fibroblastos.	<b>PTK:</b> Proteína tirosina quinasa.
<b>GAP:</b> Proteína activadora de la actividad GTPasa.	<b>PTP:</b> Proteína tirosina fosfatasa.
<b>GEF:</b> Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.	<b>SC:</b> Scrambled; ARN desordenado.
<b>GTPAsa:</b> guanosina trifosfatasa.	<b>Ser:</b> Serina.
<b>HRP:</b> Peroxidasa de rábano.	<b>SH:</b> Dominio de homología a Src.
<b>LY294002 (LY):</b> Inhibidor farmacológico de PI3K.	<b>siRNA:</b> ARN pequeño de interferencia.
<b>MEC:</b> Matriz extracelular.	<b>Thr:</b> Treonina.
<b>NLS:</b> Señal de localización nuclear.	<b>Tyr:</b> Tirosina.
<b>PBS:</b> Tampón fosfato salino.	<b>TGF<math>\beta</math>:</b> Factor de crecimiento tumoral $\beta$ .
<b>PDGF:</b> Factor de crecimiento derivado de plaquetas.	<b>VEGF:</b> Factor de crecimiento del endotelio vascular.
<b>PI3K:</b> Fosfatidilinositol 3 quinasa.	<b>W.B:</b> Western Blot.
<b>PH:</b> Dominio de homología a pleckstrina.	

# INTRODUCCIÓN.

---

### Aspectos clínicos.

El cáncer de próstata es una de las patologías malignas más frecuentes entre los varones de los países desarrollados y dada su incidencia se ubica en el segundo lugar tras el cáncer de pulmón, según datos de la Organización Mundial de la Salud. En la Unión Europea, en 2008 se diagnosticaron 338.700 casos, de los cuales 25.231 correspondieron a España. En ambos casos, éste tipo cáncer ocupa el primer lugar en niveles de incidencia aunque su mortalidad no es tan alta como la del cáncer de pulmón <sup>1</sup>. Las estimaciones para el año 2015 indican que seguirá siendo el de mayor incidencia (*International Agency for Research on Cancer - Informe Globocan*).

El adenocarcinoma prostático es una patología directamente relacionada con la edad, diagnosticándose más del 70% de los casos en pacientes de 65 años ó mas. Además, se ha demostrado la influencia de factores de riesgo en la aparición y desarrollo de éstos tumores como la presencia de carcinógenos en la dieta, la exposición a agentes infecciones que provoquen cuadros inflamatorios crónicos <sup>2</sup>, la historia familiar y la raza así como diversos factores ambientales <sup>3</sup>.

Existen diversas opciones para el tratamiento de los pacientes, cuya aplicación varía según el estadio de la enfermedad, aunque se suelen combinar en la búsqueda de una mayor eficacia terapéutica. Ellas son:

- ♦ Ablación androgénica.
- ♦ Radioterapia y quimioterapia.
- ♦ Prostatectomía radical.

Dado que el principal componente de los tumores prostáticos son células epiteliales secretoras, cuyo crecimiento está influenciado por andrógenos, la disminución de éstos permite la remisión de la enfermedad. Ésta disminución en los niveles de andrógenos circulantes se alcanza mediante la administración de agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH). Como resultado final el parénquima testicular disminuirá su producción de andrógenos. Sin embargo, ésta terapia no afecta a las células tumorales cuyo crecimiento no se encuentre influenciado por andrógenos por lo que, finalmente, la enfermedad vuelve a aparecer, comúnmente acompañada de metástasis <sup>4</sup>.

En realidad, la mayoría de los pacientes no muere como consecuencia de la acción tumoral prima-



ria, sino por su propagación a sitios distales. Estos tumores secundarios agravan la enfermedad, que en éste estadio cursa con dolores óseos, compresión de la médula espinal, fallo renal, anemia y un debilitamiento general del paciente <sup>5</sup>. Dado que actualmente no se cuentan con terapias efectivas, es de suma importancia comprender y analizar en profundidad los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de metástasis, con el objeto de describir nuevas dianas terapéuticas y diseñar tratamientos para ésta fase de la enfermedad.

## Metástasis.

La formación de tumores secundarios es un proceso en el cual interaccionan células tumorales y normales, microambiente celular e incluso características anatómicas y moleculares en el órgano diana. En el desarrollo y diseminación de las células tumorales se cumplen una serie de pasos que, en cierto sentido, constituyen una secuencia cuya integridad es necesaria para la formación de metástasis (figura 1) <sup>6</sup>:

**Desregulación del ciclo celular**, necesaria para producir un crecimiento progresivo que extienda la masa del tumor. Éste proceso incluye varias rondas de mutaciones, afectando especialmente a dos grupos de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores. Las alteraciones permitirán que se sigan acumulando nuevas mutaciones, provocando una inestabilidad genómica que favorece la aparición del fenotipo metastásico. En apartados posteriores veremos con mayor profundidad éste proceso.

**Angiogénesis extensiva**, dado el alto requerimiento de nutrientes y que éstos serán incapaces de llegar a las nuevas células formadas cuando el tumor supere algunos milímetros de extensión. En células normales, una miríada de inhibidores mantiene al endotelio en un estado de no proliferación. Sin embargo, tras la inestabilidad génica alcanzada en los tumores, se produce una pérdida de muchos de éstos mecanismos de inhibición, así como una liberación de factores proangiogénicos. Por ejemplo la pérdida de función de p53 está correlacionada con la pérdida de la expresión de trombospondina, un potente agente angiostático, en tanto que la activación de la quinasa Ras lleva a un incremento en la producción de VEGF, un poderoso angiogénico <sup>7</sup>.

**Invasión local** facilitada por la degradación de la matriz extracelular (MEC). Ésta degradación se alcanza por la capacidad de las células tumorales de producir metaloproteasas de matriz (MMPs). Se han descrito 23 MMPs, cuyas acciones se regulan por los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs). La generación de ratones *knockout* para distintos genes de MMPs y TIMs ha permitido demostrar el papel que juegan ambos tipos de proteínas en la adquisición de un fenotipo invasivo <sup>8</sup>.

**Diseminación** a través de los sistemas linfáticos y sanguíneo. En circulación se produce la formación de agregados celulares, que normalmente son destruidos, aunque finalmente algunos terminan

proliferando en los distintos vasos y extravasándose. Para que se produzca éste movimiento celular es necesaria la desregulación de los procesos celulares de adhesión y migración, aspecto que discutiremos más adelante en ésta Introducción.

**Proliferación** en el órgano diana. Si todos los pasos anteriores son completados, la nueva metástasis podrá comenzar nuevamente el ciclo indicado.

La figura 1 muestra un breve resumen de los apartados que hemos comentado.

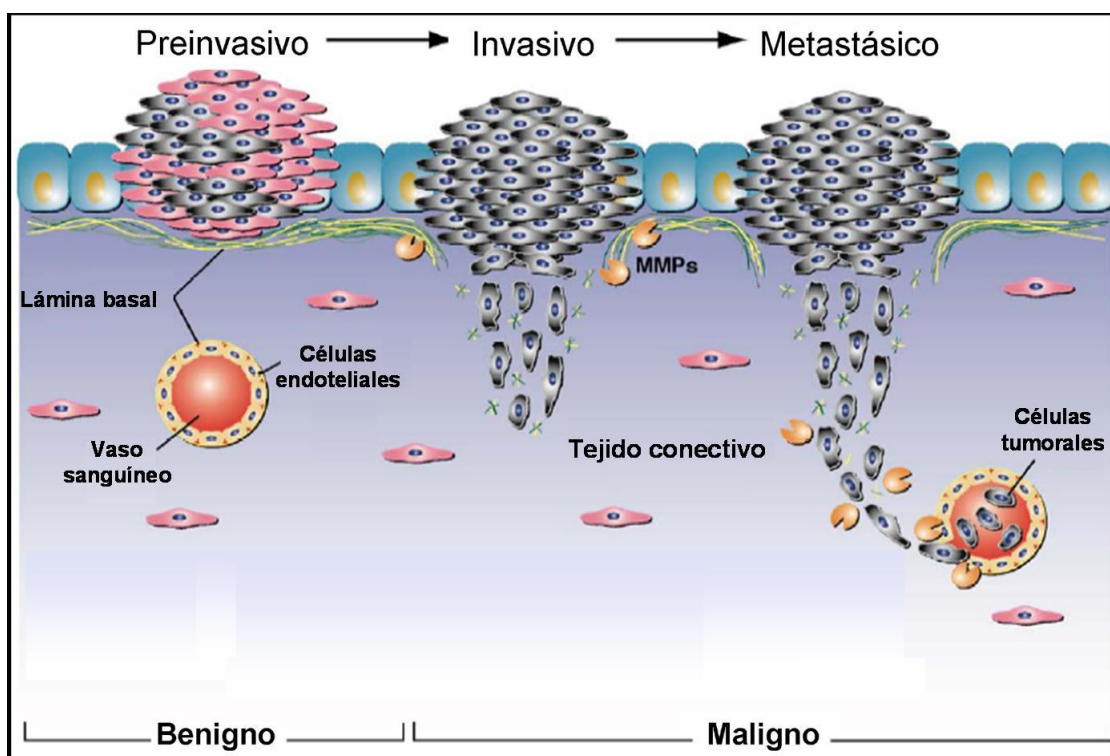


Figura 1: **Proceso metastásico**. La formación del tumor se alcanza tras rondas de mutaciones que permiten a las células proliferar descontroladamente, siendo capaces de obtener nutrientes a partir de vasos de nueva formación e invadiendo tras degradar las matrices extracelulares. Finalmente, las células tumorales logran establecerse y reproducirse en sitios distales, constituyendo las metástasis.

Desde que en 1889, Paget propuso que el proceso metastásico sólo es posible si ciertas células tumorales (*“las semillas”*) presentan cierta afinidad con el entorno celular de ciertos órganos (*“el suelo”*), se ha reconocido la extensa interacción entre las células tumorales y el microambiente celular de los órganos que albergan las metástasis, proponiéndose dicha interacción como una diana terapéutica de gran utilidad <sup>9</sup>.

# MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL.

---

## El ciclo celular.

El ciclo celular es un conjunto de eventos macromoleculares que se produce en eucariotas y que da como resultado la generación de células hijas, a partir de una célula progenitora. Evidentemente, un ciclo celular corresponderá al período de tiempo que va desde la mitosis de la célula inicial hasta la mitosis de la/s célula/s hija/s <sup>10</sup>. Ésta última definición pone en relieve el aspecto temporal y de orden en que se produce dicho ciclo, ya que el control preciso de éstos acontecimientos permite que las nuevas células formadas cuenten con todas las características genotípicas y fenotípicas presentes en la células que les dio origen <sup>11</sup>.

En el desarrollo del ciclo celular se pueden determinar dos grandes etapas:

- ♦ Una etapa de preparación previa a la división celular, denominada interfase.
- ♦ Una etapa de división celular propiamente dicha, denominada mitosis.

La interfase representa la mayor parte del ciclo celular e incluye tanto el tiempo necesario para preparar la replicación del DNA (denominada **fase G1**), como la replicación en sí misma (**fase S**) y un tiempo de preparación para la mitosis (**fase G2**). Las células también pueden alcanzar un estado de quiescencia (denominada **fase G0**) donde están metabólicamente activas, pero no progresan hacia la fase S ó hacia la división celular <sup>12</sup>.

Éste modelo de un ciclo celular por etapas debe incluir mecanismos de regulación del mismo asegurando que:

- ♦ ciertos eventos moleculares específicos se completen antes de que los eventos subsecuentes se inicien.
- ♦ una vez que un evento molecular es completado (por ejemplo la replicación del DNA) no vuelva a repetirse inapropiadamente.

Diversos trabajos de investigación han demostrado que tanto durante la interfase, como en la mitosis se establecen mecanismos de regulación que cumplen con las premisas anteriores. A éste conjunto de vías de señalización que supervisan la correcta progresión y finalización de eventos tempranos del ciclo

celular y que generan los retardos necesarios en respuesta a diversas anomalías (como por ejemplo los daños en el ADN ó la incorrecta alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial durante la mitosis), se les ha denominado simplemente *puntos de control* ó "*checkpoints*" del ciclo celular <sup>13</sup>.

Éstos puntos de control son, en general, mecanismos de retroalimentación que comprueban la integridad de los procesos moleculares que se desarrollan durante el ciclo celular y, en particular, durante el pasaje entre las distintas fases de la interfase y al llegar a la mitosis, evitando que el ciclo continúe adelante en caso de que las condiciones nutricionales, ambientales ó los eventos moleculares no sean los adecuados <sup>11</sup>. Si las condiciones son adecuadas, durante el desarrollo de la fase G1 y de la transición G1/S, las células alcanzarán un estadio denominado "*punto de restricción*", tras el cual el ciclo celular puede continuar sin necesidad de un estímulo mitogénico constante <sup>12</sup>.

### **Regulación del ciclo celular.**

Entre 1970 y 1980 una serie de experimentos comenzaron a echar algo de luz sobre el control de las transiciones entre las distintas fases del ciclo celular <sup>14,15</sup>. Así cuando se fusionaron células que se encontraban en fase G1 o G2 con células que se encontraban en fase S, las primeras comenzaron una replicación del ADN prematura. Además, las células resultantes de la fusión no entraron en mitosis hasta que los núcleos en G1 completaron la replicación de los ácidos nucleicos. Éstas observaciones permitieron comprender que las células contaban con "factores promotores de fase S" que actuaban solamente sobre células en fase G1 y que por otra parte éstos "factores" impedían la entrada en mitosis hasta la completa replicación del ADN <sup>14</sup>. Actualmente sabemos que los encargados de controlar el pasaje entre las distintas fases del ciclo celular son unos complejos enzimáticos formados por una subunidad reguladora, denominada ciclina, y una subunidad catalítica, denominada quinasa dependiente de ciclinas ó CDK.

Dada la complejidad de las regulaciones, resumidas de modo esquemático en la figura 2, nos centraremos en analizar los eventos moleculares especialmente implicados en el desarrollo y pasaje del punto de control G1/S, hasta alcanzar el "*punto de restricción*".

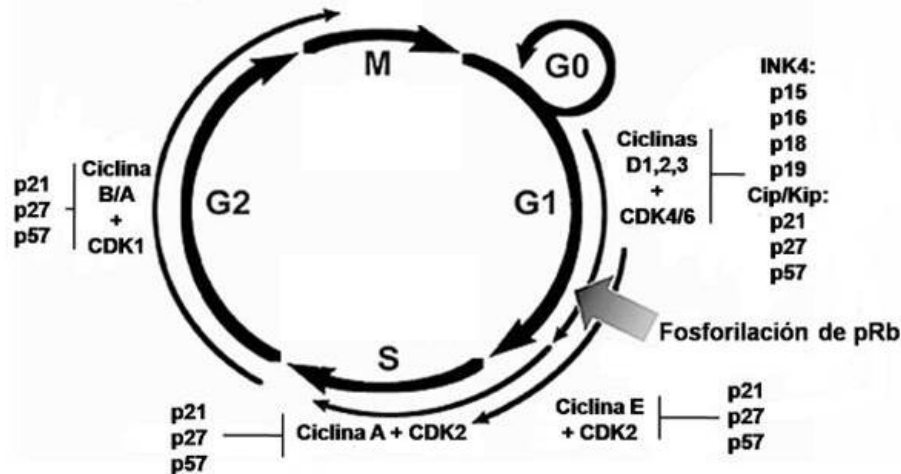


Figura 2: **El ciclo celular se encuentra finamente regulado.** Los factores que permiten la progresión del ciclo celular son los complejos ciclinas:CDK, en tanto que las familias INK4 y Cip/Kip se encargan de detenerlo. Tras la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, el ciclo puede continuar sin necesidad de estímulos mitogénicos. Éste punto de control se denomina "punto de restricción".

## CDKs

Se han descrito 11 genes que codifican CDKs con diferentes funciones, y otros 9 genes que codifican proteínas tipo CDK ("CDK-like"). Diversos estudios sobre mutaciones en levaduras y oocitos permitieron describir al primer miembro de ésta familia: CDK1<sup>16</sup>. Posteriormente fueron descritos diversas CDK con alta homología estructural a CDK1, como CDK2 y 3.

El pasaje entre las fases G1 y S se encuentra controlado por la acción de los complejos formados por las CDK2, 4 y 6, que tras su unión a sus respectivas parejas funcionales, actuarán fosforilando e inactivando a la proteína del retinoblastoma. Ésta fosforilación e inactivación se ha descrito como un evento trascendente para alcanzar y traspasar el punto de restricción<sup>17</sup>.

Otras CDKs, como CDK8 y CDK9, están principalmente relacionadas al control de la transcripción, e incluso formando parte de la ARN polimerasa II (CDK8). CDK7, unida la ciclina H y otras proteínas, actúa tanto sobre en el control de la transcripción (formando parte del factor de transcripción TFIIH) como actuando como quinasa activadora de CDK<sup>18</sup>. Éste grupo de CDKs no convencionales sirven como posibles mecanismos de regulación sobre procesos de transcripción y procesamiento del ARN de una manera dependiente de la progresión del ciclo celular<sup>19</sup>.

Se han generado ratones *knockout* para los principales CDKs implicados en el control del ciclo celular, demostrándose que, salvo para los ratones deficientes en CDK1 que presentaron una letalidad embrionaria, la falta del resto de CDKs genera animales viables, discutiéndose la posibilidad de efectos redundantes entre los miembros de la familia<sup>20</sup>. Por ejemplo, los animales que carecían de expresión de CDK6 presentaron una anemia muy grave, en tanto que el doble *knockout* para CDK4 y CDK6 generó una letalidad embrionaria, provocada por importantes defectos en el desarrollo del linaje eritropoyético. Se propone así que CDK4 compensa, al menos en parte, las funciones de CDK6, permitiendo

la supervivencia de los animales <sup>21</sup> .

### **Ciclinas de fase G1.**

Se han identificado al menos 29 genes que codifican proteínas relacionadas a ciclinas, las cuales comparten un dominio de 150 aminoácidos (“*cyclin box*”) responsable de su unión a CDKs. Su nombre proviene de su síntesis y degradación en función de la fase del ciclo celular aunque, para la mayoría de ellas, no se conoce con certeza si su síntesis y/o degradación es verdaderamente cíclica <sup>19</sup> . Para su estudio, se agrupan según el estadio del ciclo celular en que actúan. Así, las ciclinas D (1, 2 y 3) se consideran ciclinas de fase G1 inicial y media y las ciclinas E (1 y 2) se consideran de fase G1 tardía y de fase S <sup>10</sup> .

También para el caso de las ciclinas de G1 se han generado ratones *knockout*, demostrándose que la ablación de cualquiera de éstas ciclinas por separado permite el desarrollo de animales viables. Sólo cuando se eliminaron los dos genes de ciclina E ó se generaron ratones que sólo contaban con un tipo de ciclina D ó ninguno, los fenotipos fueron de letalidad embrionaria ó con supervivencia de pocos días. Nuevamente se propone la existencia de actividades redundantes entre los distintos tipos de ciclinas ya que el triple *knockout* para los genes de ciclina D reprodujo el fenotipo observado en los animales doble *knockout* CDK4/CDK6 <sup>22</sup> .

### **Complejos ciclinas:CDK y la regulación del ciclo celular.**

Actualmente se acepta un grupo de uniones “típicas” entre ciclinas y CDK, aunque estas correspondencias no son unívocas <sup>23</sup> : ciclina D tiene como pareja funcional a CDK4 ó CKD6, en tanto que ciclina E tiene como pareja a CKD2. Con respecto a las ciclinas mitóticas, tanto ciclina A como ciclina B se unen con CDK1.

Tras la formación de los complejos ciclina:CDK, éstos serán los responsables de controlar el pasaje entre las distintas fases, constituyendo en sí mismos un punto fundamental de regulación. Como vemos en la figura 3 su función es dependiente del estadio del ciclo celular.

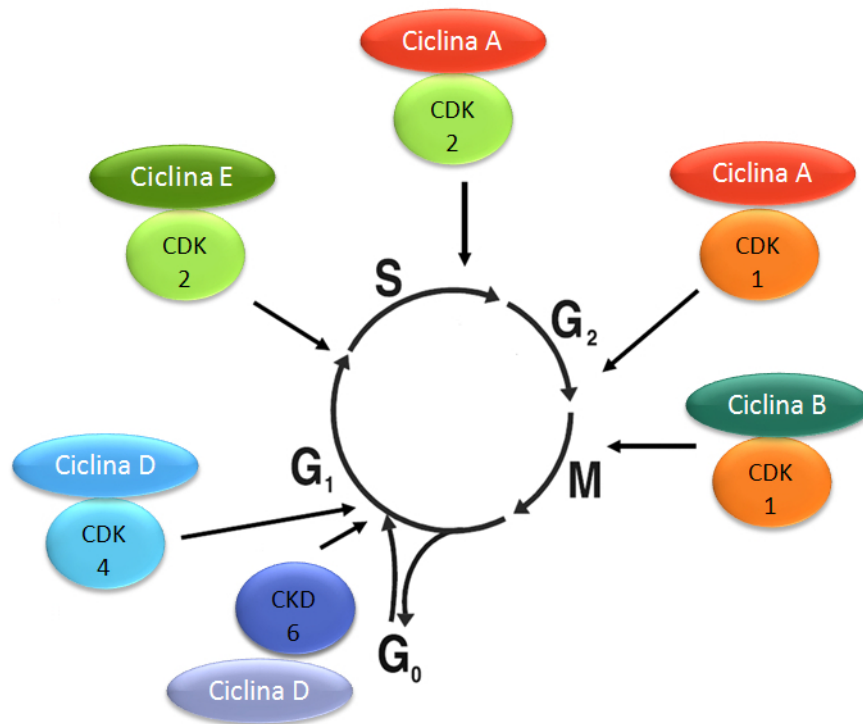


Figura 3: **Los complejos ciclinas:CDK y su distribución durante el ciclo celular.** Se han descrito complejos "típicos" de ciclinas y CDK específicos los cuales, además, ejercen sus funciones en fases específicas del ciclo celular, siendo necesaria la formación previa de los mismos para el ciclo progrese.

Los complejos ciclinas:CDK pueden ser regulados principalmente a través de:

1. La disponibilidad de ciclinas.
2. Fosforilación y desfosforilación de CDKs.
3. Unión de CKIs.

## Disponibilidad de ciclinas de G<sub>1</sub>.

### Síntesis de la ciclina D1.

Ciclina D1 es considerado un protooncogén y su unión con CDK4 y con CDK6, forma complejos activos que promueven el pasaje de la fase G<sub>1</sub> a S. Existen 3 formas de ciclina D (1, 2 y 3) y una forma truncada de ciclina D1, surgida por "splicing" alternativo, denominada D1 b<sup>24,25</sup>. El gen de la ciclina D1 se encuentra amplificado en un 15% de los casos de cáncer de mama y sobreexpresado un 30-50% de los casos<sup>25</sup>, habiéndose demostrado que la quinasa de adhesión focal (FAK) es capaz de regular los niveles de ciclina D1 a nivel transcripcional, conectando de éste modo las señales extracelulares mediadas por integrinas con el control del ciclo celular<sup>26</sup>. Además, el gen de ciclina D se encuentra reprimido por los factores de transcripción de la familia FOX-O<sup>27</sup>.

Por otra parte, se ha observado que el tratamiento de fibroblastos con concentraciones de rapamicina capaces de inhibir el complejo mTORC1, afecta la estabilidad del mRNA de ciclina D1 y provoca un

aumento en el recambio proteico de ésta ciclina, llevando finalmente a una disminución en los niveles proteicos totales <sup>28</sup>.

mTORC1 es capaz de regular la traducción de ciclina D a través de dos efectores aguas abajo:

- ♦ Por un lado, mTORC1 fosforila y promueve la degradación la proteína 4E-BP1/PHAS-1 (un inhibidor de la formación del complejo multimérico de traducción, eIF-4F) lo que permite el avance de la traducción de un grupo de mRNA que presentan un extremo altamente conservado denominado 5'-TOP (*5'-terminal oligopyrimidine tract*). Aunque entre éstos no se incluye el mRNA de ciclina D1, se supone que la gran porción 5'-UTR presente en su mRNA puede requerir una gran actividad helicasa (llevada a cabo por el factor eIF-4F), por lo que el tratamiento con rapamicina puede afectar seriamente su traducción <sup>29</sup>.
- ♦ Por otra parte, mTORC1 fosforila y activa a la quinasa p70S6K, la cual a su turno fosforila y activa la proteína ribosomal S6, que también permite el avance de la traducción de mRNAs con extremos 5'-TOP <sup>30</sup>. Ambos efectores están bajo el control directo de la vía PI3K/AKT como veremos en los capítulos siguientes.

### **Degradación de la ciclina D1.**

La degradación de la ciclina D también es un evento de suma importancia en la progresión del ciclo celular. En 1998, Diehl y cols. demostraron que la degradación de ciclina D1 mediada por el proteasoma era iniciada tras la fosforilación en la Thr286, que actuaba como un sitio de unión de ubiquitina, siendo GSK3 $\beta$  la responsable de ésta fosforilación <sup>31</sup>. Sin embargo, actualmente se conocen otras vías de degradación independientes de GSK3 $\beta$ , sobre todo activadas para la degradación proteasomal de ciclina D no unida a CDKs. En éste sentido, Germain y cols. demostraron que la ubiquitinación de ciclina D libre es independiente de la fosforilación en Thr286 <sup>32</sup> y recientemente se ha demostrado que la lisina 269 es un sitio aceptor de ubiquitinas y su presencia es fundamental para la degradación de ciclina D <sup>33</sup>.

La figura 4 muestra un esquema de las vías implicadas en el control de la síntesis y degradación de



ciclina D.

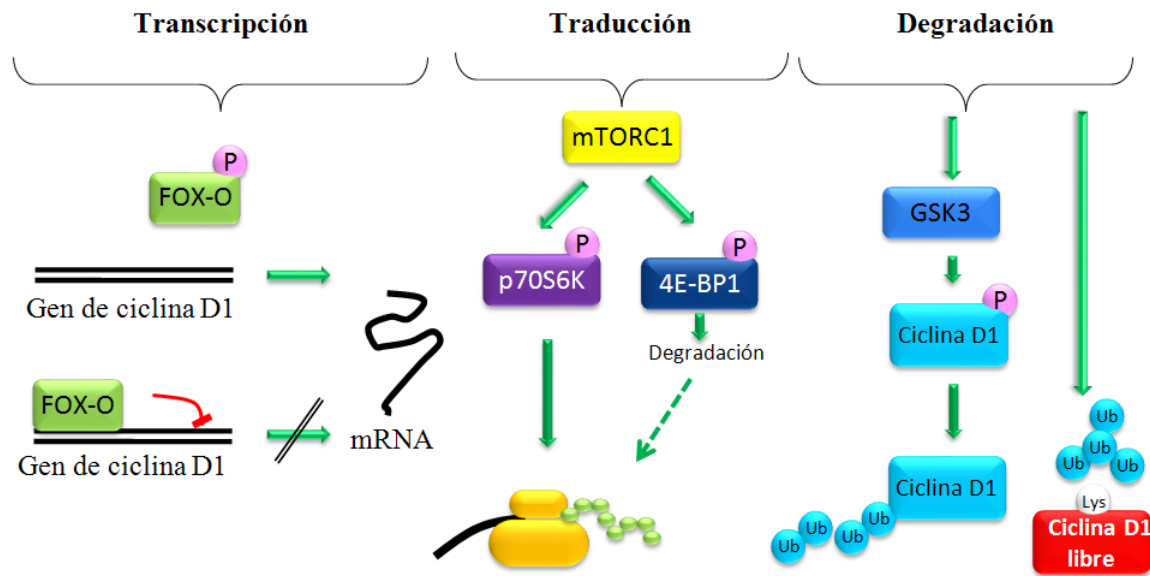


Figura 4: **Síntesis y degradación de ciclina D.** Se han descrito diversas vías metabólicas implicadas en la síntesis de ciclina D, siendo los factores de transcripción FOX-O los principales represores del gen, y por la naturaleza del gen su traducción es promovida por la vía de mTORC1. Por otra parte, la fosforilación de la Thr286 es de suma importancia para la actuación de las ligasas de ubiquitina, que marcarán a ciclina D para su degradación proteasomal. Con respecto a las vías independientes de GSK3, se ha demostrado que la presencia del residuo Lys269 en la ciclina D libre es fundamental para ser degradada por el proteasoma.

La ciclina D1 cumple un papel fundamental en la progresión del ciclo celular al unirse a su pareja funcional (CDK4 ó 6), fosforilando a la proteína del retinoblastoma. Ésta, en su estado hiperfosforilado, deja de actuar como un factor represor sobre la transcripción de diversos genes permitiendo así el avance del ciclo celular.

### La proteína del retinoblastoma.

La familia de la proteína del retinoblastoma está compuesta por tres miembros: pRb, el miembro más conocido, p107 y p130, todos con alta homología estructural. Se las denominó proteínas “*pocket*” (bolsillo) dados sus característicos dominios de interacción con (y secuestro por parte de) proteínas virales, así como con proteínas celulares normales<sup>34</sup>. Aunque p107 y p130 poseen sitios de unión a ciclinas y CDKs, dichos sitios no están presentes en pRb. Sin embargo, todos los miembros presentan múltiples sitios susceptibles de fosforilación por acción de los complejos ciclina:CDK<sup>35</sup>.

Las investigaciones con respecto al gen *RB1* permitieron ubicarlo como el paradigma de los genes supresores de tumores, ya que la pérdida de sus alelos se relacionó con la aparición y desarrollo del retinoblastoma heredado, un tipo de tumor del ojo presentado frecuentemente en niños<sup>36</sup>.

La actividad biológica de pRb se lleva a cabo mediante la interacción con los factores de transcripción E2F y sus parejas heterodiméricas, las proteínas DP. pRb se une a éstas proteínas, permitiendo el reclutamiento de otros correpresores y provocando la represión transcripcional de los genes regulados

por E2F. Sin embargo, la fosforilación en distintos residuos de pRb permite su desacople del complejo represor. Aunque no se conoce la secuencia exacta de fosforilaciones en los distintos residuos de pRb se ha propuesto que pueden provocar cambios conformacionales que finalmente llevan al desacople de pRb ó bien a la pérdida de interacciones con otras proteínas que permiten la formación de complejos represores<sup>37</sup>. Mientras pRb ejerza su acción represora el ciclo celular no avanzará y por ello pRb debe permanecer en un estado hiperfosforilado<sup>38</sup>.

Los responsables de éstas fosforilaciones son los complejos ciclina:CDK formados: los complejos ciclina D:CK4/6 en G1 y los complejos ciclina E:CDK2 en G1 tardía<sup>35</sup>. En la figura 5 se propone un modelo de regulación de pRb por parte de los complejos ciclina:CDK de la fase G1.

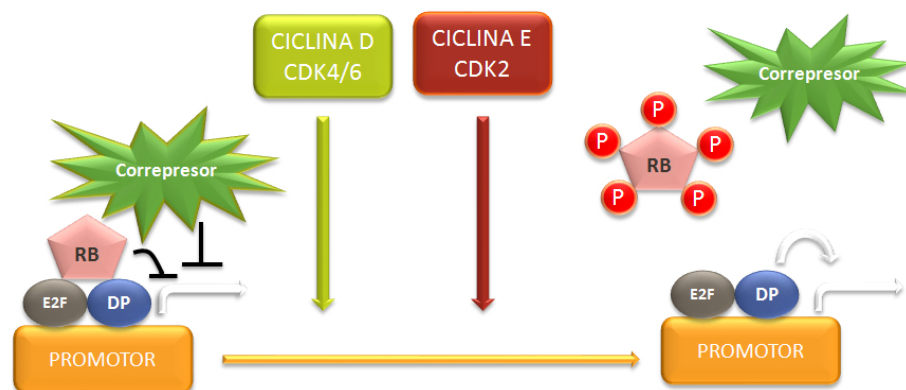


Figura 5: **Función de pRb durante el ciclo celular.** pRb se une a los factores de transcripción E2F y a su subunidad asociada DP, reprimiendo la transcripción mediada por E2F gracias al reclutamiento a nivel de los promotores de complejos remodeladores de la cromatina, los denominados correpresores, tales como histonas desacetilasas, metilasas, etc. Cuando la célula entra en el ciclo celular, pRb es fosforilado por CDK4, CDK6 y CDK2 y en su estado hiperfosforilado va a liberar a los factores E2F, permitiendo que éstos activen la transcripción de sus genes diana.

### Síntesis y degradación de ciclina E.

El gen de la ciclina E es uno de los regulados por los factores de transcripción E2F, lo que le convierte tanto en un producto como en un regulador en la vía de pRb<sup>39</sup>. Como acabamos de mencionar, ciclina E se unirá a CDK2 y el complejo formado fosforilará e inactivará pRb permitiendo la progresión del ciclo celular<sup>40</sup>.

En células normales la vida media de ciclina E ronda los 30 minutos, siendo alcanzada la periodicidad en sus niveles regulando la degradación proteasomal de la proteína<sup>41,42</sup>. La fosforilación en el residuo Thr308 (un sitio de autofosforilación en ciclina E) permite la interacción con Skp2, una ligasa de ubiquitina, iniciando su degradación. Posteriormente se ha descrito que otra ligasa de ubiquitinas, denominada Fbw7 y cuya interacción se produce con los complejos ciclina E:CDK2, también permite la degradación proteasomal de ciclina E<sup>43,44</sup>.

Con respecto a las funciones de ciclina E en el control del ciclo celular, estudios recientes utilizando

ratones que carecían de genes de CDK2, han demostrado que el ciclo celular es posible, mediante la regulación ejercida por los complejos ciclina E:CK1, apoyando nuevamente la existencia de funciones redundantes entre los complejos ciclina:CDK <sup>45</sup>.

En tejidos tumorales se han descrito distintas alteraciones de la ciclina E, como la amplificación de su gen, sobreexpresión de la proteína y cambios de su localización subcelular. Todas éstas modificaciones se han demostrado implicadas en el desarrollo tumoral <sup>46</sup>.

## Fosforilación y desfosforilación de CDK.

La fosforilación en residuos de Thr específicos de las CDKs, permite su completa activación. Así, en el caso de CDK1 es necesaria la fosforilación en el residuo Thr161, y en los casos de CDK2 y 4, en los residuos Thr160 y Thr 172 respectivamente. Las quinasas activadoras de CDK, como el caso de CDK7, median ésta fosforilación <sup>47</sup>.

Por otra parte, la fosforilación en algunos residuos de Tyr, como la Tyr15 de CDK1 y 2 ó la Tyr17 de CDK4 provocan la inhibición de la actividad de las CDK. Las fosforilaciones anteriormente indicadas son catalizadas por la quinasa Wee1/Mik1. Completando ésta fina regulación se encuentran las fosfatasas de especificidad dual de la familia de CDC25, que se encargan de desfosforilar las tirosinas de los dominios de unión de ATP de las CDK, contrarrestando la inhibición provocada por Wee1/Mik1 <sup>48</sup> (figura 6).

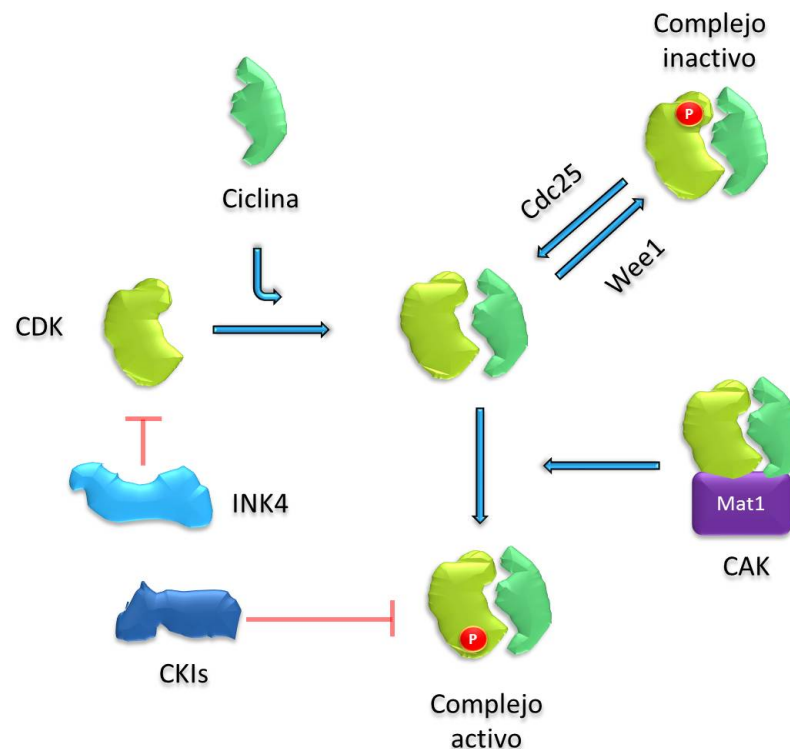


Figura 6: **Fosforilación y activación de CDK.** La fosforilación en Tyr de CDKs de fase G1, por la quinasa Wee, provoca incapacidad de unión de dichas CDKs a las ciclinas. La fosfatasa Cdc25 revierte ésta fosforilación, pero para la formación del complejo es necesaria otra fosforilación en residuos de Thr, mediada por las quinasas activadoras de CDKs (CAK). Los inhibidores de la familia Cip/Kip se unirán a los complejos formados, inhibiendo su acción, en tanto que los de la familia INK4 harán lo propio sobre las CDKs. Tomado de Malumbres y cols., 2005 <sup>19</sup>.

## Unión de CKIs.

La capacidad de los complejos ciclina:CDK para controlar el desarrollo del ciclo celular cuenta con otro nivel de regulación en la unión de proteínas inhibidoras a dichos complejos. Se han descrito dos familias de inhibidores denominadas: INK4 y CiP/Kip. La primera familia está compuesta por las proteínas denominadas  $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4b}$ ,  $p18^{INK4c}$  y  $p19^{INK4d}$  que ejercen su acción uniéndose directamente a CDK4 y CDK6, evitando así su unión a ciclina D.

Una característica peculiar en la estructura génica de ésta familia es el locus INK4a/ARF (representado en la figura 7), donde un exón es compartido por dos genes que codifican proteínas inmunológicamente distintas. Así la proteína  $p16^{INK4a}$  está codificada por los exones  $1\alpha$ , 2 y 3 en tanto que la proteína  $p19^{ARF}$  está codificada por el exón  $1\beta$  (que se encuentra 13 kb aguas arriba del exón  $1\alpha$ ) y el exón 2 pero con un marco de lectura alternativo.  $p19^{ARF}$  es capaz de interactuar con Mdm2 y provocar una parada tanto en G1 como en G2.

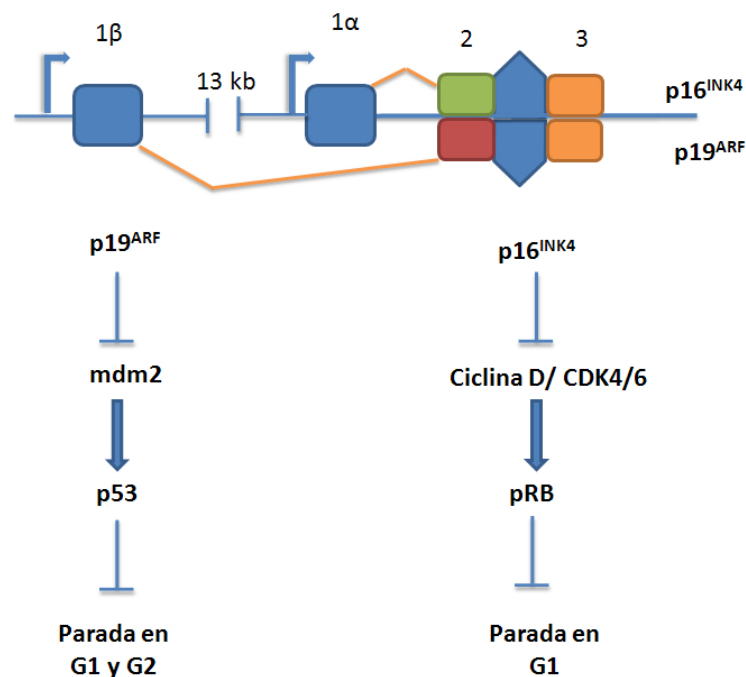


Figura 7: **Locus INK4a/ARF.** La organización de éste locus es sorprendente en células de mamíferos, ya que recuerda a la estructura de los genes virales. Con respecto al producto  $p16^{INK4}$ , el producto  $p19^{ARF}$  utiliza el exón  $1\beta$ , ubicado 13 kb aguas arriba del exón  $1\alpha$  utilizado por  $p16^{INK4}$  y además utiliza un marco de lectura alternativo del exón 2 ("Alternative Reading Frame"). De su correcto funcionamiento dependen funciones antioncogénicas de tal importancia que se le considera la "segunda línea de defensa" celular, tras p53. Tomado de Roussel, 1999<sup>49</sup>.

Los fenotipos de ratones *knockout* para éste locus han permitido clasificar a  $p19^{ARF}$  como un importante gen supresor de tumores<sup>49</sup> por lo que la integridad de éste locus ésta considerado como una de las principales defensas antioncogénicas, sólo comparable a p53<sup>50</sup>.

La segunda familia está compuesta por tres integrantes: p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> y p57<sup>kip2</sup>, que actúan uniéndose a los complejos ciclina:CDK, principalmente en el pasaje G1/S, aunque también actúan en otras fases del ciclo celular.

### El inhibidor de CDK p27<sup>kip1</sup>.

Dada la acción de p27<sup>kip1</sup> (en adelante p27) sobre los complejos ciclina:CDK se le ha atribuido un papel como supresor de tumores. De hecho, en varios tipos de neoplasias su expresión se encuentra disminuida<sup>51</sup>. Sin embargo, estudios recientes atribuyen a p27 características oncogénicas, relacionadas con su localización subcelular y su capacidad anexa de regular la reorganización del citoesqueleto<sup>52,53</sup>.

La proteína p27 presenta dos regiones principales, un extremo N-terminal donde residen los sitios de unión con los complejos ciclinas:CDK y un dominio C-terminal que es capaz de interactuar con distintas proteínas implicadas en procesos no relacionados directamente con el control del ciclo celular, como la unión con RhoA, Rac y otras<sup>54</sup>.

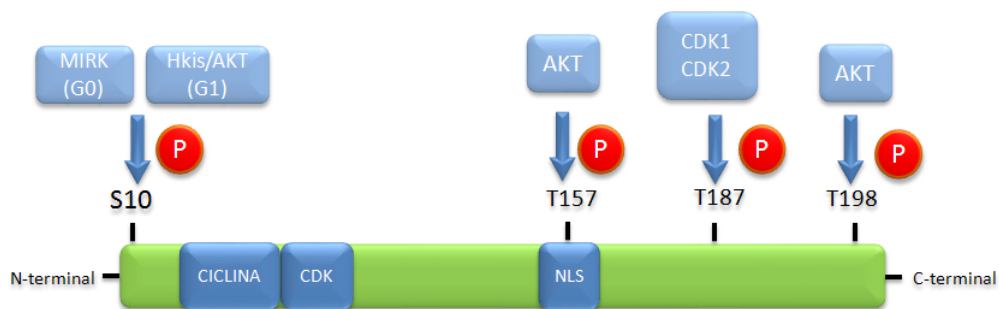


Figura 8: **p27<sup>kip1</sup>: Estructura, sitios de fosforilación y quinasas implicadas.** Las fosforilaciones en residuos de Thr ó Ser de p27 son clave en la regulación de su localización subcelular así como en su estabilidad, dependiendo su funcionalidad del estadio del ciclo en que se encuentre la célula. Adaptado de Vervoorts y cols., 2008<sup>51</sup>.

La regulación de p27 es un punto crucial en la progresión del ciclo celular y se lleva a cabo en 3 puntos distintos:

**a) Regulación transcripcional de p27:** los principales implicados en la regulación transcripcional de p27 son los miembros de la familia de factores de transcripción FOX-O<sup>55</sup>, que actúan como moduladores positivos de su expresión. En éste sentido se ha demostrado que FOXO3a es el principal regulador de la expresión de p27 en el caso de líneas hematopoyéticas<sup>56</sup>. También se ha descrito la implicación de otros factores como c-myc y E2F1 cuyo papel en la regulación transcripcional no parece ser tan determinante como en el caso de los FOX-Os<sup>54</sup>.

**b) Regulación de la estabilidad proteica de p27:** la estabilidad proteica de p27 ha sido relacionada a la fosforilación en el residuo Ser10 de la molécula. Sin embargo, ésta hipótesis sólo parece

ser cierta en el caso de las células que se encuentran detenidas en fase G0 ya que en células que se dividen normalmente, la fosforilación en la Ser10 promueve la salida de p27 desde el núcleo hacia el citoplasma, donde p27 es sustrato del complejo KPC (una ligasa de ubiquitinas), marcándolo para su degradación proteasomal, durante la primera parte de la fase G1<sup>57</sup>. Éstos datos indican que la fosforilación en la Ser10 durante G1 cumple papeles fisiológicamente distintos a los cumplidos en células en G0<sup>51</sup>.

Durante el final de G1 y el inicio de la fase S los niveles de p27 disminuyen, a la par que aumenta el número de complejos ciclina E:CDK2. Se ha demostrado que para que se produzca la correcta degradación de p27 en ésta transición es necesaria la fosforilación en el residuo Thr187<sup>58</sup>. Ésta fosforilación está mediada por los complejos ciclina E:CDK2 y permite el reconocimiento de p27 por Skp2, que forma parte de un complejo de ubiquitinilación, llevando al CKI a la degradación proteasomal<sup>59</sup>.

**c) Regulación de la localización subcelular de p27:** éste es un punto primordial de regulación, ya que cambios en su localización subcelular fueron implicados en el mal pronóstico de distintos cánceres<sup>60</sup>. Evidentemente para que p27 cumpla sus funciones de inhibición del ciclo celular debe encontrarse en el núcleo y para ello cuenta con una NLS situada hacia su extremo C-terminal, que es regulada por fosforilación. Así, las fosforilaciones tanto en el residuo Thr157 como en el residuo Thr198, por AKT imposibilitan la localización nuclear de p27<sup>61,62</sup> ya que dicha fosforilación genera un sitio de unión con las proteínas 14-3-3 citosólicas, provocando un secuestro de p27 en éste compartimento<sup>63</sup>. También, y como indicábamos anteriormente, se ha demostrado que la fosforilación en la Ser10 por la quinasa hKIS favorece la salida de p27 desde el núcleo al citoplasma<sup>64</sup>.

Por otra parte, y ya fuera del núcleo, p27 presenta algunas funciones relacionadas con la reorganización del citoesqueleto. Más precisamente inhibiendo la ruta de la GTPasa pequeña, RhoA<sup>53</sup>. p27 también cumple funciones en el citoplasma promoviendo el ensamblaje de complejos ciclina D: CDK4/6<sup>65</sup>.

Para finalizar la figura 9 presenta un resumen de las principales regulaciones observadas en el metabolismo de p27.

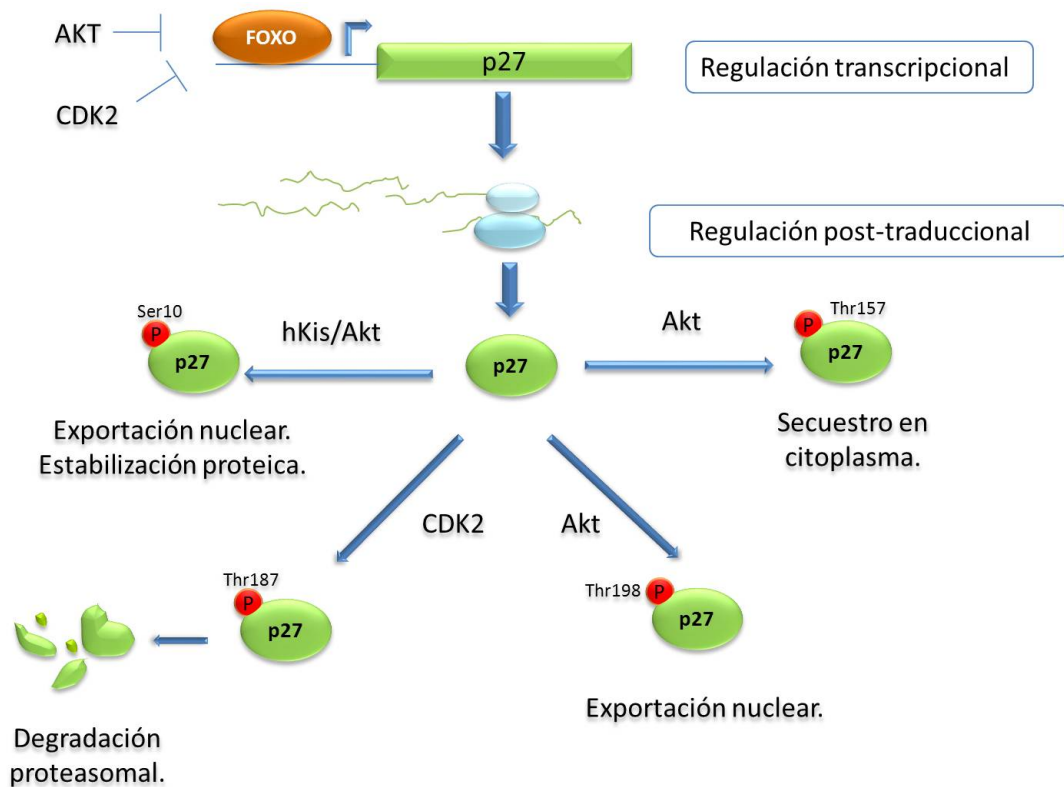


Figura 9: **Principales mecanismos de regulación de p27.** El gen de p27 se encuentra regulado por acción de los factores de transcripción FOX-O. Tras su transcripción y traducción, p27 sufre modificaciones postraduccionales fundamentales en la regulación de su localización subcelular, así como para asegurar su estabilidad proteica.

## Regulación de la transición G1/S.

Intentando completar el cuadro de la regulación del pasaje G1/S exponemos un modelo resumido de lo que puede llegar a ocurrir, aunque no necesariamente en éste orden estricto (figura 10) <sup>24</sup> :

Tras los estímulos mitogénicos los complejos ciclina:CDK de fase G1 temprana comenzarán a formarse. Su ensamblaje además estará auxiliado por la presencia de CKI citoplasmáticos.

Tras su formación, los complejos ciclina D: CDK4/6 fosforilarán a la proteína pRb. Ésta, en su estado hiperfosforilado, dejará de ejercer su actividad represora sobre los factores de transcripción E2F promoviéndose así la transcripción de diversos genes, entre los que se encuentra el de la ciclina E.

Los complejos ciclina E:CDK2 se encargarán de fosforilar a p27, marcándolo para su degradación proteasomal.

Así, la degradación de los CKI y la inducción de la transcripción de ciclinas, contribuirá a que el ciclo celular alcance el punto de restricción, tras el cual se desarrollará independientemente de estímulos mitogénicos.

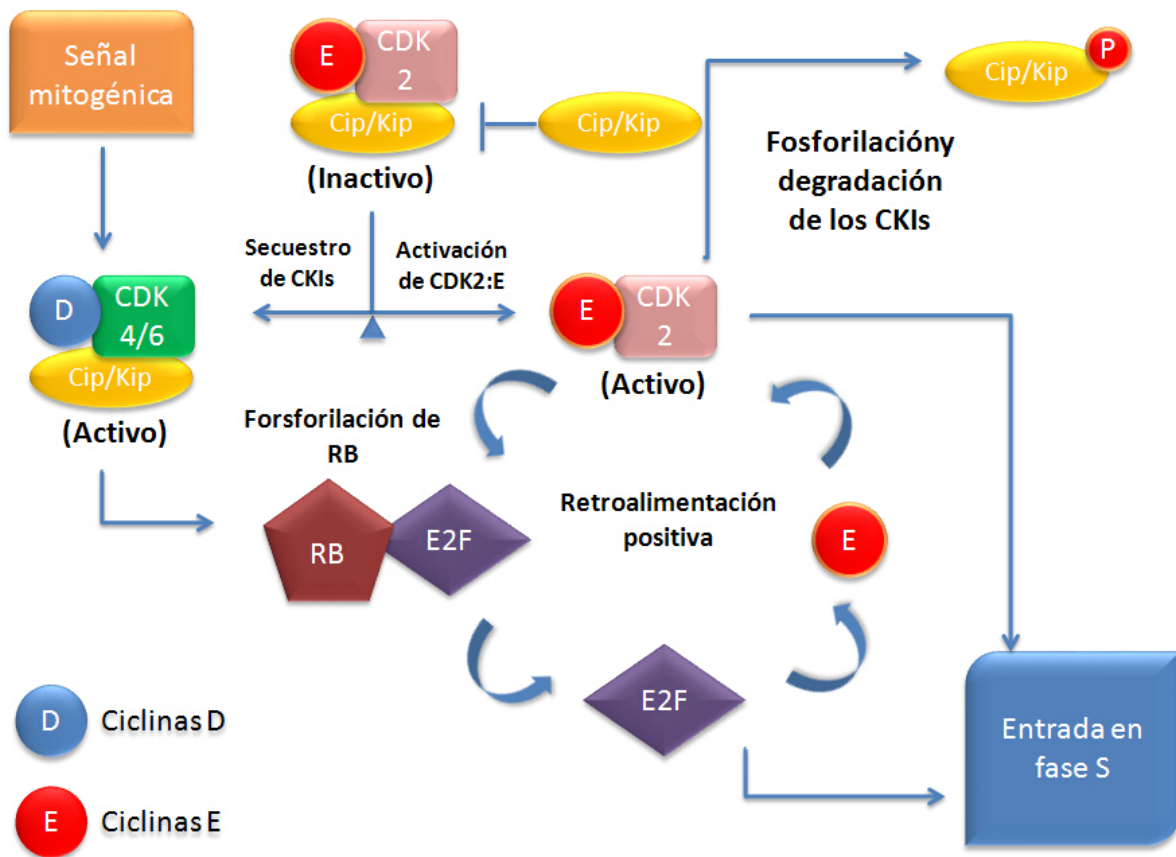


Figura 10: **Regulación de la transición G1/S.** En respuesta a las señales mitogénicas se formarán los complejos ciclina D: CDK4/6 (inicialmente estabilizados por proteínas de la familia Cip/Kip). Éstos complejos formados serán capaces de fosforilar a pRb, permitiendo cambios conformacionales que eliminarán su acción represora sobre el gen de ciclina E y sobre genes de diversos factores promotores de entrada en fase S (entre otros). Tras la generación de nueva ciclina E, ésta formará complejos con CDK2, los cuales mantendrán el estado de hiperfosforilación de pRb, generando un bucle de retroalimentación positiva. Además los complejos ciclina E:CDK2 son los encargados de fosforilar y permitir la degradación de los miembros de la familia Cip/Kip. Tomado de Sherr y Roberts, 1999<sup>24</sup>.



## **MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA MIGRACIÓN Y ADHESIÓN CELULAR.**

---

Para que una célula tumoral pueda provocar metástasis en sitios distales debe adquirir la capacidad de separarse de su tejido de origen, adherirse a nuevas membranas basales y migrar a través de los vasos para alcanzar una nueva localización. La capacidad migratoria de una célula está gobernada por complejas vías de señalización pero la plasticidad celular permite la existencia de diferentes modos de migración, que incluyen a células individuales ó a grupos celulares. Refiriéndonos a la migración de células individuales, y aunque la clasificación sea arbitraria, se han propuesto dos modelos fundamentales: la migración mesenquimal, y la migración ameboide, los cuales dependen tanto de las características celulares como de la propia MEC <sup>66,67</sup>. Aunque también se han observado “filas indias” de células individuales migrando en tejidos tumorales (un fenómeno conocido como “migración en cadena”), durante esta introducción nos referiremos en todo momento a eventos moleculares y efectores relacionados al primer modelo.

El modelo de migración mesenquimático es un ciclo constituido por 4 pasos interdependientes (figura 11) <sup>68</sup>:

- 1º) La célula se polarizará y formará protrusiones en la zona de avance.
- 2º) Adhesión a la MEC mediante la formación de contactos focales.
- 3º) A continuación, regiones de la zona delantera se contraerán por la formación de fibras de actomiosina generando fuerzas de tracción.
- 4º) Separación del extremo posterior, lo que permitirá un avance gradual del cuerpo celular.

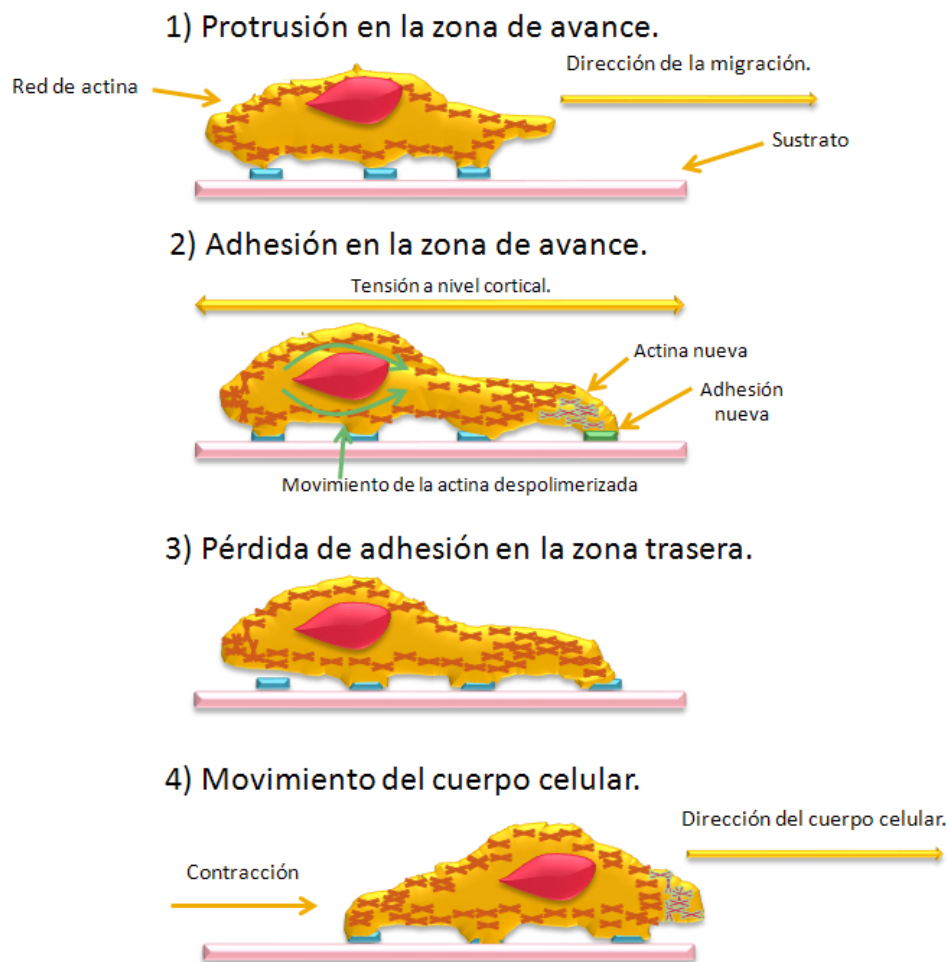


Figura 11: **Migración celular.** Tras su polarización, la célula emitirá un pseudópodo que le permitirá interactuar con su sustrato en la zona de avance. Posteriormente se perderán las adhesiones de la zona trasera y se generarán fuerzas de tracción que permitirán el desplazamiento del cuerpo celular.

## Contactos célula-matriz.

Desde el punto de vista molecular, la migración mesenquimal se inicia con proteínas presentes en las membranas celulares denominadas integrinas las cuales contactan, en zonas puntuales de la célula, con proteínas de la MEC. Tras éstos contactos, se produce una nucleación de diversas proteínas (con funciones adaptadoras ó enzimáticas) alrededor de las integrinas. Estas interacciones moleculares darán como resultado final una reorganización del citoesqueleto que permitirá la migración celular.

Los contactos más simples que se establecen entre las matrices y las células se denominan **complejos focales** y están constituidos por grupos de integrinas interactuando con algunas moléculas, como la proteína adaptadora talina ó FAK. Son interacciones de rápido recambio, que suelen durar pocos segundos, aunque pueden aumentar su tamaño durante algunos minutos, estabilizándose (“madurando”) y generando los denominadas **contactos (ó adhesiones) focales**. Éstas son estructuras que, además de estar compuestas de las integrinas, talina y FAK, incluyen proteínas que permiten el acople del contacto al citoesqueleto de actina, proveyendo estabilidad mecánica y permitiendo la generación de fuerzas de tracción, necesarias para la migración de la célula<sup>69</sup>. Durante el desarrollo de los contactos

focales (e incluso antes), la presencia de proteínas de entrecruzamiento, tales como la  $\alpha$ -actinina, promueve la elongación y empaquetamiento de los filamentos de actina, los que en presencia de miosina II permitirán el movimiento celular <sup>70</sup>.

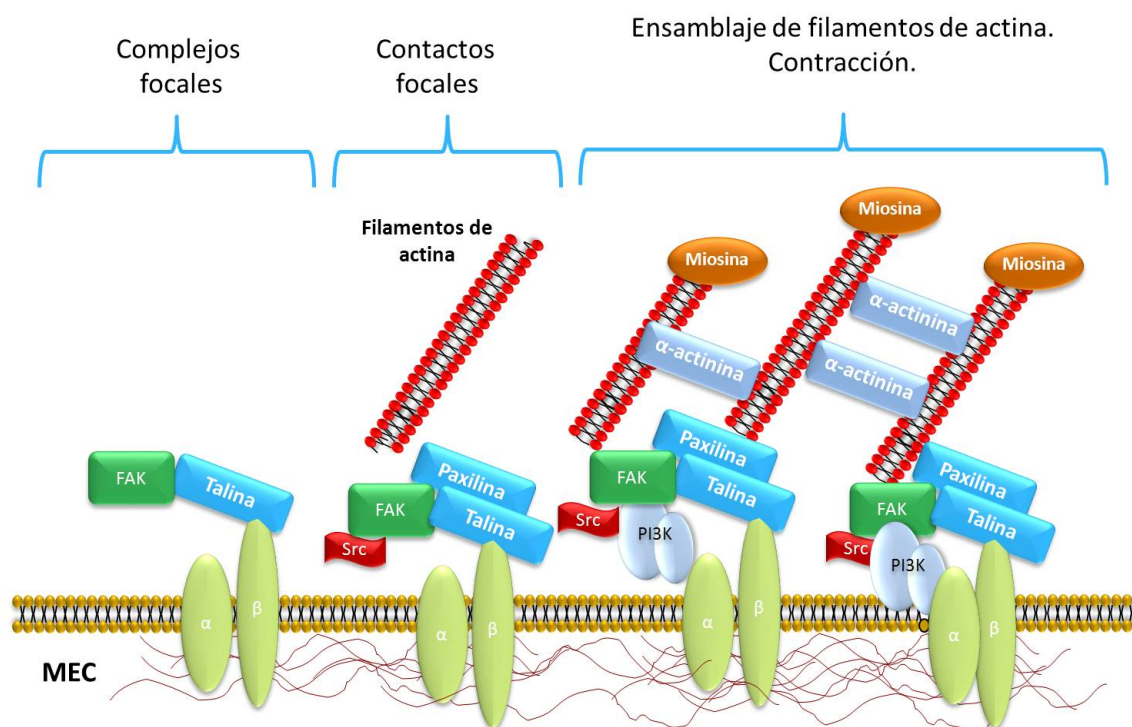


Figura 12: **Diversas estructuras implicadas en los contactos célula-matriz.**

### Integrinas.

Las integrinas son receptores heterodiméricos presentes en la superficie celular conectadas a través de diversas proteínas de anclaje al citoesqueleto de actina. Están constituidas por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , habiéndose descrito 24 tipos de integrinas diferentes, constituidas por la combinación de 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ . Aunque las integrinas carecen de actividades enzimáticas (y en consecuencia no son capaces de transformar células, no pudiendo ser consideradas como oncogenes), sí pueden cooperar con productos derivados de oncogenes ó receptores de tipo tirosina quinasa para promover la tumorigénesis, sobre todo por el entrecruzamiento de las señales transducidas por las integrinas, los factores de crecimiento y las citoquinas <sup>71</sup>.

Tras la interacción de las integrinas con los componentes de la MEC se produce un agrupamiento de las mismas, generándose una plataforma, a la cual se unirán diferentes intermediarios desencadenando múltiples respuestas celulares. Al menos 50 proteínas diferentes se han identificado formando parte del control de la adhesión, así como de la regulación de su estabilidad y dinámica <sup>72</sup>, por ello solamente expondremos características de algunas cuyas funciones se han demostrado como primordiales: la quinasa de adhesión focal (FAK), la quinasa Src y las GTPasas pequeñas de la familia Rho <sup>73</sup>. Otra enzima de capital importancia en el dinamismo del movimiento celular es la **fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)**, cuya descripción en detalle veremos en la siguiente sección de ésta Introducción

## La quinasa de adhesión focal (FAK)

FAK es una enzima de 125 kDa que pertenece al grupo de las tirosina quinasa no receptores y que se encuentra formando parte tanto de los contactos como de las adhesiones focales. Su alteración se ha relacionado al desarrollo y progresión tumoral<sup>74</sup> y también se ha descrito como fundamental en fenómenos de migración en distintas líneas celulares, incluyendo las provenientes de metástasis prostática<sup>75</sup>.

Desde el punto de vista estructural, se reconocen tres dominios principales en FAK (figura 13):

1. El dominio FERM, ubicado en el extremo N-terminal que permite la interacción con los dominios citoplasmáticos de las integrinas. Además, en células suspendidas, el dominio FERM estaría interaccionando con el dominio quinasa, evitando la autofosforilación de FAK. Al producirse la adhesión, el dominio FERM interactuaría con los dominios citoplasmáticos de las integrinas, liberando la inhibición ejercida sobre el dominio quinasa y permitiendo la activación de FAK<sup>76</sup>.
2. El dominio quinasa, donde se encuentran varios residuos de tirosina que pueden ser fosforilados. Tras la interacción entre las integrinas y la MEC, FAK rápidamente se autofosforila en su residuo Tyr397. Diversas proteínas con dominios SH2 pueden interactuar con esta tirosina fosforilada, activando vías de señalización celular. Entre ellas destaca la quinasa Src<sup>77</sup>, la cual es la responsable de fosforilar otras tirosinas de FAK, especialmente las 576, 577 y 861. Todas estas fosforilaciones permitirán la máxima activación de FAK.
3. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio FAT ("**Focal Adhesión Targeting**") que es fundamental para la correcta localización de FAK en los contactos focales. Se ha demostrado que la fusión de éste fragmento a otras proteínas es suficiente para localizarlas en los contactos focales<sup>78</sup>. Aunque el dominio FAT pueden interactuar con los dominios citoplasmáticos de las integrinas, se ha demostrado que la interacción es indirecta y mediada por proteínas asociadas a integrinas, como talina. Por otra parte, la fosforilación en la Tyr925 presente en éste dominio, permitirá la interacción entre FAK y la proteína adaptadora Grb2 y servirá como un nexo de unión entre ésta vía y la vía de las MAP quinasa<sup>79</sup>.

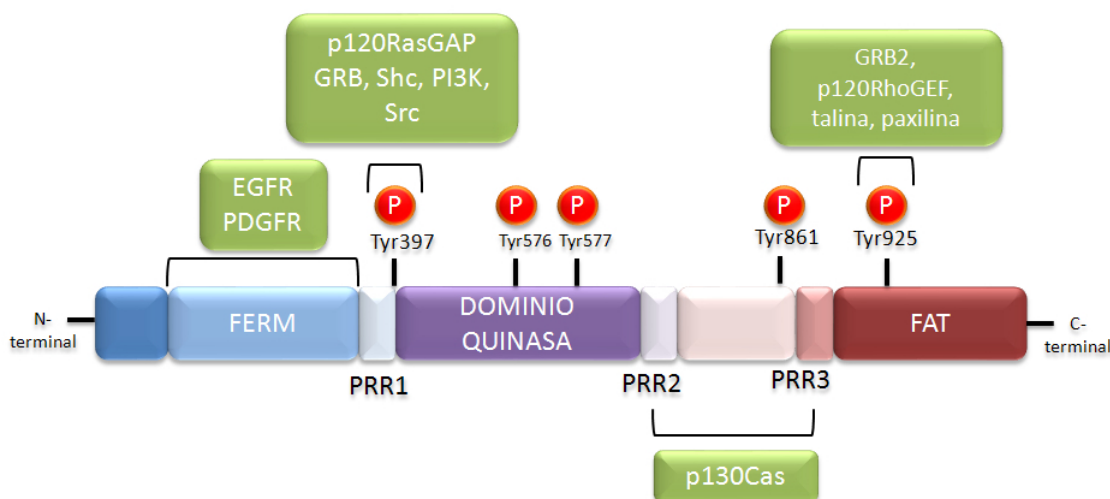


Figura 13: **Estructura de la quinasa de adhesión focal (FAK)**. Los distintos dominios pueden interactuar con diversos sustratos regulando múltiples vías de señalización celular. Muchas están implicadas en procesos de adhesión y migración, en tanto que otras interrelacionan las señales extracelulares con el interior celular. Adaptado de Mitra y cols., 2005<sup>80</sup>.

FAK también presenta tres dominios ricos en prolina (PRR1, 2 y 3) que le permite la interacción con proteínas que presenten dominios SH3. Cercano al dominio PRR3 se encuentra el residuo de Tyr861, cuya fosforilación se ha demostrado fundamental en el incremento de la migración celular<sup>81</sup>.

La interacción entre FAK y Src permite la máxima activación de la primera, siendo capaz de fosforilar a diversos efectores. Entre ellos destaca la proteína p130Cas, que mediante sus dominios SH3 interactuará con FAK, y tras la fosforilación de residuos de tirosina podrá unir a la proteína adaptadora Crk, así como a otros GEFs de Rac y Rho, activando de ésta manera a las GTPasas pequeñas de la familia Rho con la consiguiente formación de protrusiones necesarias para la migración.

### Src.

Como indicáramos anteriormente, Src es responsable de la fosforilación de FAK. Sin embargo, su espectro de actuación es mucho mayor y en éste trabajo consideraremos sus implicaciones en cuanto a la adhesión y la migración celular.

Src forma parte de una familia más extensa de quinasas, que consiste en 8 miembros divididos en dos grupos<sup>82</sup>:

- ◆ Las quinasas relacionadas con Src, que incluyen a Src, Fyn, Yes y Fgr.
- ◆ Las quinasas relacionadas con Lyn, que incluyen a Lyn, Hck, Lck y Blk.

En cuanto a su estructura, todas éstas quinasas comparten un grupo de dominios similares<sup>83</sup>:

1. Un dominio SH4, ubicado en el extremo N-terminal que consta de 15 a 17 aminoácidos y contiene señales para que se produzcan modificaciones lipídicas, que permitirá su unión a la membrana plasmática.

2. Un dominio propio, poco conservado en cada uno de los integrantes de la familia, siendo el posible responsable de la interacción específica de las quinasas con sus sustratos.
3. Un dominio SH3, cuya presencia permite la unión de las quinasas a regiones ricas en prolinas presentes en sus sustratos, a la vez que juega un papel de suma importancia en la regulación de la actividad catalítica de las mismas.
4. Un dominio SH2, cuya característica principal es su capacidad de permitir las interacciones con otras proteínas que presenten residuos de tirosinas fosforiladas.
5. El dominio quinasa, responsable de la actividad catalítica. En el caso de Src en éste dominio se encuentra el residuo Tyr419, cuya fosforilación es necesaria para que la quinasa alcance su máxima actividad.
6. Una región C-terminal que presenta un papel regulador sobre la actividad enzimática. En el caso de Src la fosforilación del residuo Tyr530 presente en ésta región, induce la inhibición de su actividad quinasa.

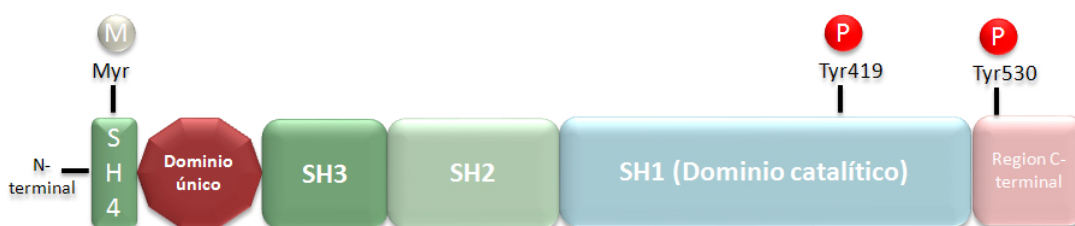


Figura 14: **Estructura de la quinasa Src.** Adaptado de Tatosyan, 2000<sup>83</sup>.

Como hemos indicado Src presenta dos residuos de capital importancia en la regulación de su función. La fosforilación en el residuo Tyr530 permite la interacción con el propio dominio SH2 presente en la quinasa, generando una conformación que impide su actividad enzimática (“conformación cerrada”). La interacción de Src con otras proteínas, como por ejemplo FAK, ó bien la acción de fosfatasas celulares capaces de desfosforilar el residuo Tyr530, provocan un cambio conformacional que permite que el dominio catalítico interactúe con sus sustratos (“conformación abierta”). Finalmente será necesaria la autofosforilación en el residuo Tyr419 para que se alcance la máxima actividad quinasa<sup>84,85</sup>.

#### **GTPasas pequeñas de la familia Rho/Rac.**

Las GTPasas pequeñas de la familia Rho/Rac pertenecen a la superfamilia de las proteínas Ras y reciben su nombre de “pequeñas” ya que su peso molecular ronda los 20 a 30 kDa. En humanos éstas GTPasas se encuentran codificadas en 23 genes y debido a “*splicing*” alternativo se han descrito 26 miembros. Se las agrupa en 6 subfamilias<sup>86</sup>:

- ♦ Subfamilia Rho (con 3 isoformas: RhoA, B y C)

- ♦ Subfamilia Rac (con 4 miembros: Rac1, 2 y 3 y RhoG)
- ♦ Subfamilia Cdc42 (con RhoJ, RhoQ, Cdc42, RhoU y RhoV)
- ♦ Subfamilia Rnd (con cinco miembros: Rnd1, 2 y 3 y RhoF y D)
- ♦ Subfamilias RhoBTB y RhoT/Miro, que se denominan GTPasas “atípicas” puesto que presentan características muy diferentes con respecto a las anteriores subfamilias en cuanto a estructura y regulación de su función.

Los miembros de la familia mejor conocidos y más estudiados son RhoA, Rac1 y Cdc42.

Éstas enzimas GTPasas pueden encontrarse en dos estados (figura 15): un estado activo unidas a GTP ó un estado inactivo no unidas a GTP (unidas a GDP). El ciclo entre ambos estados está regulado por la acción de dos grupos enzimáticos: los factores de intercambio de GTP (GEFs), que promueven el intercambio GDP-GTP, y los promotores de actividad GTPasa (GAPs) que provocan la degradación de GTP a GDP. Se han descrito al menos 85 GEFs y otros 70 GAPs <sup>87</sup>.

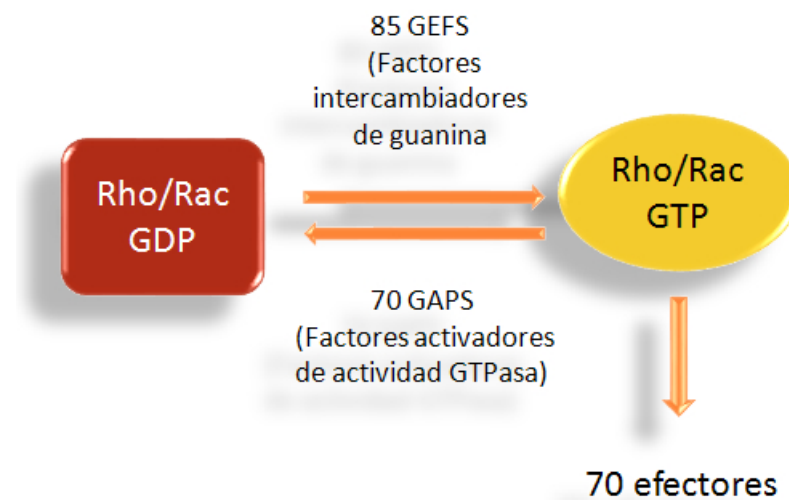


Figura 15: **Ciclo biológico de las GTPasas pequeñas de la familia Rho/Rac.** El ciclo de la GTPasas pequeñas se produce por la acción coordinada entre al menos 85 de factores intercambiadores de guanina, que promueven la unión de GTP a las enzimas, y unos 70 factores activadores de actividad GTPasa que inducen la hidrólisis del GTP unido.

## Aspectos moleculares de la migración celular.

Tras describir los tipos de contactos que se establecen entre las células y la MEC, y estudiar algunos de sus componentes destacados en la transducción de señales, comentaremos brevemente los aspectos moleculares que permiten la migración celular.

Aunque los componentes varían en cada una de las estructura de adhesión comentados, existe una jerarquía u orden en la unión de éstas proteínas formando una especie de “cadena” de señalización <sup>88</sup>. El proceso de migración se inicia con la activación de la integrinas por unión a sus ligandos, lo que provoca la autofosforilación de FAK en su residuo Tyr397, creándose así un sitio de alta afinidad para

las quinasas de la familia Src. Al unirse Src, se produce un cambio conformacional en ésta molécula que permitirá su activación. Finalmente, Src activada inducirá la fosforilación de FAK en diversos residuos de tirosina. El complejo FAK/Src formado y activado comenzará una cascada de fosforilaciones e interactuará con otras proteínas que estimularán distintas rutas de señalización celular, entre las que se encuentran reguladores de las GTPasas RhoA y Rac (figura 16) <sup>89</sup>.

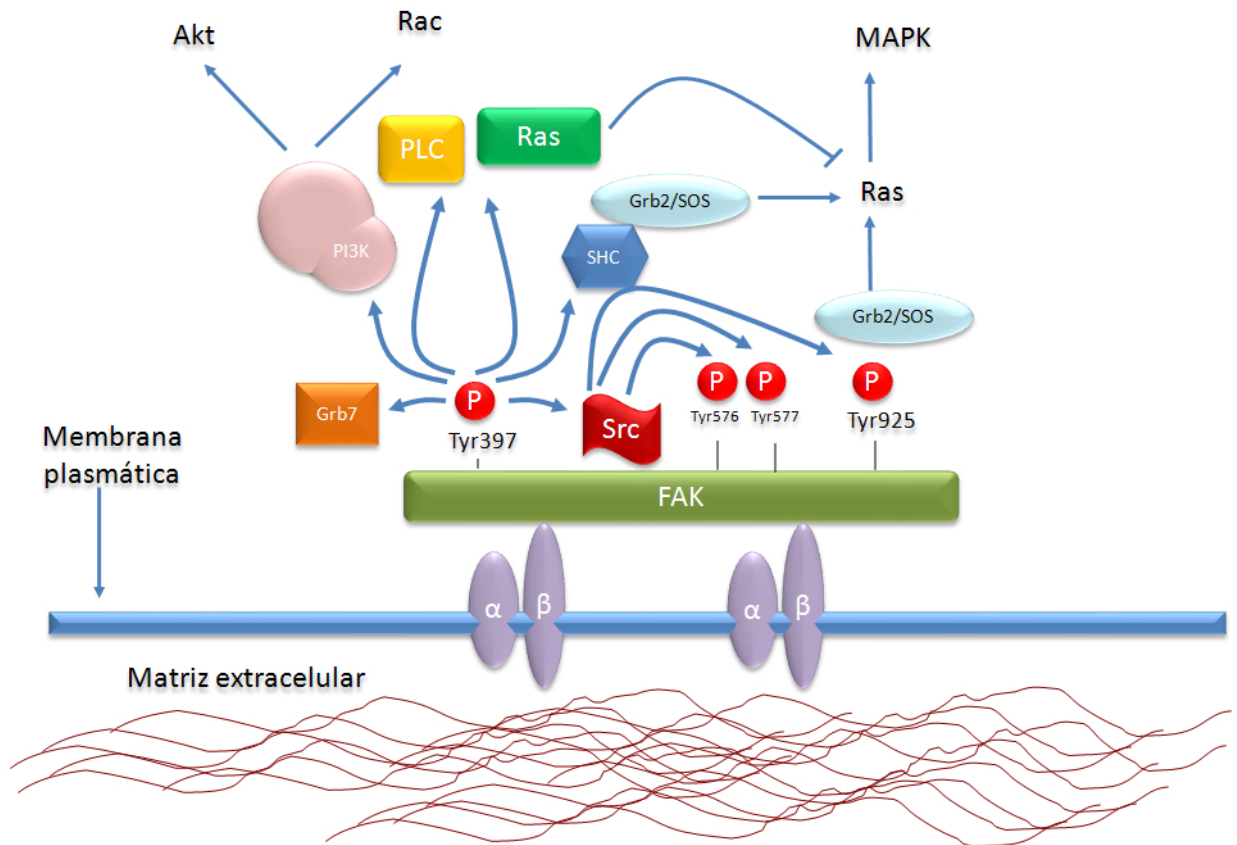


Figura 16: **Principales eventos moleculares implicados en la migración celular.** Tras la interacción celular con la matriz extracelular, mediada por las integrinas, FAK será activado y sus residuos fosforilados servirán de anclaje para diversas moléculas de señalización celular, como Src, PI3K y otras.

Tras éste breve resumen, comentaremos en los siguientes apartados las características moleculares más básicas de los pasos fundamentales de la migración celular, descritos según el modelo de migración mesenquimática.

### A) Formación de filopodios/seudópodos

En la formación de pseudópodos, así como en el resto de actividades relacionadas a la reorganización del citoesqueleto, las GTPasas pequeñas de la familia Rho juegan un papel decisivo. Tras la activación de éstas GTPasas y su correcta localización subcelular, serán capaces de interactuar con diferentes efectores para llevar a cabo sus funciones biológicas. A modo de resumen podemos decir que Rac induce la polimerización de la actina en la periferia de la célula para formar lamelipodios y Cdc42 induce la formación de filopodios y extensión de los pseudópodos <sup>87</sup>. Aunque la regulación que ejercen Rac y Cdc42 sobre la reorganización del citoesqueleto se produce vía



activación del complejo WASP/Arp2/3, aún no se conoce porque se producen fenotipos tan diferentes tras la activación de cada una de éstas GTPasas. Por su parte, el complejo WASP/Arp2/3 se une a la cara interna de la membrana plasmática en presencia de PIP<sup>90</sup>, generados por PI3K, los cuales también son capaces de permitir la activación de GEFs y GAPs, que regularán las actividades de las GTPasas pequeñas.

Además, se ha demostrado que Cdc42 desarrolla un papel fundamental en la polarización celular, fenómeno fuertemente implicado en la remodelación del citoesqueleto necesaria en la migración<sup>91</sup>.

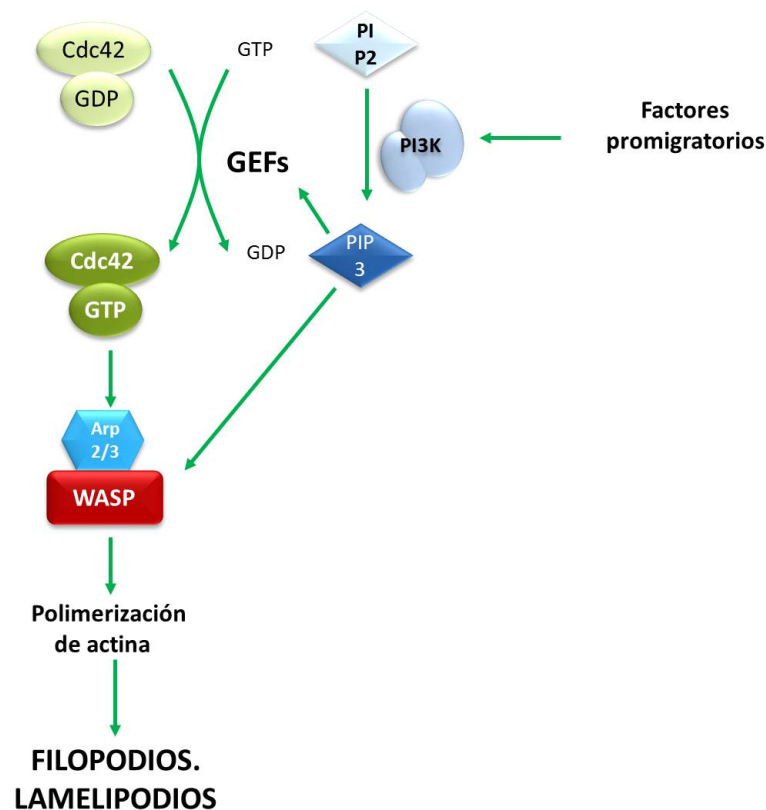


Figura 17: *Ruta de activación de Cdc42 y su implicación en la formación de filopodios y lamelipodios.*

## B) Generación de fuerzas de tracción:

En la generación de fuerzas de tracción, destaca la capacidad de Rho para regular la formación de filamentos contráctiles mediante su acción sobre la quinasa ROCK. Ésta quinasa fosforila e inactiva a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina II, con el consecuente aumento de miosina II fosforilada que se entrecruza con la actina permitiendo la contracción. También la polimerización de la actina está controlada por Rho, mediante sus acciones sobre la proteína mDIA<sup>92</sup>. Hemos de resaltar además que, en modelos *in vitro* de metástasis prostáticas, FAK también es sustrato para las acciones de miembros de la subfamilia de Rho<sup>93</sup>, así como un regulador de la función y localización de diferentes GAPs y GEFs celulares<sup>94</sup>.

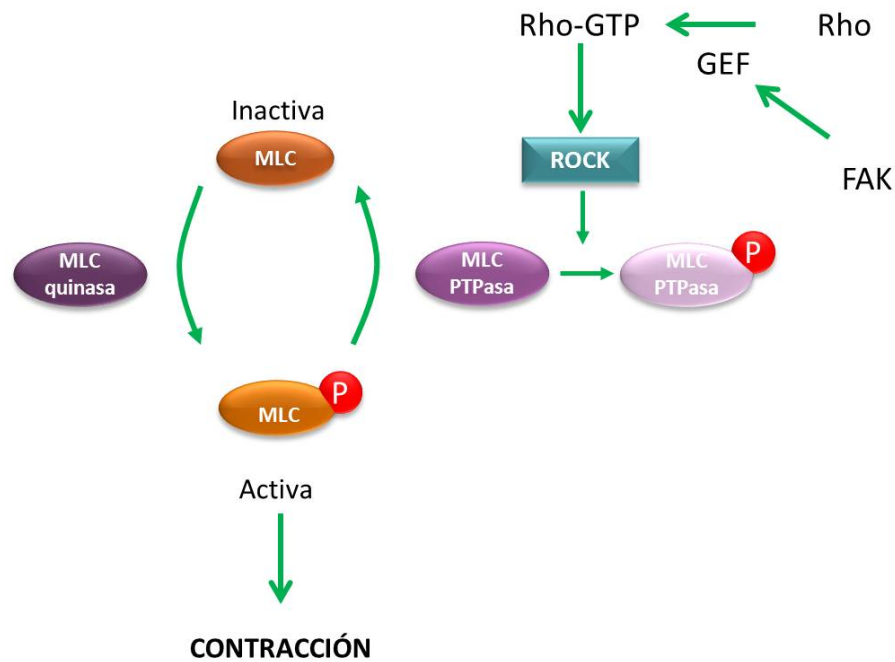


Figura 18: *Papel de Rho en la generación de fuerzas de tracción en la migración celular.*

### C) Desensamblaje de los contactos formados en la zona posterior:

El desensamblaje de los contactos formados ocurre por distintos mecanismos, siendo FAK una molécula activamente implicada en su disolución. Aunque el mecanismo espacio-temporal no está completamente esclarecido, la capacidad de regulación de ésta quinasa sobre GEFs y GAPs puede dar como resultado la activación ó inhibición de GTPasas pequeñas de la familia Rho. En éste sentido, la localización de éstas GTPasas jugará un papel relevante en la respuesta generada. Así, en la zona frontal de una célula en migración es necesaria la activación de Rac, permitiendo la formación de lamelipodios, pero en la zona trasera la actividad de Rac debe ser menor. De modo similar, RhoA promoverá la generación de fuerzas de tracción necesarias para eliminar las uniones traseras de las células, por lo que debe encontrarse activo en ésta zona pero inhibido en la parte delantera. Se ha demostrado que FAK es capaz de unirse y fosforilar a p190RhoGAP, lo que da como resultado la inhibición de Rho en los contactos focales nacientes. Por otra parte, también se ha demostrado que FAK se asocia con diversos GEFs, activadores de Rho en la zona trasera de las células en migración, lo que da como resultado una mayor activación de ROCK, aumento de la contractilidad celular y desensamblaje de los contactos focales ubicados en ésta zona de la célula (figura 19) <sup>94,95</sup>. Finalmente, como un nuevo nivel de regulación, se ha demostrado que Rac puede inhibir a Rho en diferentes tipos celulares, aunque el mecanismo molecular no se encuentra totalmente definido <sup>96</sup>.

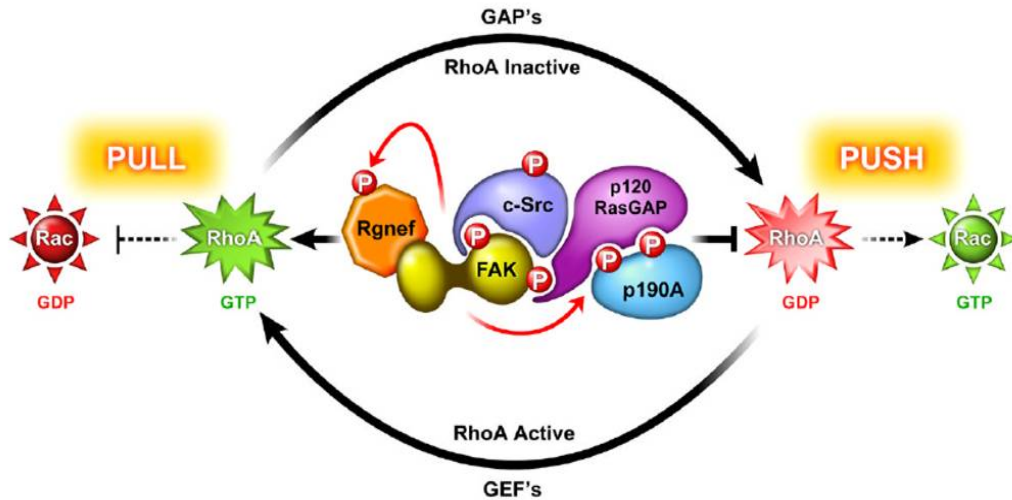


Figura 19: **FAK como regulador clave de las actividades de las GTPasas pequeñas de la familia Rho en la migración celular.** FAK puede interactuar con distintas proteínas tanto en los contactos focales del frente como de la parte trasera de una célula en migración. En la zona delantera activa a GAPs de Rho dando como resultado su inhibición. Probablemente la activación de Rac observada en ésta zona también contribuya a la inhibición de Rho. Con respecto a la zona trasera, FAK activa GEFs de Rho de tal modo que las fuerzas de tracción generadas rompen los contactos formados. Tomado de Tomar y cols., 2009<sup>94</sup>.

Con respecto a otros posibles mecanismos implicados en el desensamblaje de los contactos de la zona trasera, se ha demostrado que la actina puede unirse a proteínas como cofilina o gelsolina, que promueven la disrupción en su polimerización, llevando al recambio de los filamentos. También la acción de fosfatasas limitan el ensamblaje de nuevas proteínas a los contactos, en tanto que proteasas (como la calpaína) directamente clivan los componentes de los contactos focales<sup>97</sup>.

## EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN POR FOSFOINOSÍTIDOS.

---

Hemos visto que el ciclo celular se encuentra finamente regulado para asegurar la fidelidad genética y estructural de las nuevas células formadas. También hemos visto que la célula posee complejos mecanismos que le permiten movilizarse, interactuando con distintas MEC y que en neoplasias ambas características se encuentran desreguladas dando como resultado células que se dividen descontroladamente a la par que adquieren capacidades invasivas. Pero aunque a los fines de estudios vemos ambos procesos por separado, en realidad existe una importante interacción entre ambos <sup>98</sup>. Así, tras la adhesión celular, diversas moléculas enlazarán las señales extracelulares y permitirán el desarrollo del ciclo celular. Entre ellas destacan las fosfatidilinositol 3 quinasas (PI3K), claves en el sistema de señalización por fosfoinosítidos.

### La vía de PI3K.

Las fosfatidilinositol 3 fosfato quinasas (PI3K) se encargan de fosforilar grupos hidroxilo del anillo de inositol de tres sustratos lipídicos: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP) y fosfatidilinositol (PI). Su acción es específica fosforilando la posición 3 del inositol generando fosfatidilinositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>), que actuará como un potente segundo mensajero en la regulación del ciclo celular, supervivencia, migración y transporte vesicular intracelular <sup>99</sup>.

Las PI3K han sido clasificadas en 3 familias en función de su estructura y sus preferencias en cuanto al sustrato lipídico (figura 20) <sup>100</sup>. Nosotros nos centraremos en la clase I, que es la que mejor se conoce, y más concretamente en la la.

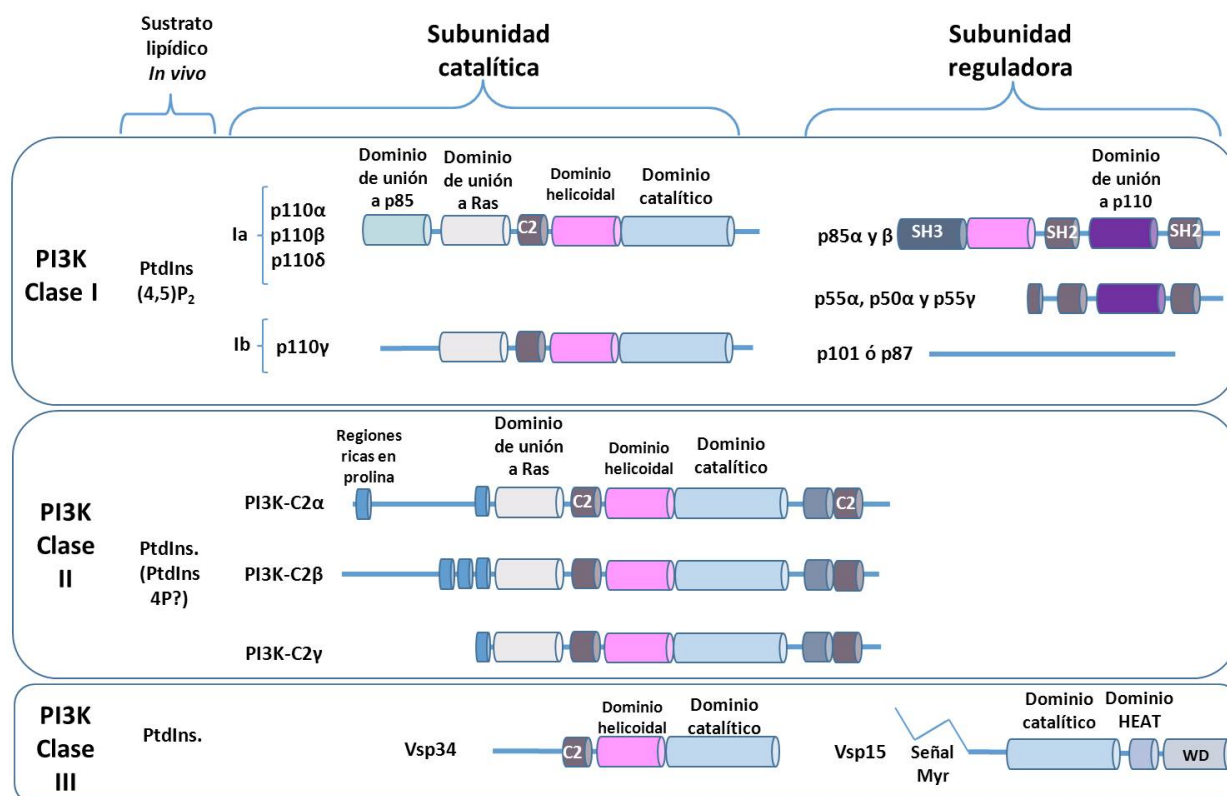


Figura 20: **Clasificación y estructura de las PI3K.** Tomado de Vanhaesebroeck y cols., 2010 <sup>100</sup>.

## PI3K clase I:

### Estructura

Éste grupo es el mejor estudiado, sus representantes están presentes en todos los tipos celulares y están formados por dos subunidades: una catalítica y otra reguladora. Esta clase de PI3K se divide a su vez en dos clases. La clase Ia se caracteriza porque las subunidades catalíticas (p110 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ ) se unen a subunidades reguladoras de tipo p85 (p85 $\alpha$  y  $\beta$ , p50 y p55) que presentan en su estructura dominios SH2. Las subunidades catalíticas tienen en común la presencia de un dominio de unión a p85 (p85-BD), un dominio de unión a la proteína Ras (RBD), un dominio de unión a la membrana (C2), un dominio helicoidal y el dominio catalítico propiamente dicho. Las subunidades reguladoras de tipo p85 poseen dos dominios SH2 y son responsables de estabilizar las subunidades p110 catalíticas, poniéndolas en contacto con sus sustratos en la membrana plasmática <sup>101</sup>.

Las PI3K de clase Ib solo tienen un tipo de subunidad catalítica, p110 $\gamma$ , que es muy similar a las de la familia Ia, aunque carece de dominio de unión a p85. Las subunidades reguladoras p101 y p87 carecen de los dominios SH2 y no tienen otros dominios identificables.

### Activación de PI3K.

En el caso de las PI3K de clase Ia, en condiciones basales p85 se une a p110 estabilizándola e inactivando su actividad quinasa. Tras la estimulación de receptores tirosina quinasa, p85 se une, mediante

sus dominios SH2, a las tirosinas fosforiladas en los propios receptores o en las correspondientes proteínas adaptadoras. Esta unión sitúa a p110 en la membrana plasmática, donde se encuentra su sustrato, y la libera de la acción inhibitoria de p85 (figura 21).

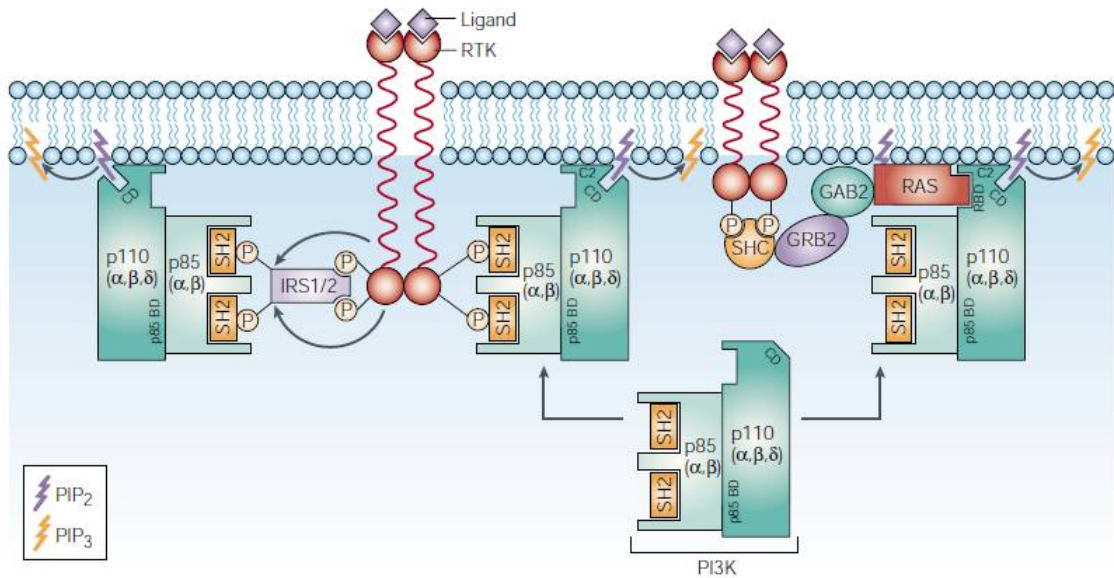


Figura 21: **Activación de las PI3K de clase Ia.** Tomado de Vivanco y Sawyers, 2002 <sup>102</sup>.

En el caso de las PI3K de clase Ib, las subunidades reguladoras se unirán al dímero  $\beta\gamma$  de las proteína G, permitiendo así que p100 $\gamma$  se active por receptores de membrana acoplados a proteína G.

Alternativamente, todas las isoformas de p110 se pueden unir directamente a Ras, situándose en la membrana y activándose.

Dado que la activación de receptores tirosina quinasa o acoplados a proteínas G dan como resultado la activación de Ras, la separación que suele hacerse entre las clases Ia y Ib, en cuanto a su modo de activación, se difumina. Al final las dos clases de PI3K pueden ser activadas por ambos tipos de receptores a través de Ras (figura 22).

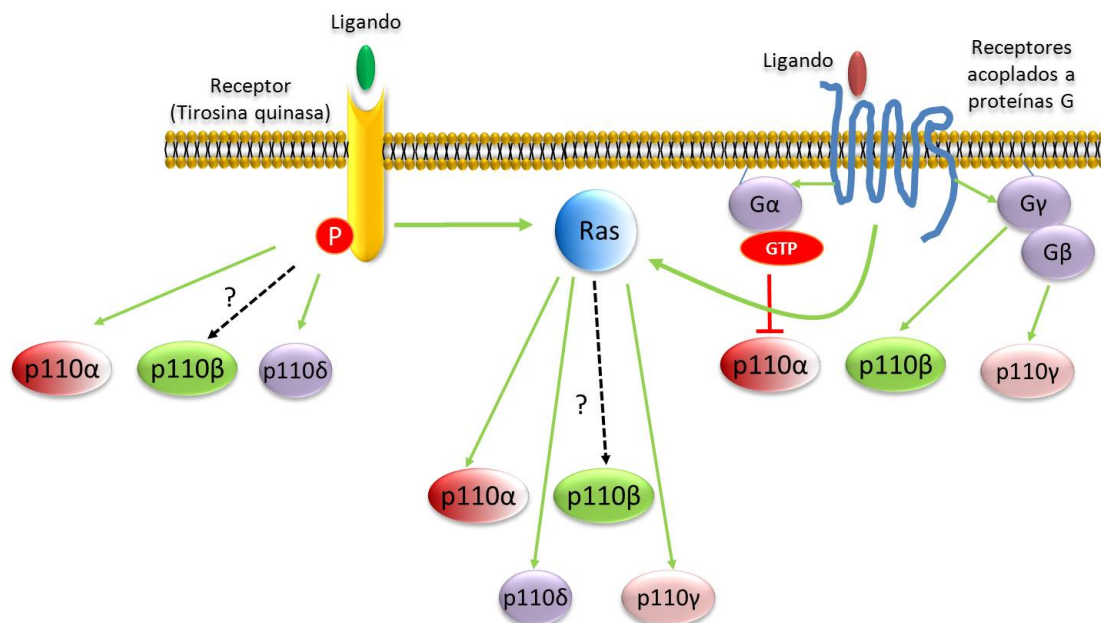


Figura 22: **Entrecruzamiento de señales en la activación de PI3K de clase Ia y Ib.** Tomado de Vanhaesebroeck y cols., 2010<sup>100</sup>.

La generación de PIP3 por PI3K iniciara vías de transducción de señales de gran trascendencia para la supervivencia celular. Por ello, ésta ruta se encuentra balanceada por la acción de la lípido fosfatasa PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), que se encarga de desfosforilar a PIP3 para generar PIP2, deteniendo la acción desencadenada por éstos segundos mensajeros <sup>103</sup>. PTEN ha sido ampliamente reconocido por su actividad supresora de tumores y la pérdida de su expresión ó la presencia de mutaciones que lo inactivan se encuentran asociadas al desarrollo de carcinomas uroteliales <sup>104</sup>, melanomas <sup>105</sup> y glioblastomas <sup>106</sup>.

La formación de PIP3 coordina la función y localización de distintos efectores que cuentan con dominios específicos de unión a lípidos, ya sean dominios de homología a pleckstrina (PH), dominios de homología *phox* (PX) ó dominios FYVE <sup>100</sup>. Entre éstos efectores destacan proteínas adaptadoras como GAB2, proteínas reguladoras de GTPasas pequeñas (GEFs y GAPs) que van a permitir que PI3K controle la función de las GTPasas de la familia Ras así como al principal y más conocido efector de todos ellos que es la quinasa de serinas y treoninas, AKT.

## La quinasa AKT.

En la vía clásicamente estudiada, el principal efector de PI3K es la quinasa de serinas y treoninas, PKB, también denominada AKT. Esta quinasa es una enzima de gran versatilidad que media importantes mecanismos celulares con un abanico que incluye la progresión del ciclo celular, la apoptosis, el metabolismo de la glucosa, la migración celular, etc. Fue descrita por primera vez como el homólogo humano del producto del oncogén de origen retroviral denominado *AKT*.

## Estructura.

Se han descrito tres isoformas de AKT: 1, 2 y 3 que mantienen una gran homología de secuencia, teniendo las isoformas murinas un 95 % de homología respecto a las humanas. Todas se caracterizan por presentar 3 dominios (figura 23):

- ♦ un dominio N-terminal de homología a pleckstrina (PH) que le permitirá interactuar con lípidos fosforilados,
- ♦ un dominio catalítico (quinasa), ubicado en la región central de la molécula que presenta una alta homología con otros dominios catalíticos presentes en la familia de las quinasas AGC, como PKA, p70S6K y PKC. En éste dominio se encuentra un residuo de treonina altamente conservado, cuya fosforilación es fundamental para la activación completa de la enzima,
- ♦ un dominio regulador (HM), ubicado en C-terminal, que contiene un motivo hidrofóbico de unos 40 aminoácidos también característico de la familia de quinasas denominadas AGC. En éste dominio se encuentra un residuo de serina cuya fosforilación es imprescindible para la completa activación de AKT.

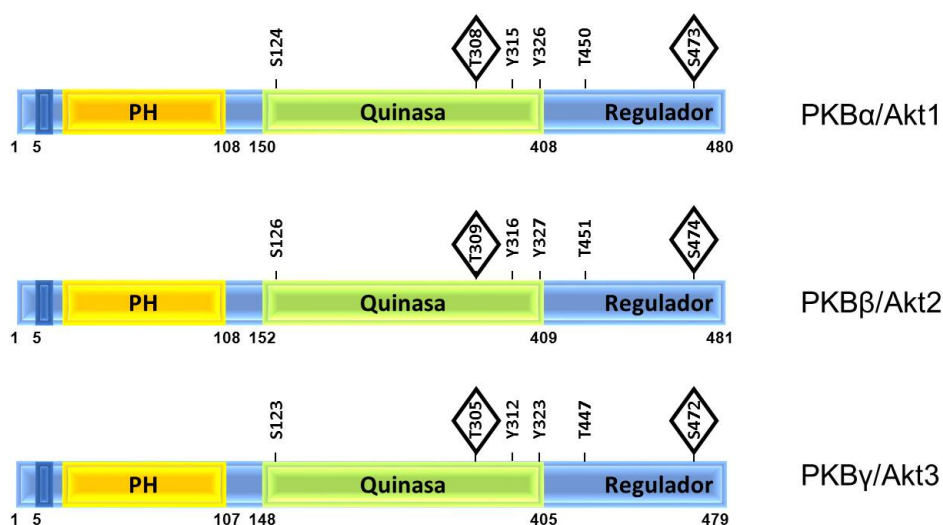


Figura 23: **Estructura de las isoformas de AKT.**

Como indicamos, para la completa activación de AKT serán necesarios eventos de fosforilación en residuos de Thr y Ser presentes en el dominio catalítico y en el motivo hidrofóbico respectivamente, más precisamente las Thr308 (en AKT1 y 2) y Thr309 (en AKT3) y la Ser473 (en AKT1), Ser474 en AKT2 ó Ser472 en AKT3 <sup>99</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado también que la función de AKT puede ser regulada por fosforilación en residuos específicos de tirosina <sup>107,108</sup>, así como por proteínas asociadas <sup>109</sup>.



## Activación de AKT.

Tras la generación de PIP3, éste interactuará con el dominio PH presente en AKT. Esta interacción provocará la traslocación de AKT a la cara interna de la membrana plasmática así como un cambio de conformación de ésta proteína, que expondrá los residuos de Ser y Thr (correspondientes en cada una de las isoformas) cuyas fosforilaciones son necesarias para completar su activación. PDK1, es la enzima responsable de fosforilar el residuo de Thr de AKT <sup>110</sup> en tanto que para alcanzar la máxima actividad enzimática AKT deberá ser fosforilado en el residuo de Ser ubicado en el motivo HM, por el complejo mTORC2/Rictor <sup>111</sup>. En la figura 24 esquematizamos la activación de la vía PI3K/AKT.

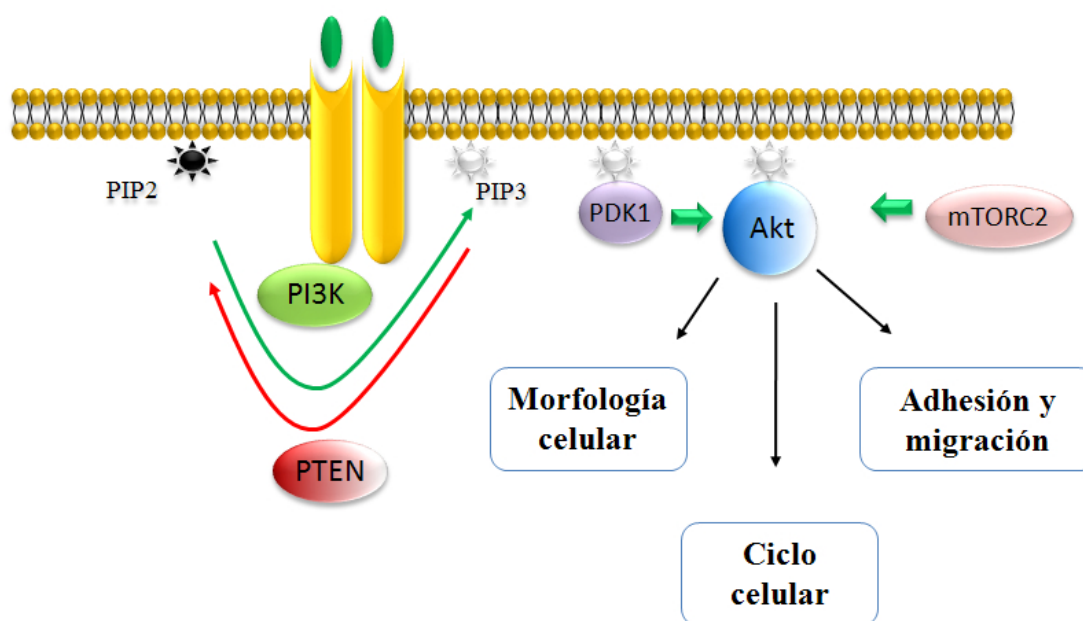


Figura 24: **Activación de la quinasa PKB/AKT.** Tras la interacción de los ligandos con sus receptores, se produce la activación de PI3K, la cual cataliza la formación de PIP3. Éstos segundos mensajeros interactuarán con el dominio PH, tanto de AKT como de PDK1, siendo ésta última la responsable de fosforilar el residuo de Thr que corresponda en las distintas isoformas de AKT, activándola. Pero para que AKT alcance su máxima activación será necesaria la fosforilación en el residuo de Ser, mediada por el complejo mTORC2. Los PIP3 son desfosforilados por la fosfatasa PTEN, contrarrestándose la acción inicial de PI3K.

## PDK1.

La quinasa 1 dependiente de inosítoles trifosfato (PDK1) pertenece a la familia de las quinasas AGC y posee una zona presente en todas sus representantes conocida como bucle T ó bucle de activación. La fosforilación en el residuo de Ser241, presente en el bucle T, es primordial para la activación de PDK1 y se considera un sitio de autofosforilación, demostrándose la existencia de una activación constitutiva en células de mamíferos <sup>112</sup>. La activación de AKT por PDK1 parece depender más de los cambios de conformación de AKT que de la capacidad de unión de fosfoinosítidos, mediante los dominios PH presentes en ambas. En cualquier caso, la presencia de PIP3 permitirá la correcta localización de AKT en la membrana plasmática, donde continuarán produciéndose dichos cambios conformacionales y, aunque no se concluye con claridad que sea necesaria también la traslocación de PDK1 a la membrana <sup>113,114</sup>, el resultado será la fosforilación en la Thr308 de AKT.

## Efectores de AKT.

La vía de transducción de señales iniciada por PI3K/AKT cumple funciones de suma importancia en la regulación de la supervivencia celular. Se ha demostrado que, en términos generales, inhibe la apoptosis a la par que permite el progreso del ciclo celular<sup>99</sup>. Actualmente se han identificado múltiples sustratos<sup>115</sup>, aunque solo expondremos algunos de los mejor estudiados (figura 25).

## mTOR.

La quinasa mTOR ("*mammalian target of Rapamycin*") es tanto un activador de AKT como un efector de ésta ruta.

Para que se produzca una completa activación de mTOR se requiere la presencia de ácido fosfatídico (PA) unido a su dominio FRB. La rapamicina, un macrólido de origen bacteriano con potente acción inmunosupresora, se une a la proteína FKBP12 y el complejo formado es capaz de competir con el sitio de unión de PA en el dominio FRB, inhibiendo la actividad de esta quinasa<sup>30</sup>. Esta inhibición finalmente provoca una disminución en la proliferación celular (mediada por parada en G1), ya que mTOR fosforila y activa a la quinasa p70S6K, la cual a su turno fosforila y activa la proteína ribosomal S6, permitiendo el avance de la traducción proteica, tal como indicamos en apartados anteriores.

En realidad, mTOR puede formar dos complejos enzimáticos bien diferenciados, tanto en componentes como en funciones:

- ◆ el complejo mTORC1, formado por mTOR y la proteína Raptor, principalmente encargado de la regulación de la síntesis proteica.
- ◆ el complejo mTORC2, formado por mTOR y la proteína Rictor encargado, entre otras funciones, de la fosforilación de AKT en el residuo de Ser473.

Concentraciones de 0,5 a 100 nM de rapamicina son capaces de inhibir el complejo mTORC1, en tanto que se requieren concentraciones de 0,2 a 20  $\mu$ M para inhibir el complejo mTORC2. Ésta diferencia se debe a la mayor inestabilidad del complejo mTORC1 que se desorganiza con mayor facilidad, requiriéndose menores concentraciones de rapamicina para inhibir a las moléculas de mTOR proveniente de este complejo. Los complejos mTORC2 son mucho más estables y se requieren concentraciones mucho más altas de rapamicina para provocar su inhibición, que también puede ser alcanzada por disminución en los niveles de PA, tras la inhibición de la fosfolipasa D, encargada de generar PA a partir de fosfatidilcolina<sup>116</sup>.

El principal modulador negativo de mTOR es la quinasa TSC, la cual a su vez es inhibida por fosforilación mediada por AKT y de allí la regulación de mTOR por AKT<sup>117</sup>.

## BAD y caspasa 9:

- ♦ BAD, proteína miembro de la familia Bcl-2, es fosforilada por AKT en el residuo de Ser136, creándose así un sitio de unión para las proteínas 14-3-3. Tras su unión a las proteínas 14-3-3 BAD permanece secuestrado en el citoplasma, impidiéndose que cumpla con sus funciones proapoptóticas <sup>118</sup>.
- ♦ También se ha identificado a la caspasa 9 como un sustrato de AKT. La fosforilación de la caspasa por AKT provoca la inhibición de la actividad enzimática de la primera, deteniéndose el proceso apoptótico <sup>119</sup>.

#### **Factores de transcripción FOX-O:**

- ♦ Los factores de transcripción de la familia FOX-O están encargados tanto de la transcripción de efectores antiapoptóticos, como de la represión de genes cuyos productos promueven el ciclo celular. La fosforilación de éstos factores de transcripción por AKT <sup>120</sup> provoca su captura por proteínas de la familia 14-3-3, siendo secuestradas en el citoplasma, permitiendo su posterior degradación. Se libera así la inhibición transcripcional ejercida por los factores FOX-O sobre diversos genes, como por ejemplo el gen de ciclina D y el gen de p27 <sup>27</sup>, a la par que disminuye la transcripción de genes antiapoptóticos <sup>55</sup>.

#### **I $\kappa$ B:**

- ♦ El factor de transcripción NF $\kappa$ B promueve la supervivencia celular. Sin embargo se encuentra secuestrado en el citoplasma por su unión a la proteína I $\kappa$ B <sup>121</sup>. Tras la fosforilación de ésta última por AKT, se produce la liberación del complejo NF $\kappa$ B y su ingreso al núcleo donde ejercerá su acción de modulación génica <sup>122</sup>.

#### **Mdm2:**

- ♦ El producto de éste oncogen es inducido por la acción de p53, y a su vez actúa como ligasa de ubiquitina sobre el propio p53. La fosforilación de Mdm2 por AKT resulta en una activación de su actividad ligasa, llevando a una rápida degradación de p53, evitando los eventos proapoptóticos promovidos por este <sup>123</sup>.

#### **GSK3:**

- ♦ La activación de AKT influye el control del metabolismo de la glucosa a través de su efector GSK3, pero a través del mismo también controla la proliferación celular. En éste sentido, hemos visto anteriormente que GSK3 $\beta$  fosforila y degrada a ciclina D1 <sup>31</sup>. AKT fosforila e inhibe a GSK3 <sup>124</sup> permitiendo de ése modo la progresión del ciclo celular.

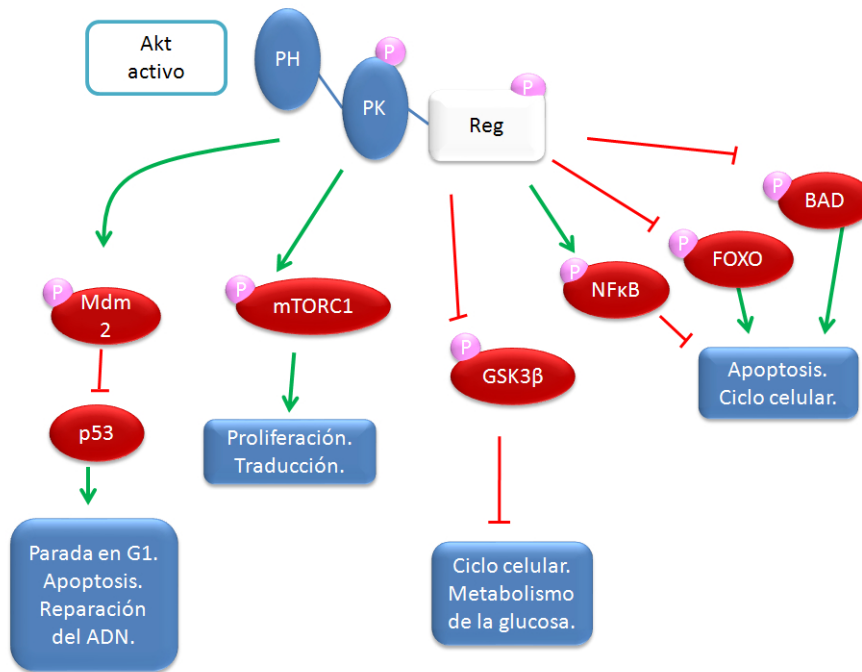


Figura 25: **Principales efectores de AKT.**

## Papel de la ruta PI3K/AKT en el desarrollo y progresión tumoral.

Con respecto al desarrollo tumoral se ha demostrado que existe una clara tendencia del gen *PIK3CA*, que codifica la subunidad  $p110\alpha$ , a presentar mutaciones de sentido alterado, llevando a la sustitución de aminoácidos. Por otra parte, aunque la amplificación de éste gen parece ser un hecho frecuente en el cáncer, se han descrito pequeñas deleciones e inserciones.

En general se acepta que las mutaciones en el gen *PIK3CA* provocan una ganancia de función. Se ha demostrado que las mutaciones en el dominio helicoidal ó en el dominio quinasa provocan la eliminación del efecto estabilizador que ejerce p85 sobre  $p110\alpha$ , permitiendo la activación constitutiva de PI3K <sup>125</sup>. Sin embargo, en líneas celulares provenientes de cáncer de mama se ha observado que la activación constitutiva de  $p110\alpha$  no necesariamente provoca un aumento en la actividad de AKT, dado que su activación completa también depende de PDK1 <sup>126</sup>.

En el caso de la próstata, la ruta PI3K es clave en el crecimiento y supervivencia celular y coopera con el receptor de andrógenos (AR) para regular el crecimiento y la progresión tumoral. Desde un punto de vista clínico, el aumento de actividad de la ruta PI3K se ha asociado reiteradamente con la progresión tumoral y la independencia androgénica del cáncer de próstata <sup>127,128</sup>. Por su parte, Kreisberg y cols. <sup>129</sup> demostraron que el estudio inmunohistoquímico de la fosforilación de AKT era un buen predictor de cánceres de próstata agresivos, en lugar de la evaluación del antígeno prostático específico (PSA) ó la graduación Gleason, ambos sistemas incapaces de distinguir clínicamente entre tumores poco agresivos ó muy agresivos. En la mayoría de los casos, este aumento de actividad se debe a alteraciones de PTEN, situándose entre el 30-60 % la frecuencia de mutaciones de este gen en tumores

prostáticos<sup>130</sup>. También los estudios inmunohistoquímicos permitieron demostrar que el aumento de la fosforilación de AKT, así como la pérdida de PTEN, poseen un valor predictivo de recurrencia del cáncer luego de la terapia de ablación androgénica ó la prostatectomía<sup>131</sup>.

Aunque hasta hace relativamente poco no se conocía la contribución específica de cada una de las isoformas de AKT a los procesos biológicos controlados por la ruta PI3K/AKT, el desarrollo de ratones *knockouts* para cada una de las isoformas, así como su silenciamiento mediante ARN de interferencia en células cultivadas ha permitido demostrar que hay funciones redundantes y otras específicas de cada una de las isoformas<sup>132</sup>. Se ha observado que ratones *knockouts* para cada una de las isoformas son viables y el análisis de su fenotipo demuestra la importancia de estas isoformas en la proliferación, crecimiento y diferenciación celular así como en el metabolismo de la glucosa<sup>133</sup>. Estos estudios han demostrado que ratones que carecen de AKT1 tienen un tamaño corporal entre un 20 y un 30 % menor. Aquellos que carecen de AKT2 tienen un crecimiento normal pero presentan alteraciones similares a la diabetes tipo 2. En éste sentido, Gonzalez y cols. (2007) demostraron que en adipocitos, la insulina provoca una redistribución intracelular de las isoformas de AKT, permitiendo regular el tráfico del transportador de glucosa GLUT4<sup>134</sup>. También se ha demostrado la generación de diabetes tipo II en humanos por mutaciones en el dominio catalítico de AKT2<sup>135</sup>. Por último, ratones sin AKT3 presentan una disminución del peso del cerebro, debido a una disminución en el número y tamaño celular<sup>136</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado que las isoformas de AKT son responsables de regular de modo diferencial la migración y la adhesión celular en distintas líneas celulares<sup>137</sup>, a la vez que se proponen papeles opuestos de AKT1 y AKT2 en el control de la vía Rac/PAK<sup>138</sup>. En éste sentido se demostró que la sobreexpresión de AKT2 induce un aumento en la migración en líneas tumorales provenientes de mama<sup>139</sup>.

También se ha demostrado que AKT puede ejercer un control sobre la reorganización del citoesqueleto de actina necesario para la migración celular<sup>140</sup>, así como también se ha observado que AKT1 puede promover la secreción de metaloproteasas, requeridas para la degradación de la MEC<sup>141</sup>. Por otra parte AKT, a través de sus isoformas, demostró ejercer un control diferencial en la motilidad celular<sup>142</sup>.

Actualmente se proponen algunas hipótesis para intentar explicar ésta diferencia entre las funciones de las isoformas de AKT<sup>143</sup>:

- a) Distribuciones diferentes de las isoformas en los distintos tejidos.
- b) Activación diferencial de las isoformas de AKT por estímulos extracelulares.
- c) Diferencias intrínsecas en las actividades catalíticas de las isoformas.
- d) Distribución subcelular de las isoformas que condiciona los efectores con los que pueden interactuar.

## **Papel de las isoformas de AKT en el cáncer de próstata.**

Con respecto a líneas tumorales de origen prostático se ha demostrado que las isoformas de AKT se expresan de modo diferencial. Así, todas las isoformas se expresan en las líneas PC-3 y DU-145, aunque AKT3 no se expresa en la línea LNCaP<sup>144</sup>. Recientemente se ha demostrado que la anulación de isoformas de AKT mediante interferencia por ARN suprime el desarrollo tumoral tanto *in vitro* (utilizando las líneas PC-3 y LNCaP) como *in vivo*<sup>145</sup>, demostrándose que la línea LNCaP sufre apoptosis provocada por la disminución de los niveles de las distintas isoformas, fenómeno no presentado en línea PC-3<sup>146</sup>.

En caso del cáncer de próstata, los estudios realizados en muestras humanas han mostrado que los niveles específicos de cada una de las isoformas, así como su localización celular, se correlacionan de forma específica con distintos parámetros clinicopatológicos. Así, el aumento de la expresión de AKT3 citoplasmático se correlacionó con una progresión hacia enfermedad refractaria a la ablación androgénica, en tanto que el aumento de AKT1 y 2 nuclear se correlacionó con una disminución en la invasión<sup>147</sup>.

Como se desprende de los datos presentados, la vía PI3K/AKT contiene, en todos sus niveles, efectores que constituyen potenciales dianas terapéuticas contra las que dirigir nuevos tratamientos, ya sea de forma aislados ó en combinación con otros existentes. Es evidente que AKT es una diana de gran importancia, sobre todo en la fase de independencia androgénica, para la cual aún no se cuenta con terapias adecuadas. Actualmente, se están ensayado distintos inhibidores farmacológicos de esta vía, desde distintos enfoques que incluyen inhibidores alostéricos, pseudosustratos ó el bloqueo de dominios proteicos específicos, aunque sin resultados satisfactorios. Los sistemas de retroalimentación de ésta compleja vía pueden causar respuestas paradójicas frente a la inhibición completa de AKT, por lo que es fundamental comprender la relación exacta entre la isoforma efectora y el proceso a regular farmacológicamente, antes de poder desarrollar inhibidores efectivos y con proyección cierta sobre la salud de los pacientes con cáncer de próstata metastásico.

Uno de los elementos que pueden contribuir a la falta de éxito de estas nuevas terapias es que los inhibidores no discriminan entre las isoformas de su principal efector, AKT, las cuales se han revelado como no redundantes, por lo que la inhibición de AKT en general podría provocar la generación de fenotipos tumorales más agresivos, afectando la validez del tratamiento.

Por todo ello, establecer la relación "isoforma de AKT - efector - proceso celular", y más precisamente conocer en profundidad las funciones que controlan cada una de las isoformas, los sustratos que utilizan y como modifican las vías de señalización que regulan la proliferación, supervivencia y migración celular así como su implicación en la progresión del cáncer de próstata hacia la independencia androgénica, permitirá el desarrollo de inhibidores cada vez más específicos acercándonos a una terapéutica mucho más efectiva.

### Clasificación.

Los procesos de fosforilación y desfosforilación ejercen papeles fundamentales en la transducción de señales desde el ambiente extracelular hacia los compartimentos celulares. En éste sentido la fosforilación y desfosforilación en residuos de tirosina es clave para comprender las regulaciones dinámicas de procesos tales como la progresión del ciclo celular ó la reorganización del citoesqueleto necesaria en la adhesión ó migración y es por ello que el balance entre las acciones ejercida por las enzimas encargadas de fosforilar residuos de tirosina (proteínas quinasas de tirosina ó PTKs) y las encargadas de desfosforilar dichos residuos, denominadas fosfotirosinas fosfatasas (PTPs), mantiene los niveles de fosfotirosinas en un equilibrio dinámico en los sistemas biológicos <sup>148</sup>.

En 2004, Alonso y cols <sup>149</sup> describieron 107 PTPs codificadas en el genoma humano, pudiendo clasificarlas en 2 grupos: PTPs basadas en cisteína y PTPs basadas en ácido aspártico (figura 26).

Dentro de la familia de las PTPs basadas en cisteína clase I se encuentran las fosfatasas denominadas “clásicas”, que se caracterizan por ser específicas de residuos de tirosina y por la presencia de un motivo de 6 aminoácidos dentro de su dominio catalítico, cuyo residuo principal es una cisteína. Esta familia se divide en dos subfamilias: PTPs similares a receptor y PTPs de tipo no receptor.

Las PTPs similares a receptores se encuentran en estructuras de membrana y presentan un dominio transmembrana y dominios extracelulares variables. Las porciones intracelulares de ésta clase presentan 2 dominios PTP en tándem, denominados D1 y D2, residiendo la actividad catalítica en el dominio D1. Las PTPs no receptor son citosólicas y se caracterizan por presentar una amplia diversidad estructural y a menudo contienen secuencias que les permiten su correcta ubicación intracelular ó les permiten la interacción específica con otras proteínas <sup>150</sup>.

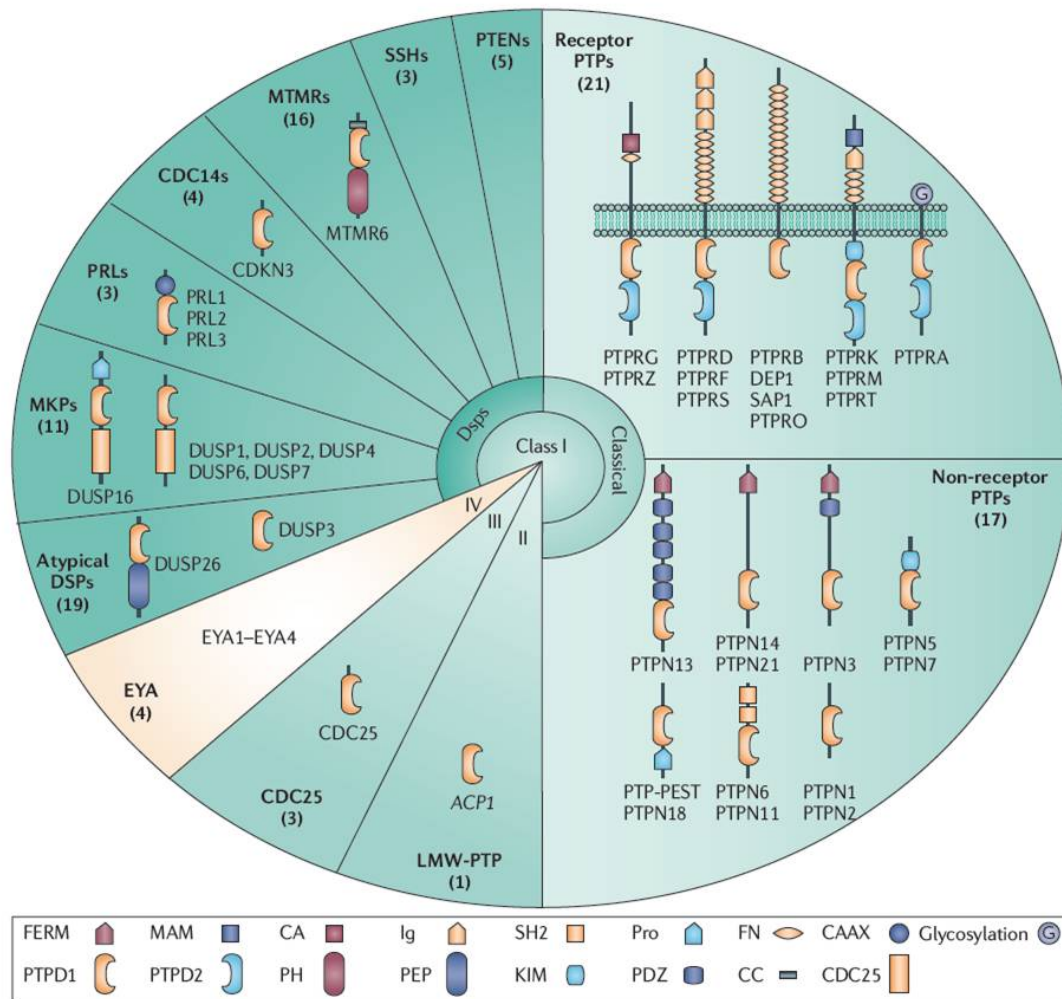


Figura 26: **Estructura de representantes de la superfamilia PTP.** Se muestran algunos representantes de PTPs con implicaciones demostradas en el cáncer. Tomada de Julien y cols., 2011 <sup>151</sup>.

La regulación de la actividad de éstas PTPs se puede llevar a cabo mediante la unión a un ligando o la dimerización, en el caso de las PTPs similares a receptores, la autoinhibición o el cambio en la localización subcelular en el caso de las PTPs citosólicas, o la fosforilación y la oxidación para ambos tipos de PTPs <sup>152</sup>.

### PTPs con dominios SH2.

De todas las PTPs descritas en el genoma, sólo las PTPs no receptor SHP-1 y SHP-2 presentan 2 dominios SH2 en tándem. La presencia de éstos dominios permiten la interacción de estas dos fosfatasa con sustratos que presenten tirosinas fosforiladas.

Aunque ambas fosfatasa presentan una gran homología en su secuencia, tienen papeles diferentes en la transducción de señales. SHP-2 se expresa en la mayoría de los tejidos y es un regulador positivos de la señalización celular mientras que SHP-1 tiene una localización más restringida y actúan fundamentalmente como un regulador negativo de los procesos de señalización en la célula <sup>153</sup>.



## SHP-1.

SHP-1 está codificada por el gen PTPN6 y se expresa fundamentalmente en el sistema hematopoyético aunque también en células epiteliales. Se han descrito 3 isoformas de SHP-1 generadas por *splicing* alternativo: una específica de células hematopoyéticas y otras dos que presentan variaciones en el extremo N-terminal. Se ha descrito además una forma de 70 kDa con un extremo N-terminal mayor, denominada SHP-1L<sup>154</sup> (figura 27).

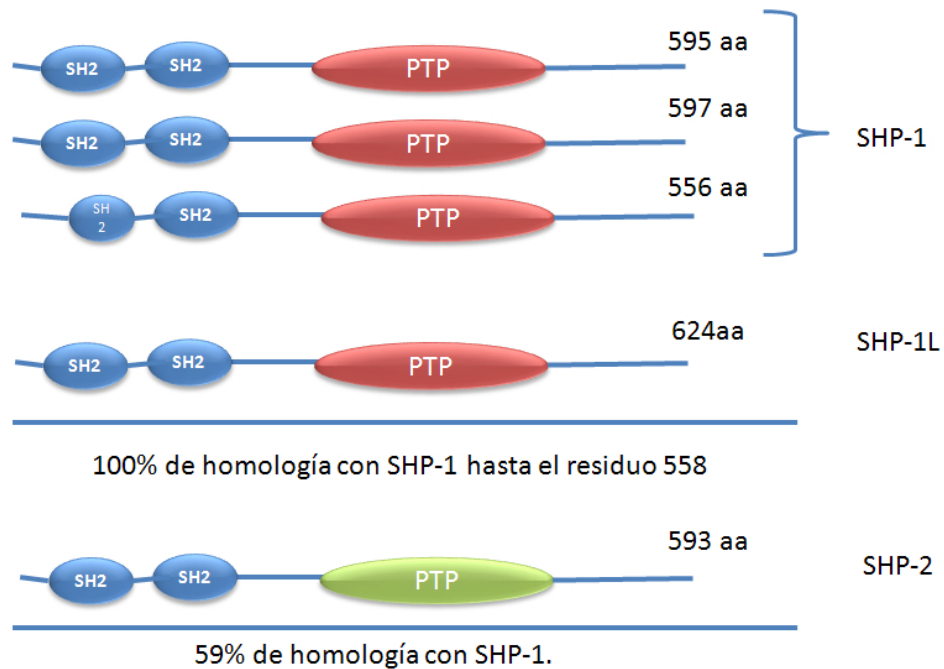


Figura 27: **Fosfotirosinas fosfatasas con dominios SH2**. Adaptado de de Poole y Jones, 2005<sup>155</sup>.

En todas ellas, los dominios SH2 se sitúan en el extremo N-terminal de la molécula y van a regular la localización y la actividad de ésta fosfatasa. De hecho, la estructura cristalizada de SHP-1, pero también de SHP-2, ha demostrado que el dominio SH2 N-terminal está insertado en el dominio catalítico impidiendo la entrada de los sustratos y por lo tanto inhibiendo la actividad enzimática. Esta conformación, denominada “cerrada”, se mantiene siempre que no exista interacción con sustratos fosforilados en tirosina. La unión de los dominios SH2 a tirosinas fosforiladas situadas en otra molécula ó en la propia SHP-1 libera el dominio catalítico permitiendo la activación de la enzima (figura 28).

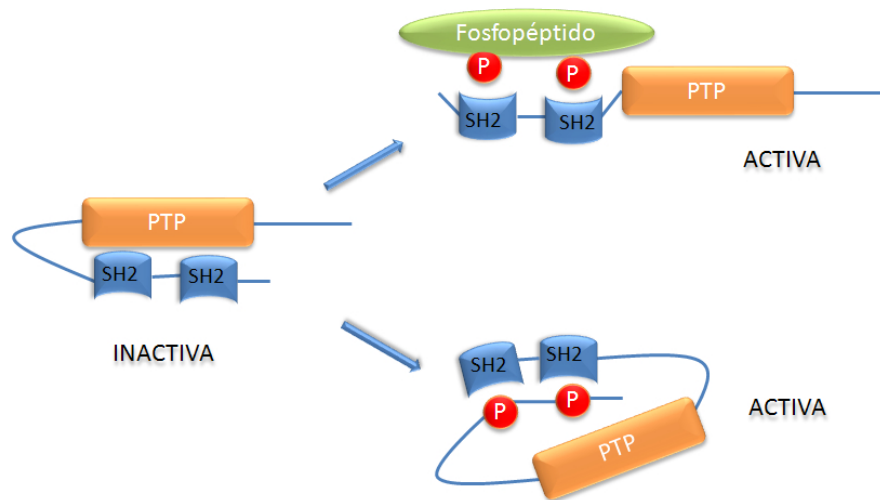


Figura 28: **Activación de SHP-1.** En condiciones basales SHP-1 se encuentra inhibida por la unión de los dominios SH2 al dominio catalítico. La fosforilación en residuos de tirosina, presentes en la propia molécula de SHP-1 ó de un fosfopéptido diferente, permite que la interacción de los dominios SH2 se desplace hacia éstos residuos fosforilados liberando el dominio fosfatasa de su inhibición.

El extremo C-terminal también está implicado en la regulación de la función de SHP-1. En ésta zona se encuentra una señal de señalización nuclear responsable de que esta enzima se encuentre en el núcleo <sup>156</sup> y distintos residuos tirosina y serina que pueden ser fosforilados, aunque con consecuencias para la función de SHP-1 no muy claras por el momento. Así, en 1994, Lorenz y cols. <sup>157</sup>, no observaron cambios en la actividad de SHP-1 tras su fosforilación en tirosina, aunque estos autores propusieron que esta fosforilación podría suponer un sitio de unión putativo para la proteína Grb2 y, por tanto, sugería una función adaptadora o de anclaje para SHP-1. Este papel adaptador para Grb2 posee ahora una serie de evidencias sustanciales <sup>158,159</sup>, proponiéndose además que el extremo C-terminal fosforilado podría actuar como un adaptador especializado capaz de reclutar sustratos para la fosfatasa <sup>160</sup>. En otros estudios, sin embargo, se ha observado como la fosforilación de SHP-1 en la Tyr536, llevada a cabo por el receptor de insulina, induce activación de la fosfatasa <sup>161</sup>, lo cual estaría apoyado por otro estudio en el que se demuestra como Src es capaz de fosforilar a SHP-1 en tirosina, incrementando su actividad <sup>162</sup>.

Además de la fosforilación en tirosina, otros estudios han demostrado que SHP-1 se puede fosforilar en residuos de serina, lo que modularía negativamente su actividad. Así, en 1997 Brumell y cols. <sup>163</sup>, demostraron que la actividad de SHP-1 disminuye al activar neutrófilos con péptidos quimiotácticos. Esta disminución de la actividad se correlaciona con un incremento en la fosforilación de SHP-1 en serina, observándose además que un inhibidor de PKC, la bisindolilmaleimida I, inhibe tanto la fosforilación en serina como la disminución de la actividad de SHP-1.

Finalmente, la unión de lípidos al extremo C-terminal (como ácido fosfatídico, PIP3, fosfatidilserina y otros) podría regular tanto la función <sup>164</sup> como la localización de SHP-1. Con respecto a la última posibilidad, se observó que una fracción de la SHP-1 celular se muestra constitutivamente unida a *rafts*, a pesar de no contar con una señal aminoacídica para ésa localización, sin embargo se demostró

que la mutación de una porción del dominio C-terminal evita esa unión <sup>165</sup>.

### **Función.**

Dos cepas de ratones, que llevaban mutaciones espontáneas en el gen de SHP-1, demostraron la importancia de esta fosfatasa en el control de diversas vías de señalización. Éstas cepas se denominan *motheaten* (me) y *motheaten viable* (mev). Los primeros carecen de SHP-1, en tanto que los segundos presentan una forma mutada que solamente retiene un 20 % de la actividad normal <sup>166</sup>. Los ratones homocigotos para éstas mutaciones presentan cuadros de inmunodeficiencia severa en combinación con un cuadro autoinmune, infecciones recurrentes y muerte prematura como consecuencia de neumonitis hemorrágicas <sup>167</sup>.

El análisis de todos estos cambios ha demostrado que esta fosfatasa es un importante regulador del funcionamiento del sistema hematopoyético actuando como un inhibidor de las rutas que promueven proliferación, supervivencia, adhesión y activación celular. En concreto, SHP-1 se puede unir y desfosforilar receptores tirosina quinasa, tirosinas quinasas citosólicas y/o efectores de estas quinasas tales como ERKs, JNK, STAT, NF $\kappa$ B, c-Src y PI3K/AKT (figura 29) <sup>168,169</sup>. De hecho, numerosos estudios han demostrado que SHP-1 disminuye ó desaparece en distintos cánceres hematopoyéticos por lo que se ha propuesto que SHP-1 actuaría como un gen supresor de tumores, evitando el desarrollo de leucemias y linfomas <sup>170</sup>.

Por otro lado, se observa una expresión moderada de ésta proteína en otros tipos de tejidos y células epiteliales tumorales <sup>171,172</sup>, incluyendo el epitelio prostático <sup>173</sup> y múltiples trabajos comienzan a demostrar su implicación en procesos de relevancia en el tejido epitelial, como el control del ciclo celular <sup>156</sup>, y la regulación de las vías de transducción de señales iniciadas por somatostatina <sup>174</sup>.

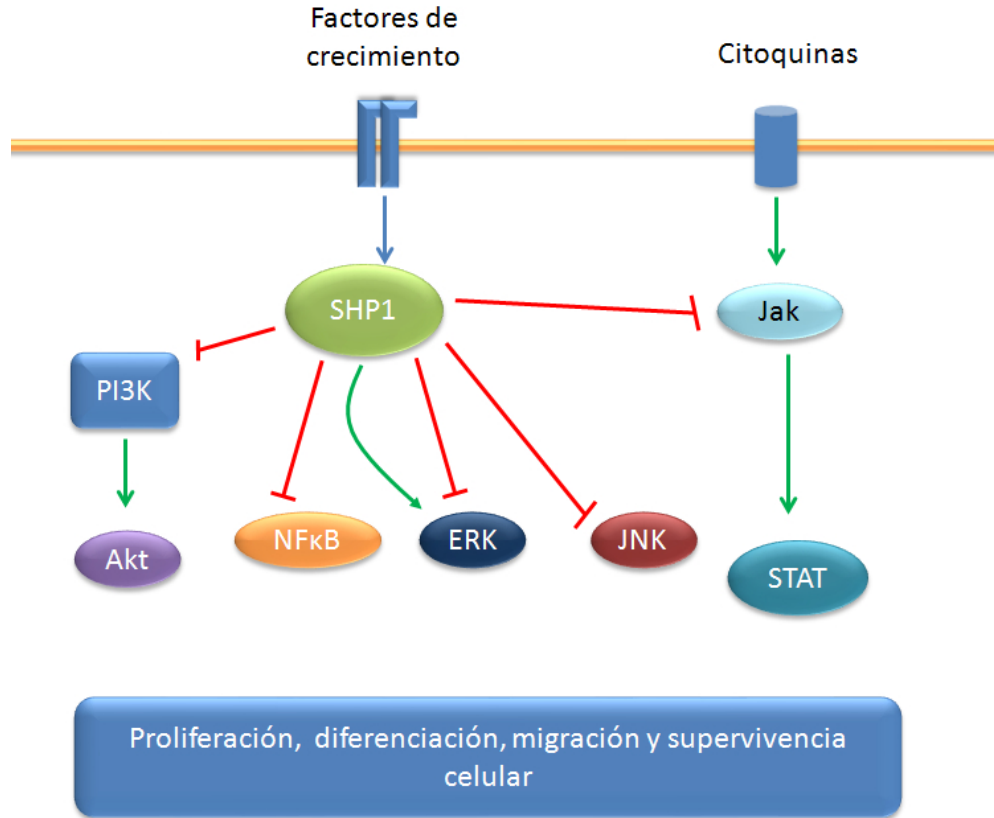


Figura 29: **Actividades biológicas de SHP-1.** SHP-1 juega un papel importante en la regulación de rutas de transducción activadas por factores de crecimiento y citoquinas, las cuales modulan procesos biológicos tales como la proliferación, la migración y la supervivencia celular. SHP-1 reprime la ruta PI3K/AKT en ciertos tipos celulares, así como la vía de NFκB. Además, esta fosfatasa regula tanto positiva como negativamente a las quinasas ERK, según el contexto subcelular. También está demostrada la regulación negativa que ejerce sobre la ruta Jak/STAT. Adaptado de Chong y Maiese, 2007<sup>153</sup>.

## OBJETIVOS.

---

---

El cáncer de próstata es una de las patologías malignas más frecuentes entre los varones de los países desarrollados. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no muere como consecuencia de la acción tumoral primaria, sino debido a la propagación de los mismos a sitios distales, constituyendo las metástasis. Por ello es fundamental estudiar el conjunto de mecanismos moleculares implicados en éste proceso, describiendo nuevas dianas terapéuticas.

En la actualidad, se encuentra ampliamente reconocido el papel que ejerce la vía de PI3K/AKT en la progresión tumoral y durante la última década los estudios centrados en ésta quinasa han crecido espectacularmente. En el caso de la próstata esta ruta es clave para la supervivencia celular y colabora con el receptor de andrógenos para regular el crecimiento y la progresión tumoral. AKT presenta tres isoformas cada una de ellas con funciones únicas. Sin embargo, se conoce muy poco sobre las diferencias en especificidad de sustrato y rutas de señalización controladas por cada una de estas isoformas y sobre sus potenciales reguladores. En éste sentido, nuestro grupo ha demostrado que la fosfotirosina fosfatasa SHP-1 regula la actividad de AKT interaccionando con la subunidad reguladora de PI3K y controlando la fosforilación de la subunidad catalítica. Por todo ello, en éste trabajo nos planteamos el siguiente objetivo general:

**Determinar la implicación de las isoformas de AKT en la regulación de los procesos celulares implicados en la progresión tumoral prostática y analizar si SHP-1 es un regulador de la ruta PI3K/AKT estudiando el modo y lugar de actuación y las consecuencias de esta interrelación.**

Para la consecución de éste objetivo:

- Determinaremos el papel de las isoformas de AKT en la proliferación de las células PC-3 analizando las posibles modificaciones de diferentes reguladores del ciclo celular y los mecanismos moleculares responsables de las mismas.
- Evaluaremos la implicación de las isoformas de AKT en el fenotipo adhesivo/migratorio de las células PC-3, estudiando su acción sobre diferentes rutas que regulan dichos procesos.
- Analizaremos el papel de la fosfotirosina fosfatasa SHP-1 en la regulación de la vía PI3K/AKT. Para ello, estudiaremos el efecto de esta fosfatasa sobre la actividad de PI3K y sobre cada una de las isoformas de AKT.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

---

## Materiales.

### Cultivos celulares:

- ◆ Frascos de cultivos, placas y multiplacas de plástico esterilizadas comerciales: *Nunc™ Brand Products* y *Falcon Becton Dickinson Labware*.
- ◆ Materiales para el procesamiento de las células: PBS, tripsina-EDTA, suero fetal bovino (FBS), antibióticos y medio de cultivo RPMI-1640 de *Invitrogen Life Technologies*.

### Tratamientos y matrices.

#### Matriz extracelular.

- ◆ Colágeno tipo I (*Sigma-Aldrich*).

#### Tratamientos.

- ◆ Rapamicina (*Rapamycin in solution™, Calbiochem*).

### Interferencia por ARN

#### Transfecciones.

- ◆ Reactivo de transfección *Oligofectamine™, Invitrogen Life Technologies*.
- ◆ Medio de cultivo optimizado, libre de suero y antibióticos, *Optimem™, Invitrogen Life Technologies*.

### Análisis de proteínas.

#### Extracción.

- ◆ Tritón X-100, o-vanadato de sodio, inhibidor de tripsina (STI), Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) todos adquiridos de *Sigma-Aldrich*.
- ◆ Coctel comercial de inhibidores de proteasas (*Complete EDTA-Free de Roche*).

#### Cuantificación.

- ◆ *Protein Assay* de *BioRad* y albúmina sérica bovina (BSA) de *Sigma-Aldrich*.

### Anticuerpos contra:

- ◆ AKT (todas las isoformas), de *SantaCruz*.
- ◆ AKT1, AKT2 y AKT3, de *Cell Signaling*.
- ◆  $\beta$ -tubulina, de *Sigma-Aldrich*.
- ◆ CDK2, de *SantaCruz*.



- ◆ CDK6, de *SantaCruz*.
- ◆ Ciclina E, de *Neomarkers*.
- ◆ Ciclina D1, de *Neomarkers*.
- ◆ FAK, de *Transduction Laboratories*.
- ◆ Fosfo-AKT (S473 y T308), de *Cell Signaling*.
- ◆ Fosfo-FAK en los residuos Y397, Y407, Y576 y Y861, de *Biosource*.
- ◆ Fosfo-p27 en los residuos S10 y T187, de *SantaCruz*.
- ◆ Fosfo-p27 (T157), de *R&D Systems*.
- ◆ Fosfo-p44/42, de *Cell Signaling*.
- ◆ Fosfo-pRb en los residuos S795, S807/811, de *Cell Signaling*.
- ◆ Fosfo-Src Y416 y Fosfo-Src Y527, de *Cell Signaling*.
- ◆ Fosfo-p70S6K (T389), de *Cell Signaling*.
- ◆ IgG de ratón conjugado con HRP, de *Sigma-Aldrich*.
- ◆ IgG de conejo, conjugado con HRP, de *Calbiochem*.
- ◆ IgG de ratón conjugado con Alexa™ 488, de *Invitrogen*.
- ◆ IgG de conejo conjugado con Alexa™ 647, de *Invitrogen*.
- ◆ La subunidad reguladora p85 de PI3K, de *Upstate-Millipore*.
- ◆ SHP-1, de *Transduction Laboratories*.
- ◆ Src, de *Cell Signalling*.
- ◆ p27, de *SantaCruz*.
- ◆ p70S6K total, de *Cell Signaling*.
- ◆ pRb, de *Cell Signaling*.

#### **Inmunoprecipitación y ensayos de *pull down*.**

- ◆ Proteína G-Sepharosa (*Sigma-Aldrich*).
- ◆ Glutación-Sepharosa (*GE Healthcare*).

#### **Inmunodetección de proteínas por Western blot:**

- ◆ Equipo de electroforesis vertical y electrotransferencia (*Mini Protean™ 3 Cell*) de *BioRad*.
- ◆ Solución de Acrilamida-Bisacrilamida (40%), tampón de migración Tris-Glicina-SDS 10X y tampón de transferencia Tris-Glicina 10X todos de *BioRad*.
- ◆ Marcadores de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards Dual* de *BioRad*).

- ◆ Membranas de PVDF (*GE Healthcare*).
- ◆ El reactivo quimioluminiscente *ECL™ Western Blotting Detection Reagents* y las placas radiográficas de alta sensibilidad, especiales para quimioluminiscencia *Hyperfilm™ ECL™* fueron adquiridas de *Amersham Life Science*.

#### Citometría de flujo:

- ◆ Se utilizó un citómetro de flujo modelo *FACScalibur (Beckton Dickinson)*. Para el análisis del ciclo celular se utilizó *Nonidet-P40 (Roche)*, Ribonucleasa A (RNasa A) (*Sigma-Aldrich*) y yoduro de propidio (*Molecular Probes, Invitrogen Life Technologies*).
- ◆ Para el análisis del potencial de la membrana mitocondrial se utilizó la sonda TMRM (*tetra-methylrhodamine, methyl ester, perchlorate*) de *Molecular Probes (Invitrogen)*.

#### Cuantificación de la síntesis de ADN:

- ◆  $^3[H]$ -Timidina de *Amersham Life Science*.

#### Ensayos de Actividad quinasa de PI3K y Src:

- ◆  $[\gamma -^{32}P]$ ATP de *Perkin Elmer*.
- ◆ Fosfatidilinositol, Fosfatidilserina y Fosfatidilinositol-4-fosfato de *Avanti Polar Lipids*.
- ◆ *Raytide™* de *Calbiochem*.

#### Ensayos de Adhesión:

- ◆ *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-(2,5-diphenyltetrazolium) bromide* ó MTT de *Sigma-Aldrich*.
- ◆ Dimetilsulfóxido (DMSO) de *Panreac*.

#### Extracción de ARN, retrotranscripción y PCR a tiempo real:

- ◆ Para la extracción de ARN se utilizó el reactivo comercial *Trizol Reagent™, Invitrogen Life Technologies*.
- ◆ Para la retrotranscripción: *RNAsin™* (inhibidor de RNAsas), retrotranscriptasa MMLV y cebadores hexámeros de secuencia aleatoria todos de *Promega*.
- ◆ Para PCR a tiempo real se utilizó una mezcla de reacción optimizada *Fast Start Taqman™ Probe Master (Roche)*, así como diversas sondas de hidrólisis comerciales (*Universal ProbeLibrary Set Human* de *Roche*).

El resto de reactivos químicos utilizados fueron de calidad Biología Molecular adquiriéndose de distintas casas comerciales: *Sigma-Aldrich, Roche Molecular Biochemicals, Merck, Böehringer-Manheim* y *Fluka*.

## Métodos.

### 1. Cultivos celulares.

a) Se ha utilizado principalmente la línea celular tumoral prostática humana PC-3 obtenida de la *American Type Culture Collection* (**ATCC CRL-1435**). Esta línea celular procede de una metástasis ósea de adenocarcinoma de próstata grado IV, caracterizada en 1979 por Kaighn y cols.<sup>175</sup>. Son células de cariotipo alterado, con 62 cromosomas y cierto grado de inestabilidad citogenética. No expresan PSA, muestran escasa actividad fosfatasa ácida y testosterona-5 $\alpha$ -reductasa y carecen de receptor para andrógenos, lo que las convierte en células independientes de andrógenos, siendo capaces de producir tumores xenógrafos indiferenciados de alta capacidad invasiva y metastatizante. Clínicamente representan la etapa independiente de andrógenos del cáncer de próstata.

b) Además, se han utilizado las líneas celulares tumorales prostáticas LNCaP (**ATCC CRL-1740**) y DU-145 (**ATCC HTB-81**) obtenidas también de la *American Type Culture Collection* y procedentes de una metástasis en ganglio linfático y de una metástasis en cerebro de un adenocarcinoma de próstata respectivamente.

- ◆ Las líneas celulares se cultivaron en un medio RPMI-1640. En todos los casos, los medios contenían antibióticos (0,25 mg/ml de penicilina, 0,25 mg/ml de estreptomina y 2,5 mg/ml de fungizona) y suero fetal bovino al 10 % v/v, excepto en el caso de las LNCaP, donde la concentración de suero fetal bovino fue del 7 % v/v. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda en presencia de 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 2-3 días hasta alcanzar un 80 % - 90 % de confluencia, momento en que las células se disociaron de su soporte con tripsina 0,05 % - EDTA 0,02 % en PBS.

### 2. Obtención de extractos celulares.

- ◆ Las células se lavaron con PBS suplementado con 0,5 M de o-vanadato (inhibidor de tirosina fosfatasas) mantenido en frío y posteriormente se lisaron con Tritón X-100 al 1 % en tampón base (Tris-HCl 50mM (pH 7,5); NaCl 140 mM; EDTA 1 mM; fenilmetilsulfonil fluoride 0,1 mM; o-vanadato de sodio 1 mM e inhibidores de proteasas comerciales adicionados según indicaciones del fabricante). Los extractos celulares se mantuvieron en este tampón durante 25 minutos a 4 °C en rotación y a continuación se centrifugaron a 12.000  $\times g$  durante 10 minutos a 4 °C, recogiendo los sobrenadantes para la inmunoprecipitación o para la inmunodetección de proteínas. La determinación de la cantidad de proteínas presentes en la muestra se realizó mediante el método de Bradford y como estándar se utilizó una solución de albúmina sérica bovina de concentración conocida (1 mg/ml).

### 3. Inmunoprecipitación.

- ♦ La purificación de la proteína de interés se realizó utilizando un anticuerpo específico y precipitando el complejo antígeno-anticuerpo con proteína G-Sepharosa.
- ♦ La proteína G-Sepharosa (35  $\mu$ l/muestra) se lavó 2 veces con tampón base, centrifugándose cada vez a 1500 $\times$ g durante 1 minuto a 4 °C. A continuación, se prelavó la muestra (1 mg de proteína) con proteína G durante 1 hora a 4 °C en rotación, con el fin de evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se centrifugó a 1500 $\times$ g durante 1 minuto a 4 °C, separando la proteína G del sobrenadante (muestra). A partir de éste paso se aplicaron dos estrategias:
  - a) La muestra se incubó con el anticuerpo específico (3  $\mu$ g) durante toda la noche en rotación a 4 °C. Finalizado este periodo, se agregó, a los complejos antígeno-anticuerpo formados, nueva proteína G, dejando nuevamente en rotación durante 1 hora a 4 °C. Luego, se centrifugó la mezcla a 1500 $\times$ g durante 1 minuto a 4 °C para separar el inmunoprecipitado (IP) del sobrenadante.
  - b) Se adicionó una dilución del anticuerpo primario (1/100 preparada en tampón base) a la proteína G-Sepharosa y se incubó 2 horas en rotación a 4 °C. Tras eliminar el anticuerpo no unido al soporte, se puso en contacto la muestra con los complejos proteína G-Sepharosa/anticuerpo preformados, dejándose en rotación toda la noche. Pasado este periodo, se centrifugó la mezcla a 1500 $\times$ g durante 1 minuto a 4 °C para separar el inmunoprecipitado (IP) del sobrenadante.
- En ambos casos el inmunoprecipitado se lavó 4 veces con tampón base, centrifugando nuevamente a 1500 $\times$ g durante 1 minutos cada vez. Tras el último lavado se añadió 50  $\mu$ l del tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8); SDS 3%; EDTA 4 mM; glicerol 5%;  $\beta$ -mercaptoetanol 1% y azul de bromofenol 0,1%). Seguidamente, se calentó a 100 °C durante 5 minutos, para desnaturalizar las proteínas y separar la proteína G de la muestra inmunoprecipitada. Se centrifugó a 13.000 $\times$ g durante 2 minutos, se recogió 50  $\mu$ l del sobrenadante (proteína inmunoprecipitada) y se cargó en un gel de poliacrilamida al porcentaje adecuado en presencia de SDS para proceder a la inmunodetección de proteínas.

#### 4. Ensayos de detección *in vitro* de proteínas GTPasas activas y de SHP-1.

- ♦ La actividad de las GTPasas RhoA y Rac1 así como las interacciones *in vitro* de SHP-1, se determinaron mediante ensayos de captura y unión (“pull down”). Para ello utilizamos proteínas de fusión que contienen GST unida a una zona de reconocimiento específico para RhoA y Rac activas (amablemente cedidas por el Dr. Antonio Chiloeches, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá) ó a SHP-1 (generosamente enviada por el Dr. Frank Böhmer de la Universidad Friedrich Schiller, Alemania), lo que permite precipitar los complejos con Glutación-sepharosa una vez formados.

Para el caso de la detección de RhoA-GTP se utilizó una proteína de fusión que contiene el dominio N-terminal de la proteína Rhotekina murina (aminoácidos 7-89) unida a GST (GST-Rhotekina). Para el caso de Rac1-GTP se utilizó una proteína de fusión que contiene el dominio de interacción de la proteína PAK (**p21 Activated Kinase**) con Cdc42 y Rac (dominio denominado CRIB, denominación proveniente de **Cdc42/ Rac Interacting Binding Domain**) unida a GST (GST-CRIB).

En el caso de SHP-1, la proteína de fusión era SHP-1 salvaje ("wild type") unida a GST.

a) *Expresión de las proteínas de fusión*

- ◆ Se partió de la cepa bacteriana BL21 de *Escherichia coli* transformada con el vector de expresión que contiene en cada caso el gen que codifica para la proteína de fusión correspondiente. Después de cultivar las bacterias, se indujo la expresión de la proteína de fusión utilizando 1 mM de IPTG durante 4 a 5 horas a 37°C. A continuación las células se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos y el precipitado bacteriano se resuspendió en tampón de homogeneización (Tris-HCl 50 mM (pH 8); Cl<sub>2</sub>Mg 2 mM; Sacarosa 20 %p/v; DTT 2 mM e inhibidores de proteasas según recomendaciones del fabricante). Posteriormente las bacterias se sonicaron con 3 pulsos de 45 segundos cada uno y posteriormente se adicionó NP-40 a una concentración final de 1 %v/v. Se rotó durante 1 hora a 4°C y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos. Se adicionó glicerol a los sobrenadantes (a una concentración final de 10 % v/v) y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización. Para comprobar la pureza de la sobreexpresión de la proteína de fusión, los extractos obtenidos se separaron mediante electroforesis y se tiñeron con azul de Coomasie.

b) *Ensayos de captura y unión ("pull down") de las GTPasas pequeñas RhoA y Rac1 y SHP-1*

- ◆ Detección de RhoA-GTP y Rac1-GTP: El soporte de GST-Sepharosa (50 µl/muestra) se lavó 3 veces con tampón de lavado (PBS suplementado con Cl<sub>2</sub>Mg (10 mM) e inhibidores de proteasas), centrifugándose cada vez a 1500×g durante 1 minuto a 4°C y se puso en contacto la proteína de fusión con dicho soporte durante 2 horas en rotación a 4°C. Finalmente se lavó 3 veces con tampón de lavado. Posteriormente, las células se lisaron con tampón de lisis (Tris 50 mM (pH 7,2); Tritón X-100 1 %v/v; Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM; ClNa 500 mM) y se centrifugó 5 minutos a 13.000×g. El lisado se adicionó al complejo proteína de fusión–GST-Sepharosa y se incubó en rotación durante 30 minutos a 4°C. Tras 3 lavados con PBS, los complejos fueron separados con tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8); SDS 3 %; EDTA 4 mM; glicerol 5 %; β-mercaptoetanol 1 % y azul de bromofenol 0,1 %), se calentó y posteriormente las muestras fueron sometidas a análisis de Western blot.
- ◆ Detección de SHP-1: El soporte de GST-Sepharosa (30 µl/muestra) se lavó 3 veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50mM (pH 7,5); NaCl 140 mM; EDTA 1 mM; fenilmetilsulfonil fluoride

0,1 mM; o-vanadato de sodio 1 mM e inhibidores de proteasas comerciales adicionados según indicaciones del fabricante), centrifugándose cada vez a  $1500 \times g$  durante 1 minuto a 4 °C y se puso en contacto la proteína de fusión con el mismo durante 1 hora en rotación a 4 °C. Durante esa hora las células fueron lisadas con Tritón X-100 al 1 % en tampón base (Tris-HCl 50mM (pH 7,5); NaCl 140 mM; EDTA 1 mM; fenilmetilsulfonil fluoride 0,1 mM; o-vanadato de sodio 1 mM e inhibidores de proteasas comerciales adicionados según indicaciones del fabricante) y 1 mg de proteína total se puso en contacto con 25  $\mu$ l de GST-Sepharosa en rotación a 4 °C, con el fin de eliminar las uniones inespecíficas. Tras el paso de preaclerado de las muestras, éstas fueron puestas en contacto con el complejo proteína de fusión–GST-Sepharosa durante 18 horas en rotación a 4 °C. Tras 3 lavados con tampón de lavado, los complejos fueron separados adicionando tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8); SDS 3 %; EDTA 4 mM; glicerol 5 %;  $\beta$ -mercaptoetanol 1 % y azul de bromofenol 0,1 %), se calentó a 95 °C durante 5 minutos y posteriormente las muestras fueron sometidas a análisis de Western blot.

## 5. Inmunodetección de proteínas (Western blot).

### a) *Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).*

- ♦ Los extractos celulares obtenidos según se indicó anteriormente (entre 25 y 75  $\mu$ g de lisado total, según la proteína a analizar) se desnaturalizaron por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos en tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8); SDS 3 %; EDTA 4 mM; glicerol 5 %;  $\beta$ -mercaptoetanol 1 % y azul de bromofenol 0,1 %) y se depositaron en geles de poliacrilamida–SDS al 7 %, 10 % ó 12 %, dependiendo de la proteína que se deseaba analizar. La migración se llevó a cabo a 150 voltios en tampón de migración (Tris-HCl 25 mM (pH 8,3); Glicina 192 mM y SDS 0,1 %).

### b) *Transferencia.*

- ♦ Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF mediante la aplicación de una diferencia de potencial de 110 voltios durante 90 minutos a temperatura ambiente en tampón de transferencia (Tris- HCl 25 mM (pH 8,3); glicina 192 mM; metanol 20 %).

### c) *Inmunodetección con anticuerpos específicos.*

- ♦ Al finalizar la transferencia la membrana se incubó en una solución de bloqueo constituida por leche desnatada en polvo (5 % p/v) o albúmina sérica bovina (5 % p/v) en tampón T-TBS (Tris 0,1 mM (pH 8); ClNa 1,5 mM y 0,05 % Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo específico de la proteína que se deseaba detectar. Dicho anticuerpo se diluyó en T-TBS más leche en polvo desnatada al 5 % o albúmina sérica bovina al 5 % (según recomendaciones del

fabricante) y se incubó durante toda la noche a 4 °C ó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esta incubación se lavó la membrana con T-TBS, 4 veces durante 10 minutos cada lavado. A continuación, se incubó la membrana con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, diluido en el mismo tampón que se utilizó con el anticuerpo primario, durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavó la membrana 4 veces durante 10 minutos con T-TBS. Al finalizar los lavados se incubó la membrana con un reactivo quimioluminiscente como sustrato de la peroxidasa. Para visualizar los resultados se impresionaron placas radiográficas de alta sensibilidad. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas, se realizó con la ayuda del programa *Image J*.

## 6. Transfección de ARN de interferencia.

- ♦ Se sembraron 125.000 células en placas de 35 mm de diámetro y, al día siguiente, se transfectaron con un ARN pequeño de interferencia específico para el gen de SHP-1, AKT1, AKT2 ó AKT3 usando como agente de transfección *Oligofectamina*<sup>™</sup> (*Invitrogen*). En paralelo, se transfectaron células con un ARN que no inhibe la expresión de ningún gen humano y al que denominamos *scrambled* (SC) y que se utilizó como control. Por cada punto a ensayar se diluyeron 100 pmoles de los distintos ARN en 180  $\mu$ l de medio *Optimem*<sup>™</sup> (*Invitrogen*) libre de suero y de antibióticos y, por otro lado, se diluyeron 4  $\mu$ l de *Oligofectamina*<sup>™</sup> en 11  $\mu$ l del mismo medio. Posteriormente, se mezclaron ambas soluciones y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el medio RPMI-1640 en el que habían sido sembradas las células se reemplazó por 800  $\mu$ l de medio *Optimem*<sup>™</sup> más los 200  $\mu$ l de la mezcla de transfección, incubándose toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se reemplazó el medio de transfección por medio RPMI-1460 con 10% de FBS pero sin antibióticos. Finalmente, las células se incubaron durante 48 horas más. En total, tras 72 horas postransfección se alcanza la máxima inhibición de la expresión de los distintos genes de interés.

## 7. Extracción de ARN y retrotranscripción.

- ♦ Para el aislamiento del ARN total, se utilizó el reactivo comercial *Trizol Reagent*<sup>™</sup> (*Invitrogen*) según indicaciones del fabricante. Una vez aislado y cuantificado el ARN, se procedió a la retrotranscripción del mismo utilizando una mezcla de reacción compuesta por una solución tampón (Tris-HCl 7,5 mM (pH 9); KCl 5 mM; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM), y los reactivos comerciales (*Promega*): *RNasin*<sup>™</sup>, como inhibidor de RNAsas (20 unidades), cebadores hexámeros con secuencias aleatorias (50 pmoles), la retrotranscriptasa MMLV (200 unidades), solución mezcla de dNTPs (0,2 mM), así como 1  $\mu$ g de ARN. Para evitar la formación de estructuras secundarias en el ácido nucleico aislado, la mezcla de ARN y los cebadores aleatorios fueron previamente desnaturalizados calentando a 72 °C durante 10 minutos. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 37 °C durante 60 minutos, se-

guidos de 5 minutos a 95 °C para inactivar la retrotranscriptasa. Posteriormente, 5  $\mu$ l de cada retrotranscrito fue utilizado como matriz para reacciones de amplificación.

## 8. PCR a tiempo real.

- Los retrotranscritos obtenidos según se describe en el apartado anterior fueron utilizados para la amplificación por PCR a tiempo real. En nuestros experimentos utilizamos la mezcla de reacción optimizada *Fast Start Taqman™ Probe Master (Roche)*, la cual es una solución tampón que contiene una *Taq*-polimerasa químicamente modificada, dNTPs y  $MgCl_2$ . Además, utilizamos dos sondas de hidrólisis comerciales a una concentración final de 0,2  $\mu$ M (*Universal ProbeLibrary, Set Human de Roche*), una para el gen de interés y otra para el gen de referencia. Estas sondas presentan el fluoróforo de marcaje *FAM* y el fluoróforo apantallante *TAMRA*. Los cebadores específicos fueron obtenidos comercialmente de *Invitrogen* y fueron utilizados a una concentración final de 1  $\mu$ M (Cuadro 3).

Gen	Número de acceso	Cebador izquierdo	Cebador derecho	Sonda
<i>Ciclina E</i>	NM_001238.1	GGC CAA AAT CGA CAG GAC	GGG TCT GCA CAG ACT GCA T	GGA GCC AG
<i>p27</i>	NM_004064.2	GCA CAT AAA CTT TGG GGA AGG	TCA AAG CAA GCT CTT CAT ACC C	GGC TGA GG
<i>18s</i>	NR_003286.1	GGA GAG GGA GCC TGA GAA AC	TCG GGA GTG GGT AAT TTG C	GAA GGC AG

Cuadro 1: Secuencias utilizadas en los cebadores en PCR a tiempo real.

- La amplificación se realizó con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales constó de 15 segundos a 95 °C más 1 minutos a 60 °C. El termociclador utilizado fue un equipo *Fast Real Time PCR System 7500 (Applied Biosystem)*. Se llevó a cabo una cuantificación relativa de la expresión génica utilizando el método de la “curva estándar”.

## 9. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo y del potencial de membrana mitocondrial con sonda TMRM por citometría de flujo.

- Se transfectaron células PC-3 según se describió anteriormente. A las 72 horas postransfección, se recogió el sobrenadante de las placas de cultivo y las células se lavaron con PBS, recogándose en el mismo tubo este PBS y las células que pudiese contener. Las células adheridas se disociaron con tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37 °C. Se anuló el efecto de la tripsina añadiendo medio completo. A continuación todas las células recogidas, se centrifugaron a 1500 *rpm* durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en medio completo. Posteriormente, se separaron las células en dos tubos:
  - Para el ciclo celular se añadió NP-40 a una concentración final de 0,5% v/v y RNasa-A a una concentración final de 64  $\mu$ g/ml. Se incubó 30 minutos a 4 °C. Justo antes de pasar



las muestras por el citómetro, se le añadió yoduro de propidio (50  $\mu\text{g/ml}$ )

- En otro tubo se añadió la sonda TMRM a una concentración final de 200 nM y se incubó 30 minutos a 37 °C en atmósfera húmeda en presencia de 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, los tubos se traspasaron a un termobloque a 37 °C para evitar las variaciones de temperatura durante el análisis en el citómetro.

*TMRM es una sonda lipofílica con carga positiva que atraviesa la membrana celular y se une a la membrana mitocondrial interna la cual posee una carga negativa (población TMRM positiva). En la apoptosis, se produce una caída del potencial eléctrico mitocondrial por pérdida del gradiente electroquímico, con la consecuente pérdida de carga negativa de la membrana interna. La sonda TMRM entonces, no se une y difunde de la célula (población TMRM negativa).*

- Por último, las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo modelo *FACScalibur* de *Beckton Dickinson* (Unidad de cultivos celulares, UAH). Se excitó con una láser de argón de 488 nm y la fluorescencia emitida se recogió a 585 nm. Los datos obtenidos se analizaron mediante los programas informáticos *WinMDI* y *Cylchred*.

#### 10. Recuento celular y ensayo de viabilidad celular.

- Se transfectaron células PC-3 con ARN de interferencia según se describió. A las 24, 48 y 72 horas postransfección, las células se lavaron con PBS y se disociaron con tripsina-EDTA, anulando el efecto de la tripsina al añadir medio completo ó bien se recogieron las células que se encontraban flotando. Posteriormente, se contaron en una cámara cuentaglobulos, ó se realizó un ensayo de viabilidad de células suspendidas.
- En el caso del ensayo de viabilidad celular, las células se centrifugaron a 1500 *rpm* durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de PBS conteniendo yoduro de propidio a una concentración final de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Posteriormente, las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo (Unidad de cultivos celulares, UAH). Se excitó con una láser de argón de 488 nm y la fluorescencia emitida se recogió a 585 nm. Las células que incorporan el yoduro de propidio van a ser células que no mantienen la integridad de su membrana plasmática y, por tanto, se consideran no viables.

#### 11. Incorporación de <sup>3</sup>[H]-timidina.

- Para determinar la proliferación celular se analizó la síntesis de ADN mediante la incorporación de <sup>3</sup>[H]-timidina. Para ello, se transfectaron células PC-3 con ARN de interferencia. A las 72 horas postransfección, se reemplazó el medio de crecimiento por 1 ml de medio que contenía 0,4  $\mu\text{Ci/ml}$  de <sup>3</sup>[H]-timidina y se incubó 4 horas a 37 °C. Posteriormente, se eliminó el medio con <sup>3</sup>[H]-timidina y se lavó 3 veces con PBS. Luego se incubó con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % durante 15 minutos a 4 °C. Tras la incubación, se eliminó el TCA y

se lavó 3 veces con metanol absoluto. En ese momento, se dejó secar al aire completamente y después se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de una solución de NaOH 0,1 M más SDS al 1 %. Finalmente, los 500  $\mu\text{l}$  se transfirieron a viales y se añadió 2 ml de líquido de centelleo (*Emulsifier-Safe Optimase 3* de *Perkin Elmer*) y se agitó hasta formar una emulsión. Las desintegraciones por minuto (*dpm*) fueron detectadas en un contador de centelleo líquido  $\beta$  (*Wallac, Turku*; Planta de tratamiento de Isótopos de la UAH).

## 12. Cuantificación de la actividad PI3K.

- Las células PC-3 fueron transfectadas con los distintos ARN de transferencia ó un control (SC) y tras 72 horas de transfección se procedió a la inmunoprecipitación de la subunidad p85 de PI3K. Al inmunoprecipitado se adicionó una mezcla de reacción conteniendo 250 ng de fosfadilinositol (*Avanti Lipids*), 12,5 mM de cloruro de magnesio y una solución de Mg-ATP a una concentración de 440  $\mu\text{M}$  conteniendo 30  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma -^{32} P]\text{ATP}$ . Se permitió la reacción durante 15 minutos a 28 °C, y finalmente se detuvo la misma adicionado 20  $\mu\text{l}$  de HCl 8 M y 160  $\mu\text{l}$  de una mezcla de metanol:cloroformo en partes iguales. Los productos formados fueron separados por cromatografía en capa fina, utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo:metanol:agua:hidróxido de amonio al 25 % en una proporción de 60:47:11,3:2 v/v/v/v respectivamente. La placa de cromatografía fue expuesta a -80 °C durante al menos 5 horas y posteriormente los productos radiactivos fueron detectados mediante autorradiografía.
- Para identificar los productos generados se adicionaron como controles una muestra de fosfatidilinositol-4-fosfato (*Avanti Polar Lipids*) no radiactiva cuya presencia se reveló en una cubeta de vidrio utilizando vapores de yodo, y una muestra de inmunoprecipitación tratada con el inhibidor de PI3K, LY294002 (*Calbiochem*).

## 13. Cuantificación de la actividad quinasa de Src.

- Las células PC-3 fueron transfectadas con una secuencia control ó un siRNA específico y tras 72 horas se inmunoprecipitó Src total. Al precipitado se le añadió el soporte artificial para ensayos de actividad tirosina quinasa *Raytide*<sup>TM</sup> (0,5 mg/ml) así como una solución conteniendo 200  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma -^{32} P]\text{ATP}$ ; 0,15 mM de ATP no radiactivo y 30 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Tras 30 minutos de incubación a 30°C la reacción fue detenida adicionando ácido fosfórico (8 % v/v) y alícuotas de 120  $\mu\text{l}$  se dispensaron sobre pequeños cuadros de papel de filtro de 2x2 cm. Los papeles se lavaron 5 veces con tampón de lavado (100 mM de NaCl; 20 mM de HEPES pH 7,2; 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 5 mM de  $\text{MnCl}_2$ ) y una vez con acetona. Tras el secado de los mismos, se les adicionó líquido de centelleo y las desintegraciones por minuto fueron obtenidas utilizando un contador  $\beta$  (*Wallac, Turku*; Planta de tratamiento de Isótopos de la UAH).

#### 14. Inmunofluorescencia.

- ♦ La localización subcelular de distintos antígenos, se determinó utilizando anticuerpos específicos contra estas proteínas así como anticuerpos secundarios conjugados con moléculas fluorescentes. Con este fin, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo con PBS, se bloqueó con BSA al 1 % en PBS durante 1 hora a 37°C. Después, se incubó con el anticuerpo primario (1:100) en solución de bloqueo durante 1 hora a 37 °C ó toda la noche a 4 °C. La detección del anticuerpo unido se realizó incubando durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo según corresponda) conjugado al fluoróforo *Alexa<sup>TM</sup>488* o *Alexa<sup>TM</sup>633* (1:2000) también diluido en solución de bloqueo. En el caso del análisis de los filamentos de actina, en vez de incubar con los anticuerpos mencionados, se procedió a incubar con faloidina unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una concentración final de 3  $\mu$ M en solución de bloqueo durante 15 minutos a 37 °C. La solución de montaje (*Invitrogen*) contiene *DAPI* (4',6-diamidino-2-fenilindol) que se utilizó para la tinción de los núcleos. Tras 24 horas, las muestras se analizaron utilizando un microscopio confocal *Leica TCS-SL*.

#### 15. Ensayos de adhesión, extensión y migración celular.

- ♦ Para estos estudios, se utilizó colágeno tipo I, componente mayoritario de la matriz extracelular del hueso.

##### a) Preparación de la matriz extracelular.

- ♦ Para recubrir las placas, se utilizó colágeno tipo I resuspendido en ácido acético 10 mM, adicionándose a las placas a razón de 8  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> e incubándose toda la noche a 4°C. Al día siguiente se aspiró el exceso de colágeno y se lavó con PBS.

##### b) Preparación de las células.

- ♦ Las células PC-3 se transfectaron con los distintos ARN de transferencia según se indicó anteriormente y para estudios de adhesión y extensión se mantuvieron las últimas 24 horas con medio RPMI-1640 sin suero.
- ♦ Las células, se disociaron del soporte con tripsina-EDTA. A continuación, la tripsina se neutralizó con medio RPMI-1640 sin suero más 0,1 % de inhibidor de tripsina (STI). Las células se centrifugaron a 1500 *rpm* durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante, re-suspendiendo el precipitado celular en medio RPMI-1640 sin suero más 0,1 % de albúmina sérica bovina (BSA). En ese momento, las células se contaron y se mantuvieron en suspensión a 37 °C durante 60 minutos. Con éstas células se realizaron los experimentos de adhesión, extensión y migración celular.

c) *Ensayo de adhesión celular.*

- ◆ Para éstos ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos, recubiertas previamente con colágeno tipo I. Por cada punto a evaluar se sembraron 15.000 células. Tras 5, 10, 20, 40 y 60 minutos de incubación a 37 °C, se aspiró y se lavó con PBS. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de medio RPMI-1640 sin suero más 0,5 mg/ml de MTT (*Sigma-Aldrich*) y se incubó a 37 °C durante 3 horas. Posteriormente, se aspiró el medio y se añadieron 100  $\mu$ l de DMSO hasta solubilizar el precipitado obtenido. Por último, se midió la absorbancia a 570 y 630 nm. La absorbancia obtenida va a ser directamente proporcional al número de células adheridas a la matriz empleada.

d) *Ensayo de extensión celular.*

- ◆ En el caso de los ensayos de extensión celular, se sembraron 100.000 células en placas de 35 mm de diámetro precubiertas con colágeno tipo I y se incubaron durante 10, 30 y 60 minutos a 37 °C. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron con PBS. Finalmente, utilizando un microscopio óptico, se fotografiaron al menos tres campos y se cuantificó el número de células extendidas. Se consideraron células extendidas aquellas que habían perdido su morfología redondeada y su refringencia.

e) *Ensayo de migración celular.*

- ◆ Se llevaron a cabo utilizando cámaras *transwell* (*Costar; Sigma-Aldrich*). Estas cámaras constan de dos compartimentos: uno superior (inserto), cuya base es una membrana de policarbonato con poros de 8  $\mu$ m y que se recubrió con colágeno tipo I, y otro inferior donde se añadió medio RPMI-1640 libre de FBS. Las células se añadieron en el compartimiento superior y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Tras ese tiempo, se eliminaron las células de la cara superior de la membrana, con un bastoncillo de algodón. Las células de la cara inferior de la membrana, que eran las que habían migrado, se fijaron y se tiñeron con el kit *Microscopy Hemacolor* (*Merck*). Finalmente, se fotografiaron al menos 3 campos diferentes para cuantificar las células que habían migrado.

## 16. Análisis estadístico.

- ◆ Se realizaron al menos 3 experimentos independientes de cada ensayo y los datos se analizaron mediante software apropiado (*Graph Prism*™). Un valor *p* menor a 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS.

---

## Papel de las isoformas de AKT en la proliferación celular.

### Regulación de la proliferación celular de la línea PC-3 por las isoformas de AKT.

La vía de PI3K/AKT ha sido ampliamente estudiada por sus implicaciones en el desarrollo de neoplasias. En éste sentido, actualmente se empieza a reconocer la existencia de funciones biológicas no redundantes ejercidas por las isoformas de AKT que inciden directamente en la progresión tumoral<sup>138,143,176</sup>. Para profundizar en este estudio, nos planteamos analizar los efectos del silenciamiento de isoformas de AKT sobre algunas características fenotípicas fundamentales en el desarrollo tumoral, como la proliferación, la adhesión ó la migración, utilizando la línea celular PC-3, que constituye un modelo de estudio de metástasis prostática. Utilizamos ARN pequeños de interferencia (siRNA) para alcanzar dicho silenciamiento dirigidos contra cada una de las isoformas de AKT ó bien una secuencia control que no inhibe la expresión de ninguna proteína (SC).

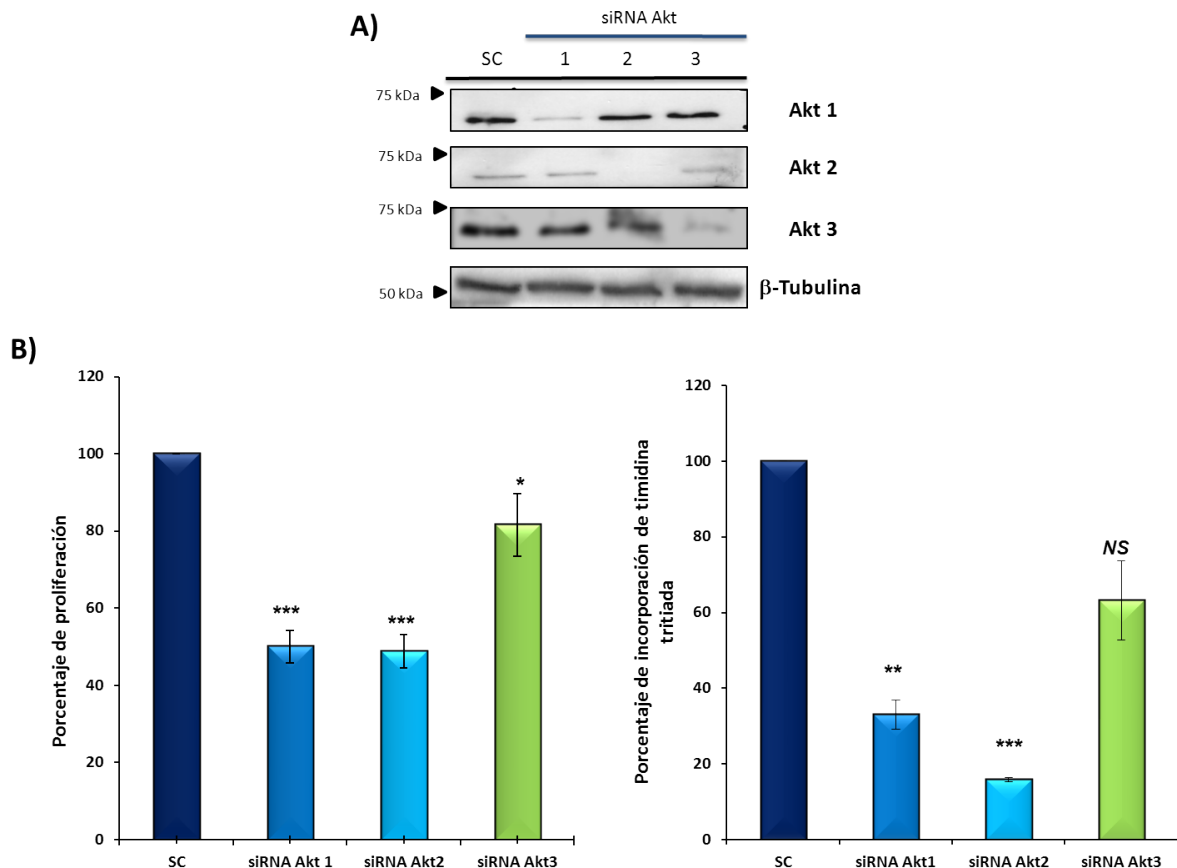


Figura 30: **Efectos del silenciamiento de isoformas de AKT sobre la proliferación celular en células PC-3.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1, 2 ó 3). (A) Tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles de cada isoforma de AKT utilizándose como control de carga  $\beta$ -tubulina. Bajo ésta condición se contó el número de células (B) y se realizaron estudios de incorporación de timidina tritiada para cuantificar la síntesis de ADN (C). Los gráficos representan los valores promedios  $\pm$  DEM de tres experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  versus SC).

Como se muestra en la figura 30A, tras 72 horas de transfección la interferencia por ARN provocó una disminución de la expresión de las tres isoformas de AKT superior al 90 %, con respecto a los niveles proteicos observados en el control. En la misma figura se observa que las anulaciones alcanzadas,

mediante las secuencias empleadas, son específicas de cada isoforma, sin afectar la expresión de las restantes.

Tras comprobar la eficacia de los diferentes siRNA, nos planteamos analizar si esta disminución afecta al crecimiento de las células PC-3. Para ello, tras 72 horas de transfección, levantamos las células de su soporte de plástico y contamos su número total, tanto en la situación control como bajo la anulación de cada isoforma.

Como se aprecia en la figura 30B, el silenciamiento de cualquiera de las isoformas provoca una disminución en el número de células totales: bajo la anulación de AKT1 ó AKT2 se observa alrededor de un 50 % menos de células con respecto al control, en tanto que al silenciar la isoforma 3 observamos una reducción estadísticamente significativa de un 15 % aproximadamente.

También analizamos la síntesis de ADN en las células PC-3, cuantificando la incorporación de timidina tritiada. Observamos (figura 30C) que al silenciar AKT1 se produce una disminución en la incorporación de dicho marcador de un 67 % con respecto al control, en tanto que la disminución es del 85 % al inhibir AKT2. Con respecto a la anulación de AKT3 observamos una disminución de un 35 % en la incorporación de timidina, diferencia que no resultó ser estadísticamente significativa.

Estos datos indican que la disminución de los niveles de cualquiera de las tres isoformas de AKT provoca la inhibición de la proliferación de las células PC-3, aunque esta menor proliferación se observa principalmente al anular AKT1 y AKT2.

Posteriormente quisimos estudiar la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular, mediante ensayos de citometría de flujo.

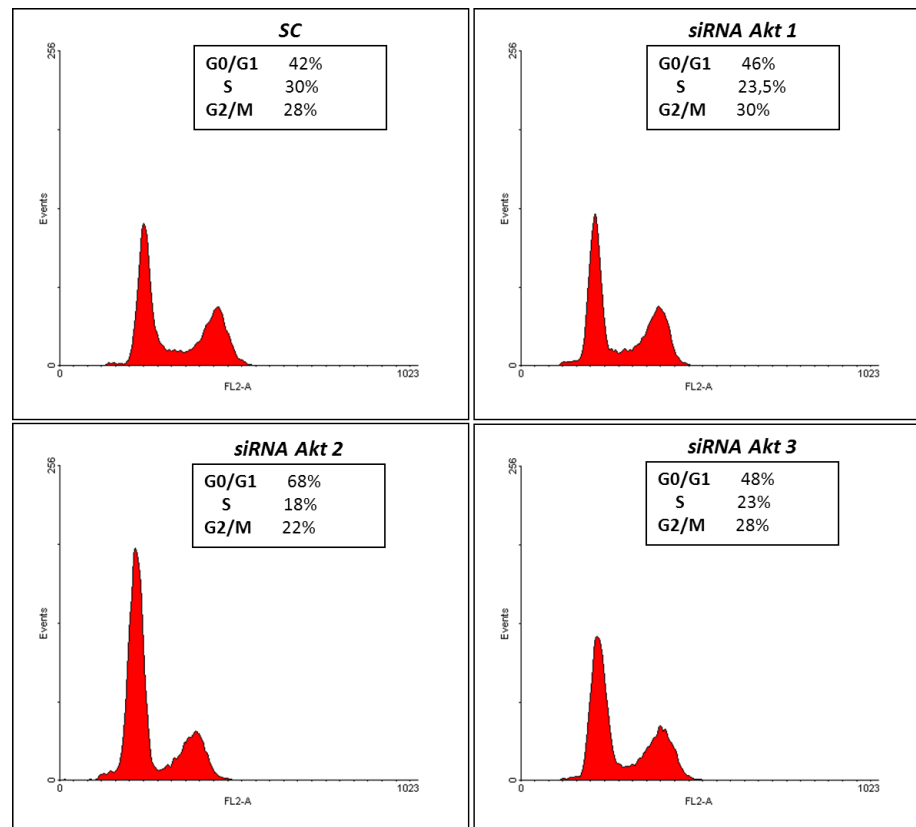


Figura 31: **Efectos de la anulación de isoformas de AKT sobre la distribución del ciclo celular.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1, 2 ó 3). Tras 72 horas de transfección se analizó la distribución celular en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Se muestran los perfiles de citometría, así como los valores de un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 31, la anulación de las isoformas 1 ó 3 no afecta la distribución de las células entre las fases del ciclo celular. Sin embargo, el silenciamiento de la isoforma 2 provocó una parada en la fase G0/G1 del ciclo celular: se observa que al anular dicha isoforma el porcentaje de células en fase G0/G1 aumenta al 68% con respecto al 42% observadas en el control (lo cual supone un aumento del 62%, estadísticamente significativo). Además, el número de células en fase S disminuye al 18%, con respecto al 30% observado en las células control (un descenso del 40%).

Con el fin de confirmar que éstos resultados no se producen como consecuencia de un incremento en la muerte celular, se realizaron ensayos de incorporación de la sonda TMRM.



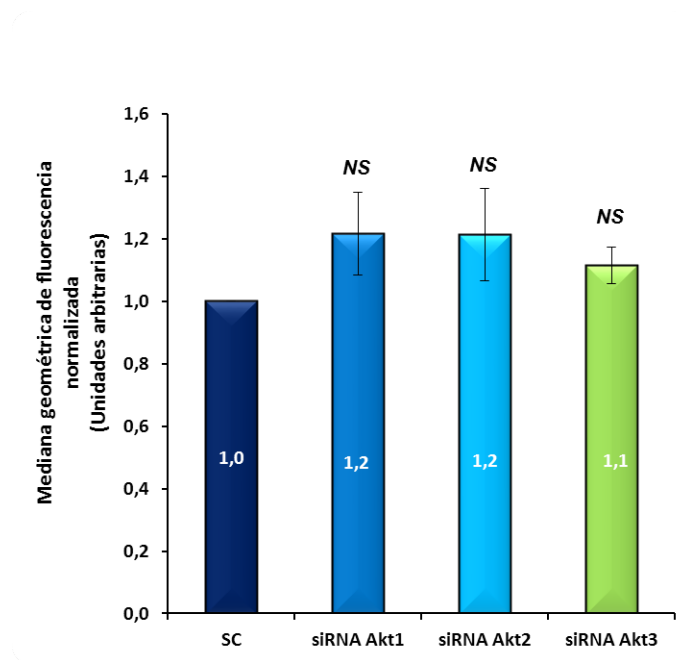


Figura 32: **Efectos de la inhibición de isoformas de AKT sobre la supervivencia celular.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1, 2 ó 3). Tras 72 horas de transfección se analizó la supervivencia celular mediante la incorporación de la sonda TMRM. Los datos representan los valores promedios normalizados de la mediana geométrica de fluorescencia  $\pm$  DEM de tres experimentos independientes (NS  $p > 0,05$  versus SC).

Como se observa en la figura 32, los resultados obtenidos indican que, tras 72 horas de silenciamiento de las distintas isoformas de AKT, las células PC-3 no sufren un incremento estadísticamente significativo de la muerte celular.

En conjunto, éstos resultados indican que la inhibición de la proliferación celular inducida por la anulación de AKT2, pero no la de AKT1 ó AKT3, se debe a una parada en G0/G1, poniendo de manifiesto que ésta isoforma ejerce un papel clave en el control del ciclo celular.

Considerando los datos obtenidos anteriormente, en los que demostramos que la isoforma 3 no parece desempeñar un papel relevante en el control de la proliferación y en conjunción con diversas cuestiones técnicas y metodológicas, a partir de ésta observación nos centramos en el estudio del papel de las isoformas AKT1 y AKT2.

## Regulación del punto de control G1/S por isoformas de AKT.

### Regulación de la ciclina D1 por las isoformas de AKT.

Los resultados obtenidos sugieren un control diferencial del ciclo celular por parte de las isoformas de AKT, por lo que nos planteamos analizar la expresión de algunas de las proteínas reguladoras del ciclo, con especial énfasis en aquellas directamente implicadas en el pasaje G1/S.

El modelo de transición G1/S sugerido por Sherr y cols.<sup>24</sup>, ha sido ampliamente aceptado y, de modo simplificado, propone que tras la llegada de una señal mitogénica se formarán los complejos ciclina D/CDK4-6 los que fosforilarán a pRb, promoviendo así la síntesis de ciclina E y generándose posteriormente los complejos ciclina E/CDK2. En éste paso existe una retroalimentación positiva porque

dichos complejos mantendrán el estado de hiperfosforilación de pRb. Por otra parte, los complejos ciclina E/CDK2 también fosforilan a p27, el que actúa como un inhibidor de CDK. El conjunto de los eventos permite el pasaje a través del punto de control G1/S y, en consecuencia, el desarrollo correcto del ciclo celular.

Basándonos en éste modelo, y dada nuestra observación de parada en el ciclo celular en G0/G1 al silenciar AKT2 en las células PC-3, nos planteamos averiguar si las isoformas de AKT ejercían un control específico sobre el punto de control G1/S, analizando en primer lugar los niveles de ciclina D1. Como se observa en la figura 33, el silenciamiento de AKT1 no modificó los niveles de dicha ciclina. Sin embargo, el de AKT2 provocó una disminución de aproximadamente un 90% en los niveles de ciclina D1, con respecto al control.

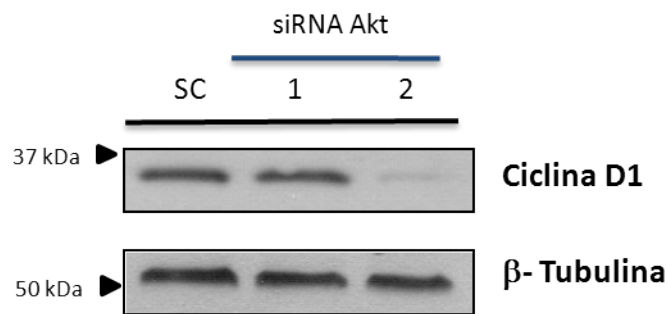


Figura 33: **Efecto de la disminución de isoformas de AKT sobre niveles de ciclina D1.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). Tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles proteicos de ciclina D1, mediante *western blot*, utilizándose como control de carga  $\beta$ -tubulina. La imagen muestra un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

Posteriormente, evaluamos los niveles de CDK6, la pareja funcional de ciclina D1, al anular AKT1 ó 2. Como observamos en la figura 34, nuevamente el silenciamiento de AKT2 provocó una disminución en los niveles de CDK6 (de aproximadamente un 40%), sin observarse cambios en sus niveles bajo la anulación de la isoforma 1.

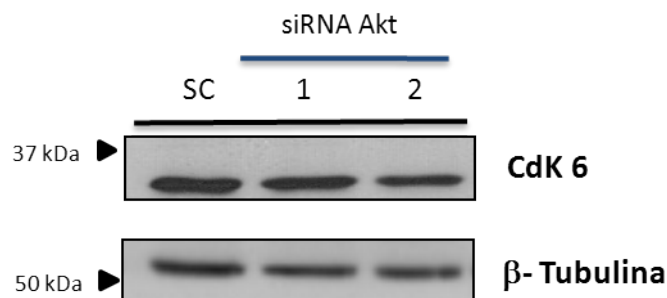


Figura 34: **Efecto de la disminución de isoformas de AKT sobre CDK6.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). Tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles proteicos de CDK6, mediante *western blot*, utilizándose como control de carga  $\beta$ -tubulina. La imagen muestra un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

Dado que las funciones de regulación del ciclo celular que ejerce ciclina D1 dependen de su correcta localización subcelular, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia con el fin de analizar la localización de ciclina D1, al silenciar AKT2. Como se observa en la figura 35, los niveles nucleares descienden de modo coordinado con los niveles proteicos totales.

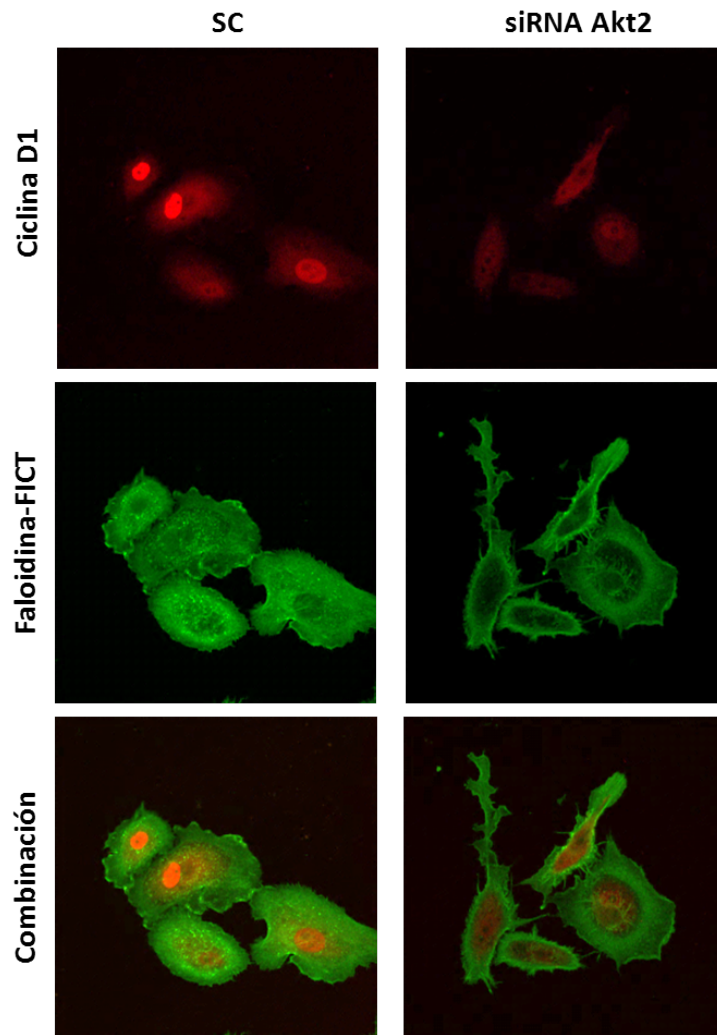


Figura 35: **Efecto de la anulación de AKT2 sobre localización de ciclina D1.** Se transfectaron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o un siRNA específico contra la isoforma 2 de AKT (siRNA AKT2). Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron a las 72 horas postransfección como se indica en Materiales y Métodos. En rojo se ha marcado ciclina D1 y en verde actina, adicionándose una tercera imagen de superposición de ambas (Combinación).

Posteriormente, nos centramos en evaluar las causas que provocan el descenso de los niveles de ciclina D1. Como hemos indicado en la Introducción, se ha demostrado que AKT activa el complejo mTORC-1. Dicho complejo se encuentra firmemente ligado a la regulación de los niveles de ciclina D1 ya que, una vez activo, fosforilará el residuo Thr389 de p70S6K (*p70 Ribosomal S6 Kinase*), lo que conduce a la activación de ésta última<sup>177</sup>, dando como resultado final un aumento en la traducción del mRNA de ciclina D1. Por lo tanto, evaluamos si en las células PC-3, AKT controla los niveles de ciclina D1 a través de mTORC y de uno de sus efectores como es p70S6K.

Como se observa en la figura 36A, la inhibición del complejo mTORC-1 por rapamicina disminuye la fosforilación de p70S6K en la Thr389, provocando una caída en los niveles de ciclina D1 comparables a los observados al inhibir AKT2 (superior al 90% con respecto a los niveles del control).

Tras comprobar que el complejo mTORC-1 se encuentra implicado en la regulación de los niveles de ciclina D1 a través de p70S6K en nuestro modelo celular, comprobamos si AKT2 controla los niveles de ciclina D1 por medio de ésta vía. Como observamos en la figura 36B, solamente la anulación de AKT2 provoca una disminución en la fosforilación del residuo Thr389 de dicha quinasa. No se observaron

variaciones estadísticamente significativas al inhibir la isoforma 1, coincidiendo con la ausencia de variación en los niveles de ciclina D1.

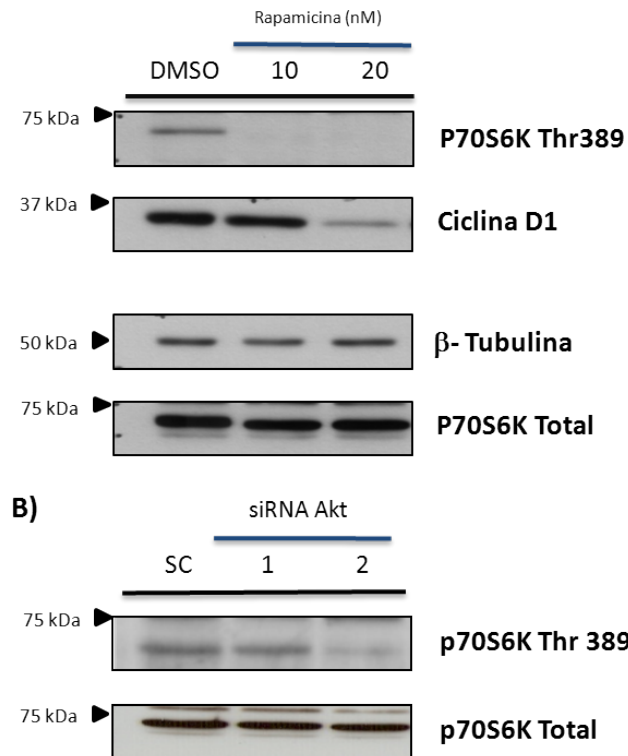


Figura 36: **Regulación diferencial de los niveles de ciclina D1 por parte de las isoformas de AKT.** **A)** Se cultivaron células PC-3 y tras 24 horas se eliminó el FBS del medio de cultivo (0% de FBS). Tras 24 horas las células fueron tratadas con distintas concentraciones de rapamicina, permitiéndose su acción durante 24 horas. Pasado éste tiempo, las células fueron lisadas y se analizaron los niveles de ciclina D1 mediante *western blot*, utilizándose  $\beta$ -tubulina como control de carga. También se utilizó la fosforilación del residuo Thr389 de p70S6K como control de inhibición de mTOR. La imagen muestra un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes. **B)** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). Tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles de fosforilación de p70S6K en el residuo Thr389, utilizándose como control de carga p70S6K total. La imagen muestra un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

Nuestros resultados demuestran que AKT2, pero no AKT1, puede regular los niveles de ciclina D1 a través de mTORC-1 y p70S6K.

### Regulación de pRb, ciclina E y CDK2 por las isoformas de AKT.

Al inicio del ciclo celular, pRb se encuentra unido a los factores de transcripción E2F, inhibiendo su actividad e impidiendo la progresión del ciclo a través de la fase G1. Tras la llegada de un estímulo mitogénico, los complejos ciclina D/CDK4-6 que se generen fosforilarán a pRb, provocando cambios conformacionales que eliminan su unión a dichos factores, permitiendo la progresión normal del ciclo celular <sup>178</sup>.

Dado que observamos una disminución en los niveles de ciclina D1, así como de CDK6, nos planteamos estudiar el estado de fosforilación de algunos residuos de pRb.

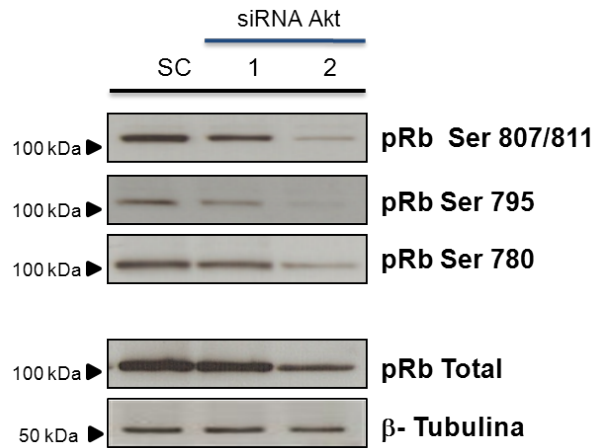


Figura 37: **Efecto de la disminución de isoformas de AKT sobre la expresión y fosforilación de pRb.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). Tras 72 horas de transfección se analizaron, mediante *western blot*, los niveles proteicos de pRb total así como las fosforilaciones en sus residuos de serina 807/811, 795 y 780. Se utilizó como control de carga  $\beta$ -tubulina. La imagen muestra un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

Como muestra la figura 37, al silenciar AKT1 observamos una disminución en la fosforilación de los residuos Ser807/811 y Ser795 de aproximadamente un 20 % en ambos casos, sin observar diferencias significativas en la fosforilación del residuo Ser780 y sin observar cambios significativos en los niveles totales de la proteína pRb.

Sin embargo, es destacable indicar que cuando silenciamos AKT2 se produce una drástica disminución (de aproximadamente un 75%) en los niveles totales de la proteína pRb, lo que se traduce en una disminución superior al 70 % en los niveles de fosforilación de todos los residuos analizados.

Esta brusca caída en los niveles de pRb, inducida por el silenciamiento de AKT2, liberaría los factores de transcripción E2F permitiendo la transcripción de los genes bajo su control, como la ciclina E. Por lo tanto, nos planteamos analizar si los efectos observados sobre pRb repercuten sobre los niveles de dicha ciclina.

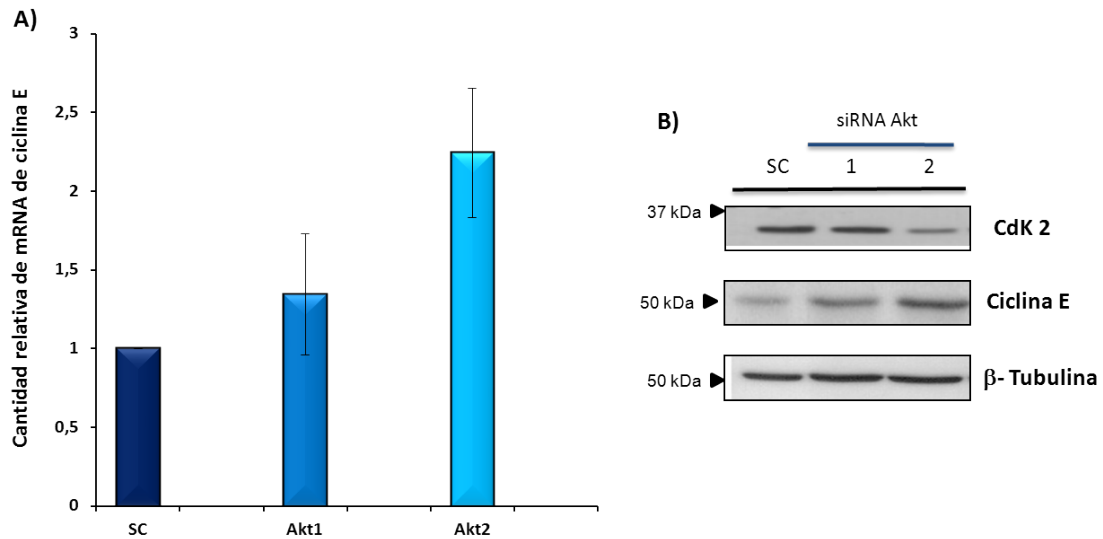


Figura 38: **Efecto de la anulación de isoformas de AKT sobre la expresión de ciclina E.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). **A)** Tras 72 horas se obtuvo ARN total y se cuantificó los niveles de ciclina E mediante PCR a tiempo real, según se describe en Materiales y Métodos. **B)** También, tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles proteicos de ciclina E y su pareja funcional, CDK2, mediante *western blot*, utilizándose como control de carga  $\beta$ -tubulina. La imagen muestra un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 38A la transcripción de ciclina E aumenta de modo estadísticamente significativo (\*  $p < 0,05$  según el test no paramétrico de Wilcoxon) tanto al silenciar la isoforma 1 (1,3 veces con respecto al control) como la 2 (2,2 veces con respecto al control). Dicho incremento en la transcripción de ciclina E se refleja en un aumento de sus niveles proteicos de un 30 % en el caso del silenciamiento de AKT1 y aproximadamente 150 % al anular AKT2.

Posteriormente evaluamos los niveles de CDK2, pareja funcional de ciclina E, al silenciar AKT1 y 2. Como se observa en la figura 38B, los niveles de CDK2 disminuyen alrededor de un 50 % al silenciar AKT2 pero no se modifica al anular AKT1.

Estos resultados indican que el silenciamiento de AKT2 disminuye drásticamente los niveles de pRb provocando el aumento de los niveles de ciclina E que se ven contrarrestados por la disminución de CDK2. El silenciamiento de AKT1 no modificó los niveles de pRb aunque disminuyó ligeramente la fosforilación de algunos residuos de dicha proteína, llevando a un ligero aumento en la transcripción de ciclina E. Los niveles de CDK2 no se vieron modificados bajo la anulación de ésta isoforma.

### Regulación del metabolismo de p27 por las isoformas de AKT.

La continuidad del ciclo celular puede verse afectada por los inhibidores de CDKs (CKI) y, como expusieramos en la Introducción, se ha demostrado ampliamente la regulación ejercida por la vía PI3K/AKT sobre algunos de dichos inhibidores, entre los que destaca p27<sup>179</sup>. Sin embargo, a pesar del conocido papel ejercido por AKT sobre p27, aún no se ha analizado la contribución de las isoformas de AKT al metabolismo de dicho inhibidor. Por lo tanto, y para profundizar en este estudio, analizamos los efectos de silenciar las isoformas de AKT sobre la regulación transcripcional, la estabilidad proteica y la

localización subcelular de p27.

En primer lugar, mediante interferencia por ARN anulamos la expresión de las isoformas de AKT y evaluamos por *western blot* los niveles totales de p27.

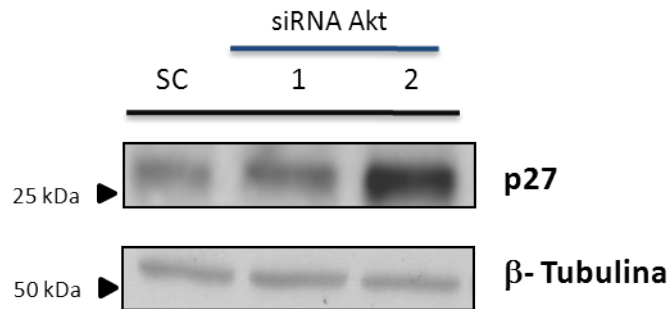


Figura 39: **Efecto de la disminución de isoformas de AKT sobre los niveles de p27.** Se transfectoron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). Tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles de p27 mediante *western blot*, utilizándose como control de carga  $\beta$ -tubulina. La imagen muestra un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 39, la disminución de las isoforma 1 no modificó los niveles proteicos de éste inhibidor. Sin embargo, la disminución de AKT2 provoca un importante aumento en los niveles proteicos de p27, llegando a ser 2,5 veces mayor respecto al control.

Para continuar nuestro trabajo y, con el objeto de analizar si el incremento de p27 observado al silenciar AKT2 puede deberse a cambios en la regulación transcripcional del gen, evaluamos los niveles de mRNA de p27 al anular las isoformas 1 y 2. El silenciamiento de AKT1 no provocó cambios estadísticamente significativos en las cantidades relativas de mRNA de p27. Sin embargo, cuando anulamos la expresión de AKT2, observamos un aumento cercano al 100 % en las cantidades de transcritos de dicho inhibidor (figura 40).

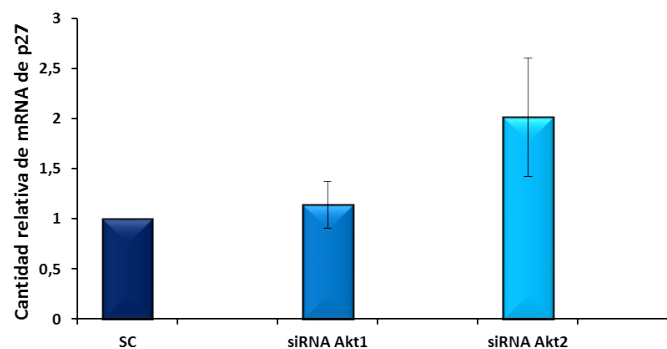


Figura 40: **Efecto de la disminución de isoformas de AKT sobre los niveles de mRNA de p27.** Se transfectoron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2) y tras 72 horas se obtuvo ARN total y se cuantificó los niveles de p27 mediante PCR a tiempo real, según se describe en Materiales y Métodos.

Además del aumento en la transcripción, existe la posibilidad de que el aumento proteico observado se deba a una mayor estabilidad proteica ó una menor degradación. En éste sentido cabe recordar que se ha descrito que la fosforilación en el residuo Thr187 de p27, mediante los complejos ciclina E/CDK2, permite su interacción con la ligasa de ubiquitinas Skp2, marcándolo para la degradación

proteasomal<sup>58</sup>. Además, se ha descrito que la fosforilación en el residuo Ser10 de p27 garantiza a dicho inhibidor una mayor estabilidad proteica<sup>64</sup>.

Por ello, llegados a éste punto quisimos analizar si el aumento de p27 observado por la disminución de AKT2 podría deberse a alguna de las causas reseñadas anteriormente.

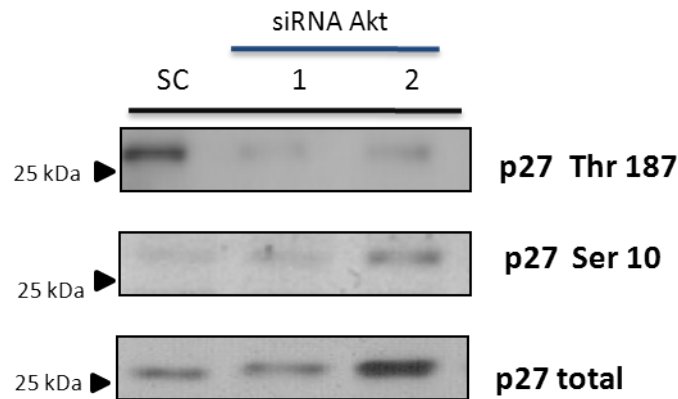


Figura 41: **Efecto de la inhibición de isoformas de AKT sobre la fosforilación de p27.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). Tras 72 horas de transfección se analizaron, mediante *western blot*, los niveles proteicos de p27 total así como las fosforilaciones en sus residuos de treonina 187 y de serina 10. La imagen muestra un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

Nuestros resultados (figura 41) indican una disminución importante en los niveles de fosforilación del residuo Thr187 (mayor al 85%, con respecto a la situación control), tanto al anular AKT1 como AKT2. Por otra parte, no observamos cambios estadísticamente significativos en los niveles de fosforilación del residuo Ser10 al silenciar las isoformas 1 ó 2 de AKT. Por tanto, el aumento de los niveles de p27 bajo la anulación de AKT2 puede ser provocado por un aumento en la estabilidad proteica, como se desprende de la observación de la disminución en la fosforilación del residuo Thr187 en ésta condición. Para confirmar ésta posibilidad realizamos el silenciamiento de AKT2 y tratamos dichas células con cicloheximida a distintos tiempos, con el objeto de inhibir la traducción. Como se observa en la figura 42, la estabilidad de p27 se encuentra aumentada al silenciar AKT2, con respecto a la situación control.



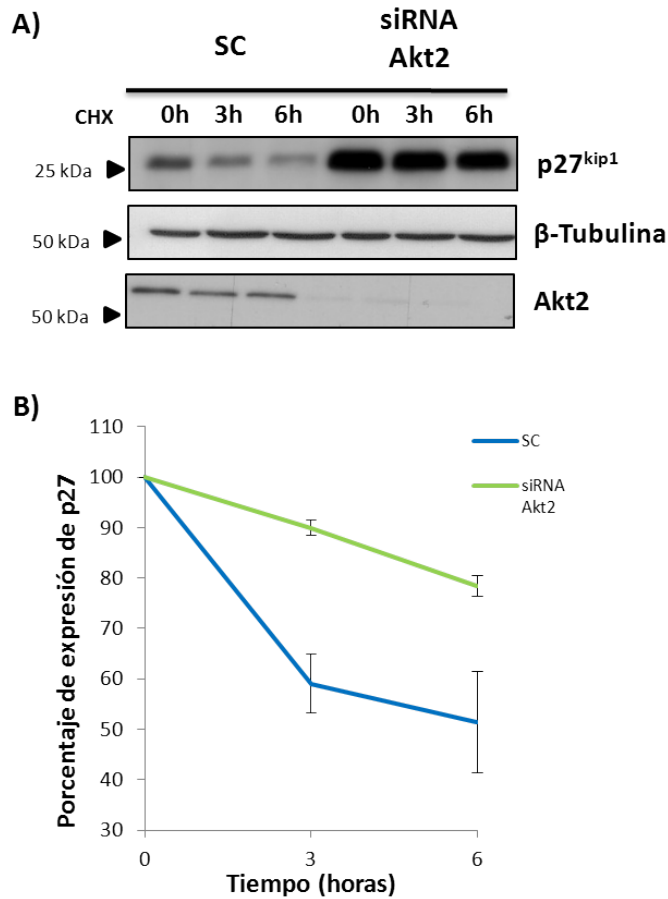


Figura 42: **Efecto de la inhibición de isoformas de AKT sobre la estabilidad de p27.** (A) Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para AKT2. Tras 72 horas de transfección se trataron las células con cicloheximida (100  $\mu$ g/ml) durante 3 y 6 horas y se analizaron mediante *western blot*, los niveles proteicos de p27 total. En la figura B se muestra el análisis densitométrico de los resultados de los análisis de *western blot*.

La localización subcelular de p27 también va a regular las funciones de dicho inhibidor. En éste sentido, se ha descrito que AKT es capaz de regular la movilización de p27 entre compartimentos, a través de la fosforilación en el residuo Thr157<sup>180</sup>. Tras dicha fosforilación p27 no puede ser trasladado al núcleo, evitando que ejerza su control sobre el ciclo celular. Por ello, nos planteamos analizar si las isoformas de AKT juegan un papel en ésta regulación. Para ello, las silenciamos y evaluamos mediante *western blot* el estado de fosforilación del residuo Thr157 de p27.

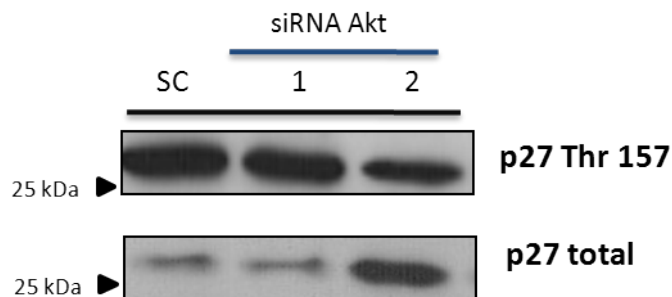


Figura 43: **Efecto de la disminución de isoformas de AKT sobre la fosforilación de p27.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). Tras 72 horas de transfección se analizaron, mediante *western blot*, los niveles proteicos de p27 total así como la fosforilación en su residuo de Thr157, utilizándose como control de carga  $\beta$ -tubulina. La imagen muestra un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 43 la disminución de la isoforma 1 de AKT no provoca ningún efecto sobre la fosforilación estudiada, sin embargo el silenciamiento de AKT2 disminuye los niveles dicha fosforilación en aproximadamente un 80 %, con respecto a la situación control.

Considerando el resultado anterior, llevamos adelante estudios de inmunofluorescencia para confirmar la existencia de un cambio de localización de p27 al anular la expresión de las isoformas de AKT.

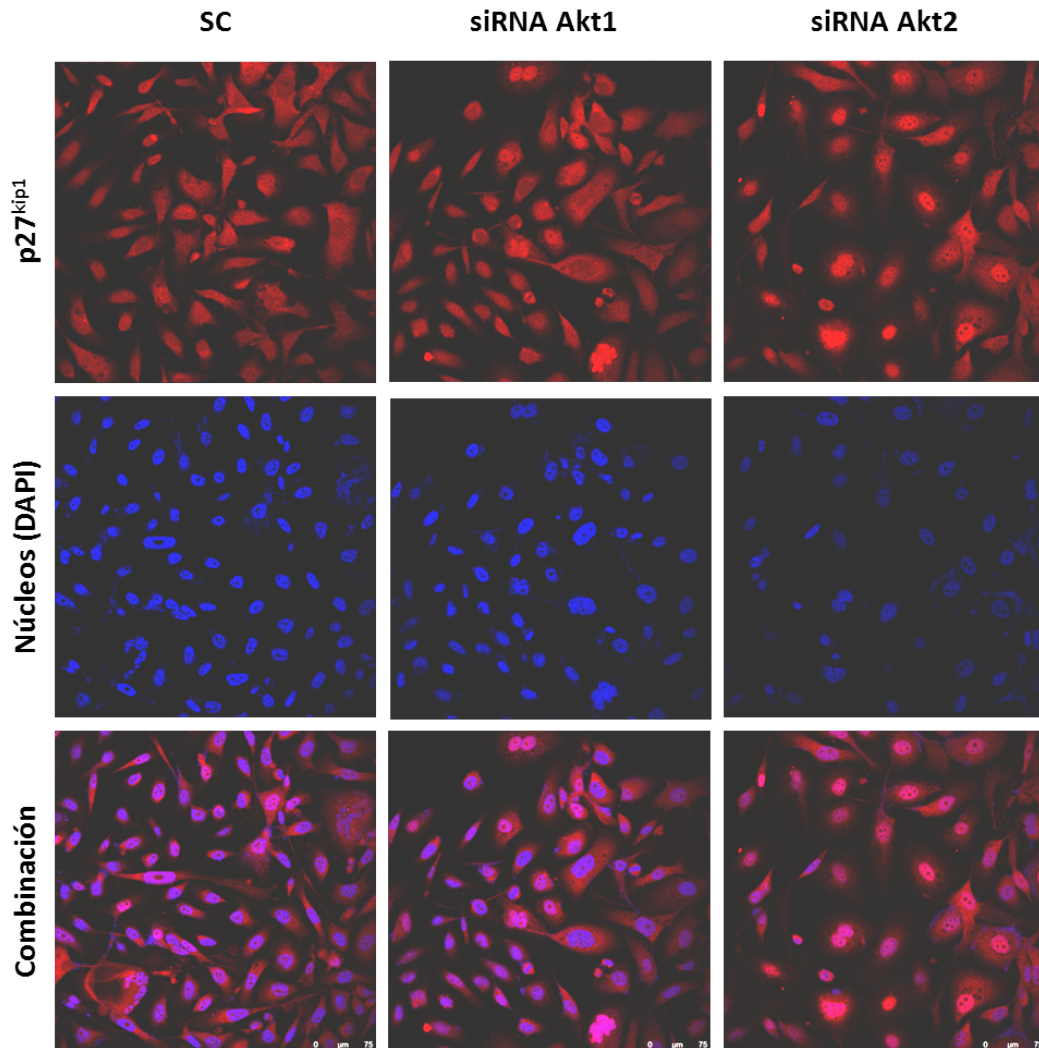


Figura 44: **Efecto de la anulación de isoformas de AKT sobre la localización de p27.** Se transfectaron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o un siRNA específico contra la isoforma 1 ó 2 de AKT. Tras 72 horas las células fueron fijadas, permeabilizadas y se realizaron estudios de inmunofluorescencia según como se indica en Materiales y Métodos. En rojo se ha marcado p27 y en azul los núcleos, adicionándose una tercera imagen de superposición de ambas (Combinación).

Como observamos en la figura 44, la disminución de AKT1 no provoca ningún tipo de redistribución llamativa de p27 entre los compartimentos subcelulares. Sin embargo, el silenciamiento de AKT2 provocó un aumento global de la señal fluorescente de p27, observándose además bajo ésta condición, una mayor concentración nuclear de éste inhibidor.

En conjunto, estos resultados indican que es AKT2 la isoforma responsable de las fosforilaciones que conducirán a la degradación proteasomal de p27 así como a su exclusión nuclear, permitiendo de éste modo la progresión del ciclo celular.

## Regulación de la proliferación celular de otras líneas cancerígenas prostáticas por las isoformas de AKT.

Considerando los efectos diferenciales que obtuvimos al silenciar las isoformas de AKT en la línea PC-3, nos interesó analizar la contribución de la vía PI3K/AKT en otros modelos de cáncer de próstata. Para ello, utilizamos dos modelos de progresión tumoral prostática donde la vía PI3K/AKT ejerce funciones primordiales. Por un lado, la línea LNCaP que representa un estadio de progresión tumoral dependiente de andrógenos y que, al igual que PC-3 carece de la fosfatasa PTEN; y por el otro, la línea celular DU-145 que se caracteriza por presentar la vía PI3K/AKT regulada, ya que expresa PTEN. En ambas líneas silenciamos las isoformas 1 y 2 y evaluamos tanto la distribución de las células entre las distintas fases del ciclo celular como la supervivencia celular.

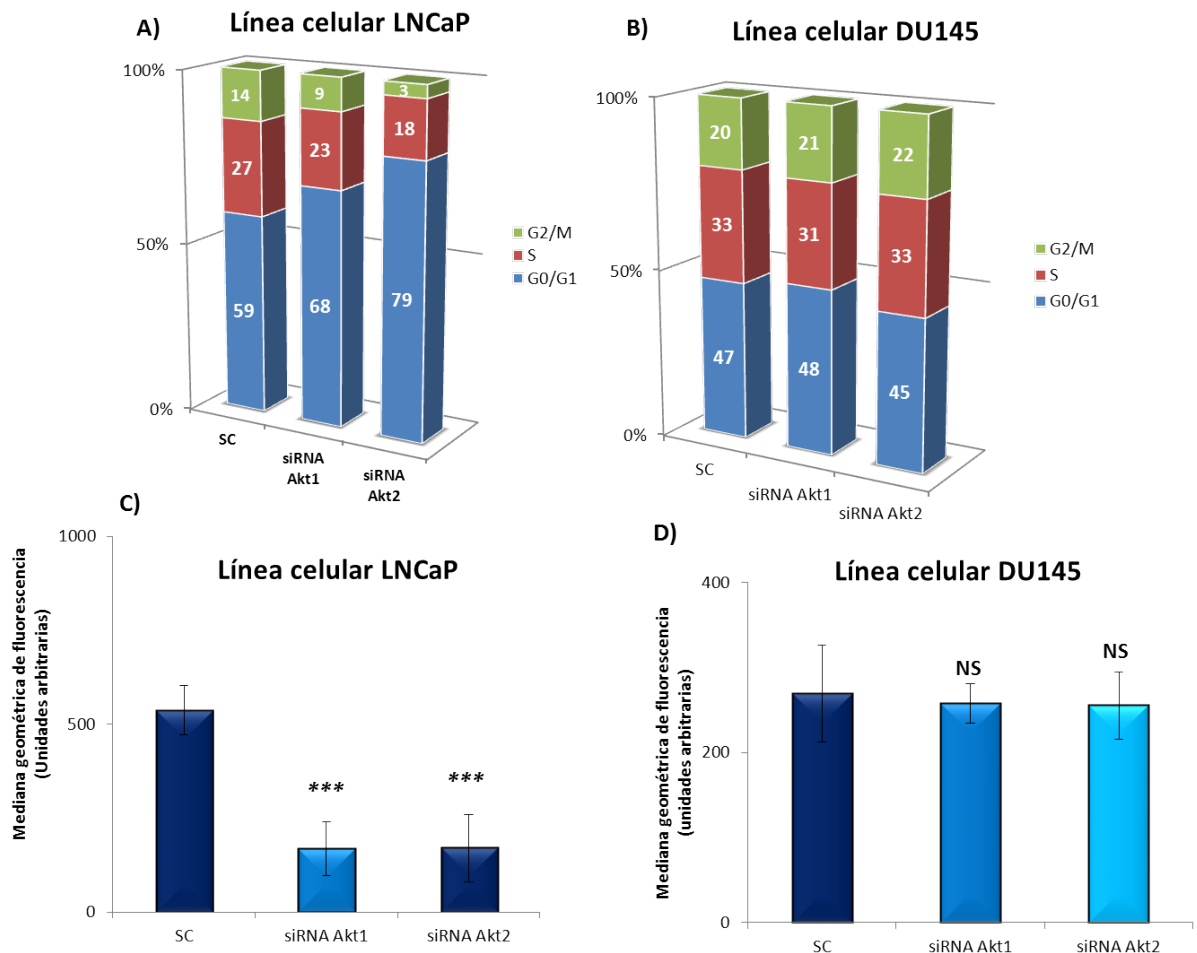


Figura 45: **Efectos de la inhibición de isoformas de AKT sobre la distribución del ciclo celular y la supervivencia celular.** Se transfectoron células LNCaP ó DU-145 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para las isoformas de AKT. Tras 72 horas de transfección se analizó la distribución celular en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo (A y B) y la supervivencia celular (C y D). Los gráficos representan los valores promedios  $\pm$  DEM de tres experimentos independientes (NS  $p > 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,01$  versus SC). En los gráficos A) y B) las etiquetas de las barras representan el porcentaje correspondiente.

Como se observa en la figura 45A, en la línea celular LNCaP la disminución de AKT1 no modificó significativamente el número de células en fase G0/G1. Sin embargo, la disminución de AKT2 provocó un aumento significativo de un 35% en el número de células en G0/G1 con respecto al control. En

ambos casos observamos un incremento altamente significativo de la muerte celular con respecto al control (figura 45C)

Con respecto a la línea DU-145, nuestros resultados no arrojan diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados (figura 45B y D).

Éstos resultados indican que tanto AKT1 como AKT2 son fundamentales para la supervivencia de la línea LNCaP. Sin embargo ni la proliferación ni la supervivencia de la línea DU-145 fueron sensibles a la falta de éstas isoformas.

### **Distribución subcelular de isoformas AKT en PC-3, LNCaP y DU-145.**

Una de las razones del comportamiento diferencial de AKT1 y AKT2 en las distintas líneas celulares analizadas podría ser la distinta localización subcelular de éstas isoformas, por lo que analizamos mediante inmunofluorescencia la localización de cada isoforma en las líneas bajo estudio. Para ello, sembramos células PC-3, LNCaP ó DU-145 en placas de 60 mm de diámetro, sobre cubreobjetos circulares. Tras 72 horas de incubación las fijamos, utilizando paraformaldehído al 4%. Posteriormente permeabilizamos y marcamos AKT1 y AKT2.

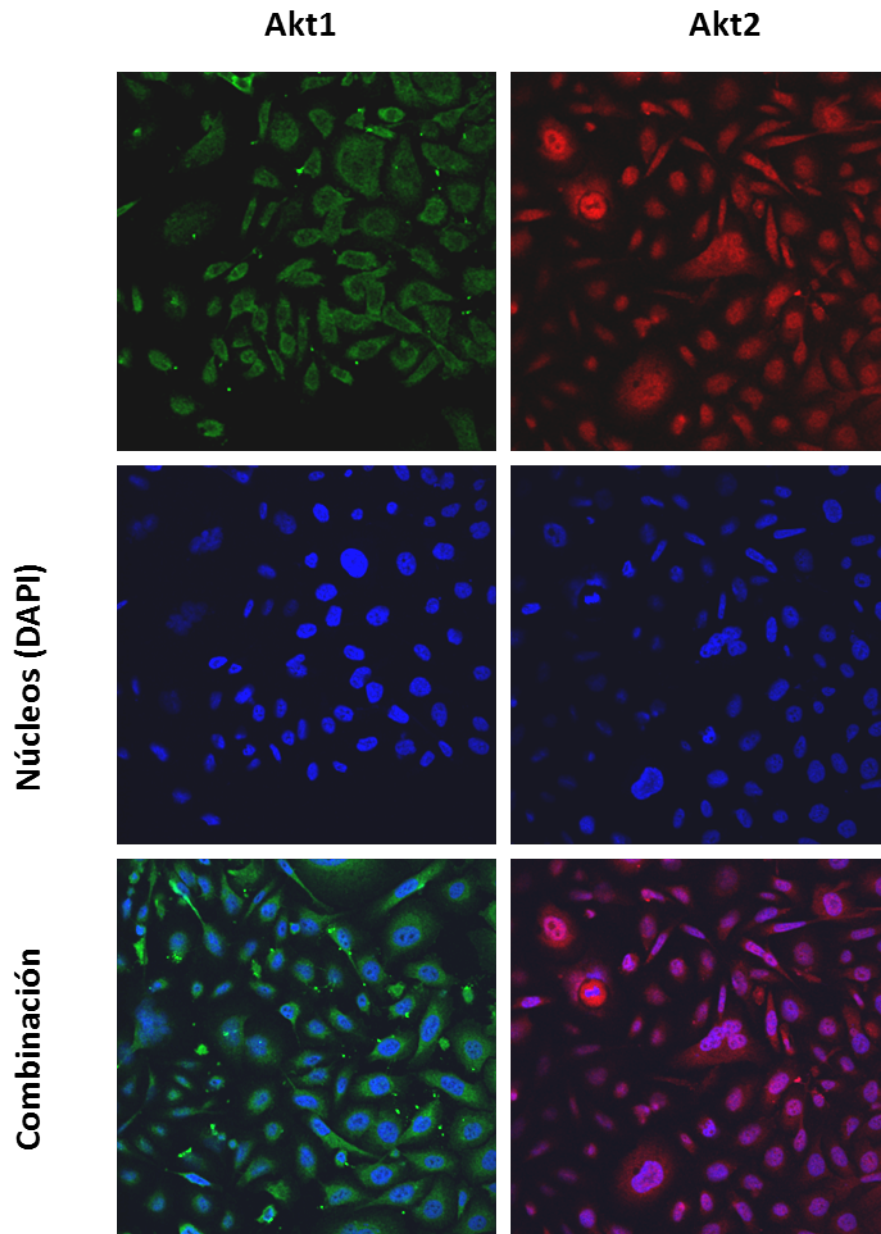


Figura 46: **Localización de isoformas de AKT en células PC-3.** Se sembraron células PC-3 sobre cubreobjetos circulares. Tras 72 horas, las células se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos anti AKT1 ó AKT2, respectivamente. Posteriormente se adicionó un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa488 (que genera una fluorescencia de color verde) ó Alexa647 (que genera una fluorescencia de color rojo). Para visualizar el núcleo se tiñó con el intercalante DAPI. Finalmente las células se analizaron utilizando un microscopio confocal.

En el caso de las células PC-3 observamos una clara diferencia en la localización de isoformas de AKT, siendo AKT1 predominantemente citoplasmática y perinuclear, en tanto que AKT2 presenta una expresión predominantemente nuclear.

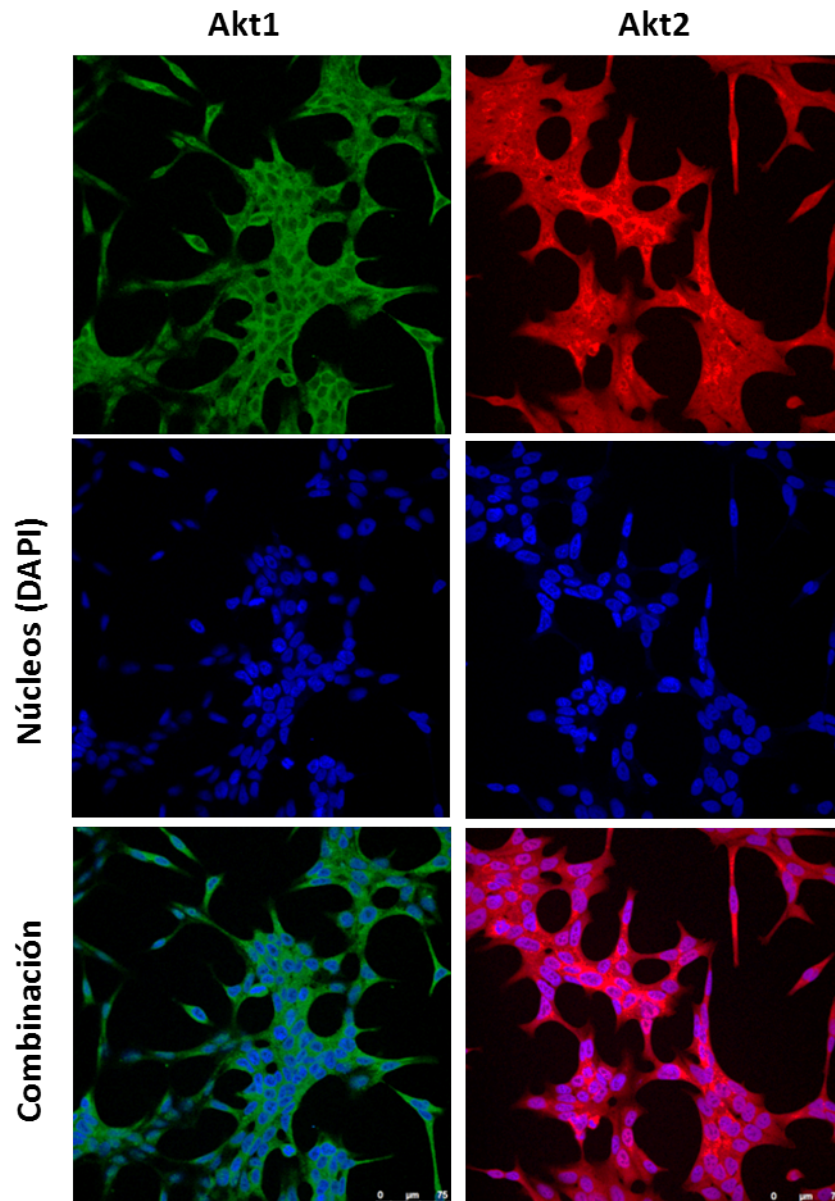


Figura 47: **Localización de isoformas de AKT en la línea celular LNCaP.** Se sembraron células LNCaP sobre cubreobjetos circulares. Tras 72 horas, las células se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos anti AKT1 ó AKT2, respectivamente. Posteriormente se adicionó un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa488 (que genera una fluorescencia de color verde) ó Alexa647 (que genera una fluorescencia de color rojo). Para visualizar el núcleo se tiñó con el intercalante DAPI. Finalmente las células se analizaron utilizando un microscopio confocal.

En el caso de la línea LNCaP, nuestros resultados muestran que AKT1 se localiza fundamentalmente en el citoplasma y en la zona perinuclear, en tanto que se observa una distribución homogénea de AKT2 entre el núcleo y el citoplasma de estas células. (figura 47).

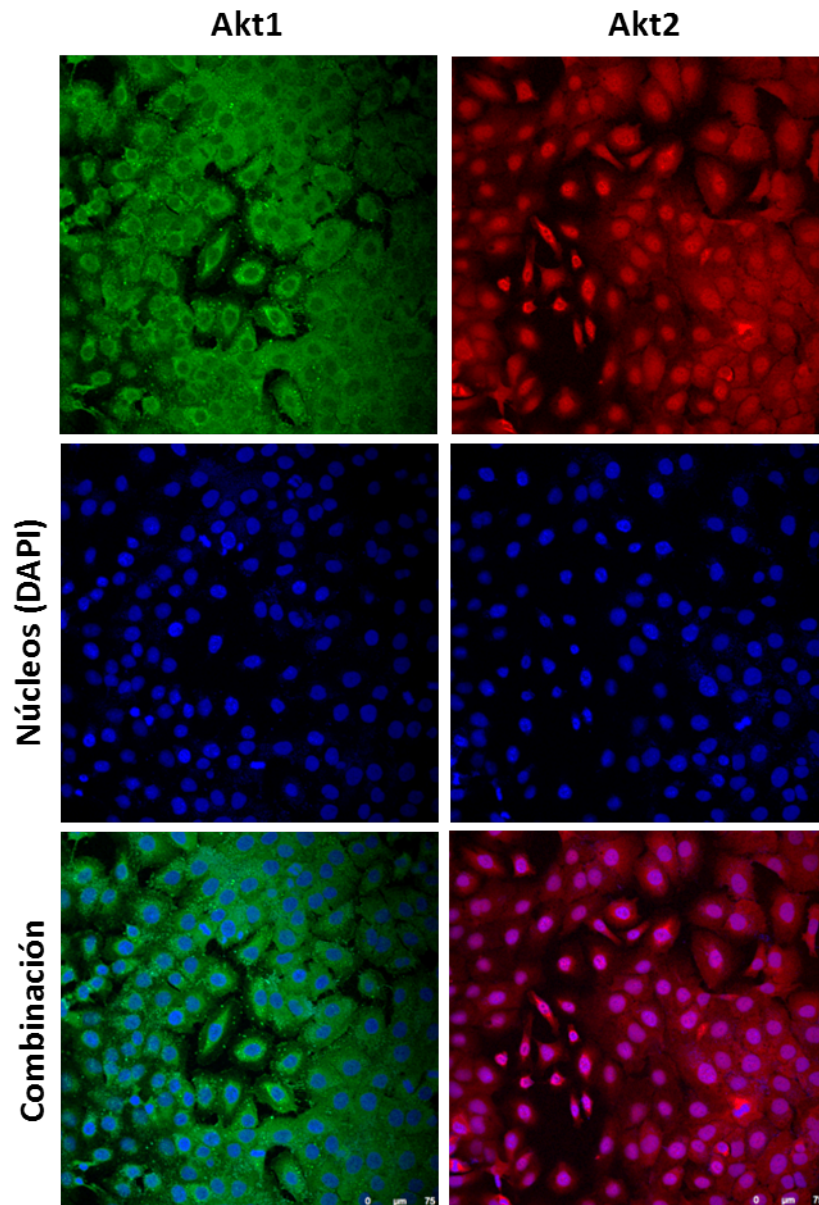


Figura 48: **Localización de isoformas de AKT en la línea celular DU-145.** Se sembraron células DU-145 sobre cubreobjetos circulares. Tras 72 horas, las células se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos anti AKT1 ó AKT2, respectivamente. Posteriormente se adicionó un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa488 (que genera una fluorescencia de color verde) ó Alexa647 (que genera una fluorescencia de color rojo). Para visualizar el núcleo se tiñó con el intercalante DAPI. Finalmente las células se analizaron utilizando un microscopio confocal.

Por otra parte, la localización de AKT1 en las células pertenecientes a la línea DU-145, en coincidencia con su localización en LNCaP, parece ser principalmente citoplasmática, con cierta concentración perinuclear y en puntos que recuerdan a los contactos que se forman entre la célula y su sustrato. Sin embargo, AKT2 presenta una localización predominantemente nuclear en DU-145 (figura 48).

Los resultados hasta aquí presentados indican que las isoformas de AKT ejercen una regulación diferencial en la proliferación celular. Así, en células PC-3 la falta de las isoformas 1 ó 2 provocó una menor proliferación, no observándose diferencias significativas al silenciar la isoforma 3. Además, en

ésta línea celular, AKT2 es la isoforma encargada de la coordinación del pasaje del punto de control G1/S, regulando la expresión de varios efectores, como ciclina D1, CDK6, CDK2, pRb y ciclina E. En este proceso, la isoforma 1 no ejerce regulaciones sustanciales.

A pesar de ello, las funciones de las isoformas de AKT en la proliferación parecen depender de la línea celular bajo estudio, siendo fundamental para la supervivencia en el caso de LNCaP, o irrelevante, como en el caso de DU-145. Una posibilidad para explicar éstas diferencias puede radicar en la diferente distribución subcelular de isoformas observada en cada línea.



## Papel de las isoformas de AKT en la regulación de la adhesión, extensión y migración celular.

### Regulación de la adhesión y la extensión celular por las isoformas de AKT.

Cuando silenciamos las isoformas de AKT en la línea celular PC-3, comprobamos que AKT2 promueve la proliferación celular, a través de mecanismos de regulación diferenciales sobre el ciclo celular. Sin embargo, también hemos observado que la disminución de AKT1, y en menor medida la de AKT3, inhibe la proliferación de dicha línea. Ésta disminución no se produce por parada en ciclo celular, por lo que evaluamos otras características tumorales para intentar explicar los efectos observados.

En primer lugar, analizamos la adhesión de células PC-3 a colágeno tipo I, seleccionando esta matriz porque es la principal proteína de la MEC del hueso, donde el cáncer de próstata metastatiza con preferencia. Con éste objeto, se sembraron células PC-3, y tras 24 horas se transfectaron con un siRNA control ó específico para cada isoforma.

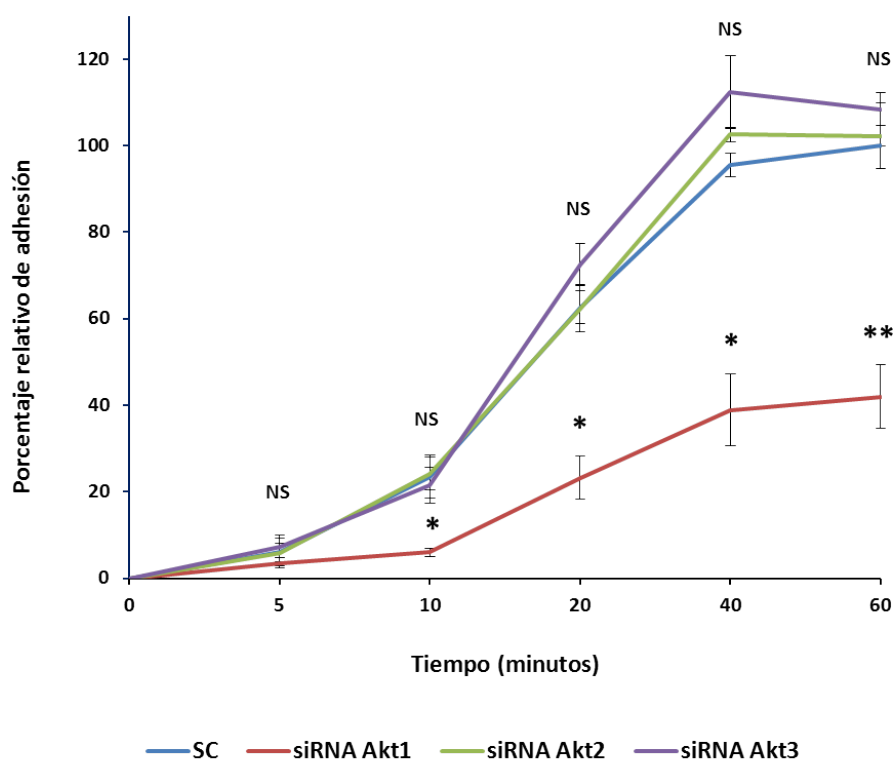


Figura 49: **Efecto de la anulación de isoformas de AKT sobre la adhesión al colágeno tipo I.** Se transfectaron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o específico de isoforma (siRNA AKT). A las 48 horas postransfección, se eliminó el FBS del medio de cultivo. Al día siguiente, las células se levantaron de su soporte utilizando tripsina, se mantuvieron en suspensión durante 60 minutos y posteriormente se sembraron en pocillos de 7 mm de diámetro (placas de 96 pocillos) cubiertas con colágeno tipo I ( $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Tras incubar 5, 10, 20, 40 ó 60 minutos, las células se lavaron con PBS para eliminar las que no se hubieran pegado y aquellas adheridas fueron cuantificadas mediante MTT, según se describe en Materiales y Métodos. El gráfico representa los valores promedios  $\pm$  DEM de tres experimentos independientes (NS  $p > 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  versus SC).

A las 72 horas, las levantamos y las añadimos a pocillos recubiertos de matriz, retirando a distintos tiempos las células que no fueron capaces de adherirse. Posteriormente adicionamos sales de tetrazolio

(según se indica en Materiales y Métodos) las cuales, tras su metabolismo en las mitocondrias de las células que se adhirieron, generan un precipitado coloreado cuya intensidad puede ser medida.

Como se observa en la figura 49, la disminución de las isoformas 2 ó 3 no provoca diferencias significativas de adhesión a colágeno I con respecto al control a ninguno de los tiempo evaluados. Sin embargo, el silenciamiento de AKT1 disminuyó la capacidad de adhesión de las células PC-3, siendo dicha disminución estadísticamente significativa a todos los tiempos observados (10, 20, 40 y 60 minutos).

Dado que para que se produzca la adhesión es necesario que la célula se extienda, perdiendo el aspecto esférico que adquieren en suspensión y pudiendo así generar puntos de adhesión, evaluamos la capacidad de extensión que presentaban las células de la línea PC-3, al silenciar las isoformas de AKT.

Como observamos en los campos fotografiados (figura 50A), el número de células aplanadas y no refringentes, características de haber completado correctamente la extensión, disminuyó al silenciar AKT1 ó AKT2. En concreto, hemos observado una disminución superior al 50% en el número de células completamente extendidas al silenciar AKT1 con respecto al control y de un 30% en el caso del silenciamiento de AKT2. Ambas diferencias fueron estadísticamente significativas (figura 50B). Sin embargo, no encontramos diferencias en el número de células extendidas sobre colágeno, con respecto al control, al silenciar la isoforma 3.

Por lo tanto, la anulación de AKT1 disminuye la adhesión y la extensión de las células de la línea PC-3 sobre colágeno tipo I, mientras que la de AKT2 sólo disminuye la extensión celular. El silenciamiento de AKT3 no modificó ninguno de éstos parámetros.

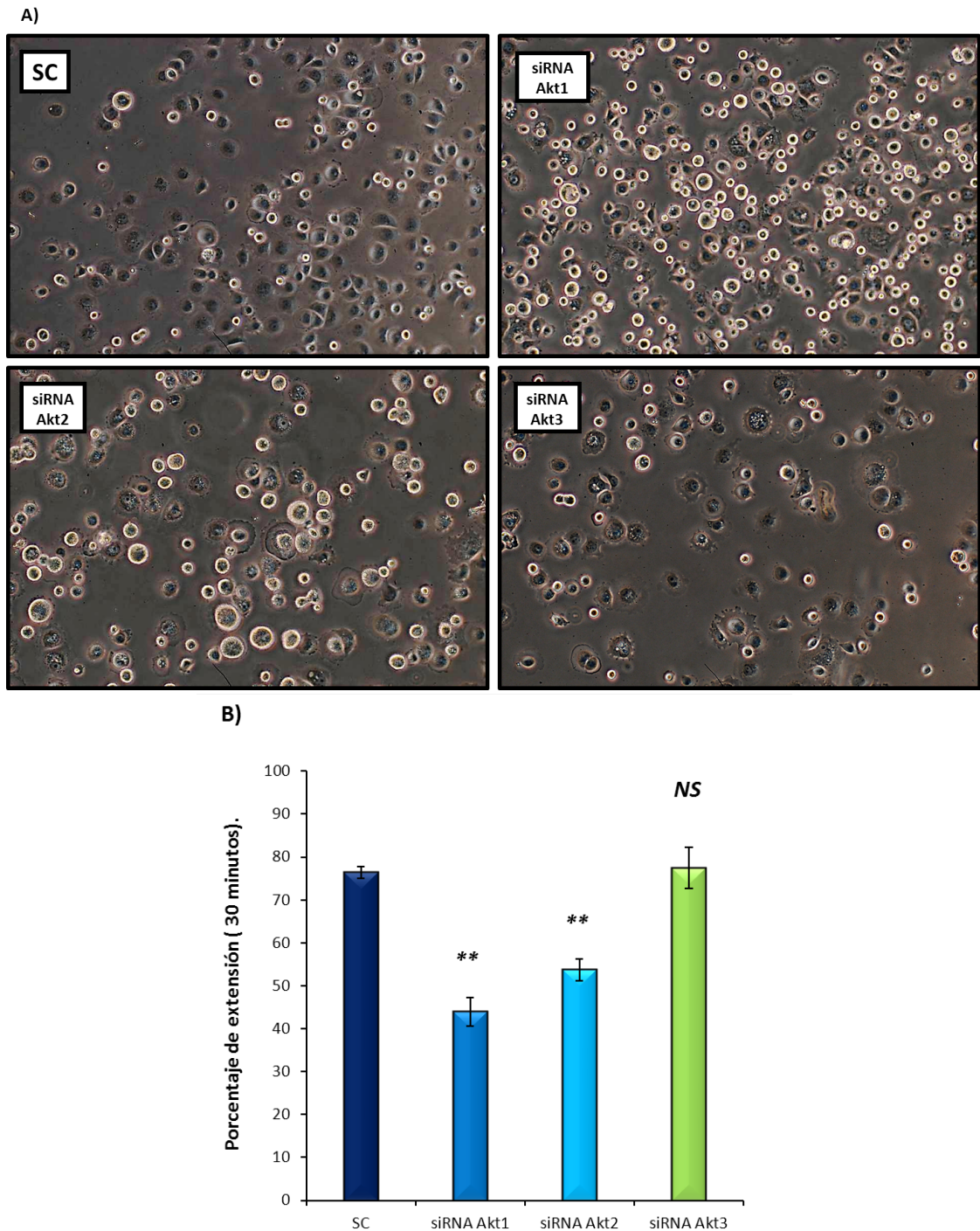


Figura 50: **Efecto de la anulación de isoformas de AKT sobre la extensión celular.** Se transfectaron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o específico de las isoformas de AKT (1, 2 ó 3). A las 72 horas postransfección, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% , observadas con un microscopio óptico y se fotografiaron al menos 3 campos. **A)** Se muestra una fotografía representativa de los campos observados, tras 30 minutos de extensión. **B)** Se contaron las células extendidas, considerándolas como extendidas toda vez que perdiesen la forma esférica y su refringencia. El gráfico representa los valores promedios  $\pm$  DEM de tres experimentos independientes (NS  $p > 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  versus SC), tras 30 minutos de extensión.

La menor adhesión de las células PC-3 al silenciar AKT1 podría ser responsable de la disminución de la proliferación de éstas células, detectada al anular ésta isoforma, por lo que quisimos averiguar si el silenciamiento de las isoformas de AKT afectaba la viabilidad de las células que quedaban en

suspensión.

Puesto que las observaciones más trascendentales las obtuvimos bajo la inhibición de las isoformas 1 y 2 de AKT, nos centramos en evaluar, mediante ensayos de citometría de flujo, la cinética de viabilidad de las células que se desprenden. Así, sembramos células PC-3 y las transfectamos con una secuencia control (SC) ó con un siRNA específico de las isoformas 1 ó 2 de AKT y recogimos los sobrenadantes a las 24, 48 y 72 horas postransfección, analizando la incorporación de yoduro de propidio a los tiempos indicados.

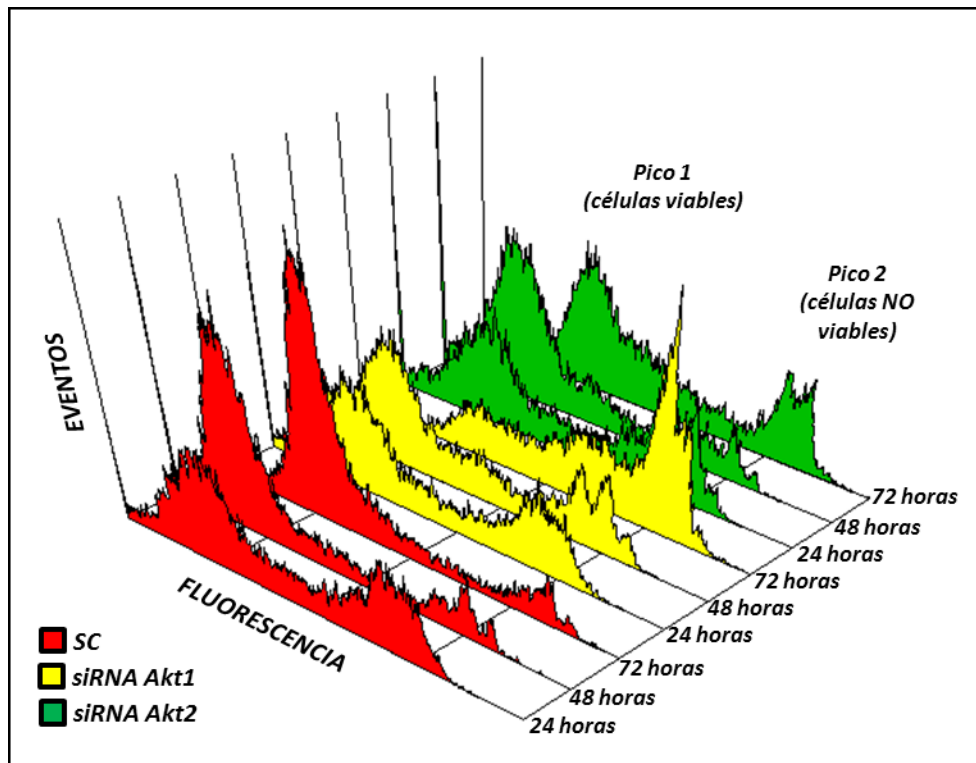


Figura 51: **Efecto de la anulación de isoformas de AKT sobre las células desprendidas del sustrato.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para isoformas de AKT (1 ó 2). Tras 24, 48 y 72 horas de transfección se recogieron las células desprendidas del sustrato y se sometieron a ensayos de viabilidad celular mediante citometría de flujo. El gráfico representa el número de eventos detectados en función de su fluorescencia. Los 3 histogramas en rojo corresponden a 24, 48 y 72 horas postransfección del control. El grupo de histogramas siguientes (3 en amarillo y 3 en verde) corresponden a 24, 48 y 72 horas (respectivamente) postransfección de un siRNA para AKT1 ó AKT2.

En los ensayos de viabilidad utilizamos la capacidad que presenta el colorante yoduro de propidio de penetrar en las células cuyas membranas han perdido la integridad. Cuando representamos el número de eventos contados por el citómetro de flujo, con respecto a la fluorescencia obtenida encontramos:

- ♦ un pico de menor intensidad de fluorescencia que representa a las células intactas (pico 1).
- ♦ un pico de intensidad de fluorescencia alta que representa a las células cuya membrana ha sido dañada y en consecuencia han perdido su viabilidad (pico 2).

El área de los picos indicará el número de células que han sido contadas en cada una de las situaciones anteriormente indicadas.

Como podemos observar en la figura 51, el silenciamiento de AKT1 provoca una disminución dependiente del tiempo, de la viabilidad celular tal como lo indica el progresivo incremento del pico 2. De

hecho, a las 72 horas sólo un 10 % de las células son viables (situación representada por la meseta de dicho perfil, ubicada en la zona de baja fluorescencia)

Por el contrario, la anulación de AKT2 no modificó significativamente la viabilidad celular, tal como lo indica la similitud de los perfiles de fluorescencia obtenidos a los tiempos indicados.

Es de destacar que el análisis de los perfiles obtenidos a las 24 horas tanto en el control como al silenciar AKT1 ó 2 son muy similares y muestran una considerable pérdida de la viabilidad (como indica el pico 2). Esta situación probablemente sea debida a los propios efectos tóxicos iniciales del reactivo de transfección. De hecho, a las 48 y 72 horas de tratamiento se observa una recuperación de la viabilidad, como indica la progresiva disminución del pico 2.

Éstos resultados indican que AKT1 activa vías de señalización que promueven la adhesión celular a colágeno tipo I, a la vez que previene que aquellas células que se desprenden de su sustrato sean sensibles a sufrir algún proceso de muerte celular.

### **Regulación de la migración celular por las isoformas de AKT.**

El conjunto de los resultados anteriores nos permitieron plantearnos que las isoformas 1 y 2 de AKT probablemente afectaran de modo directo a la capacidad migratoria de las células. Para evaluar dicha característica llevamos a cabo ensayos de migración utilizando pocillos con membranas de policarbonato que poseen poros ("*transwells*"), a través de los cuales pueden migrar las células; y colágeno tipo I como matriz.

Observamos que el silenciamiento de AKT1 provoca una caída de alrededor de un 34 % en el número de células capaces de migrar, con respecto a las células control. Curiosamente, la disminución de AKT2 provocó un aumento de un 42 % aproximadamente en el número de células que migraron con respecto al control. Ambas diferencias fueron estadísticamente significativas.

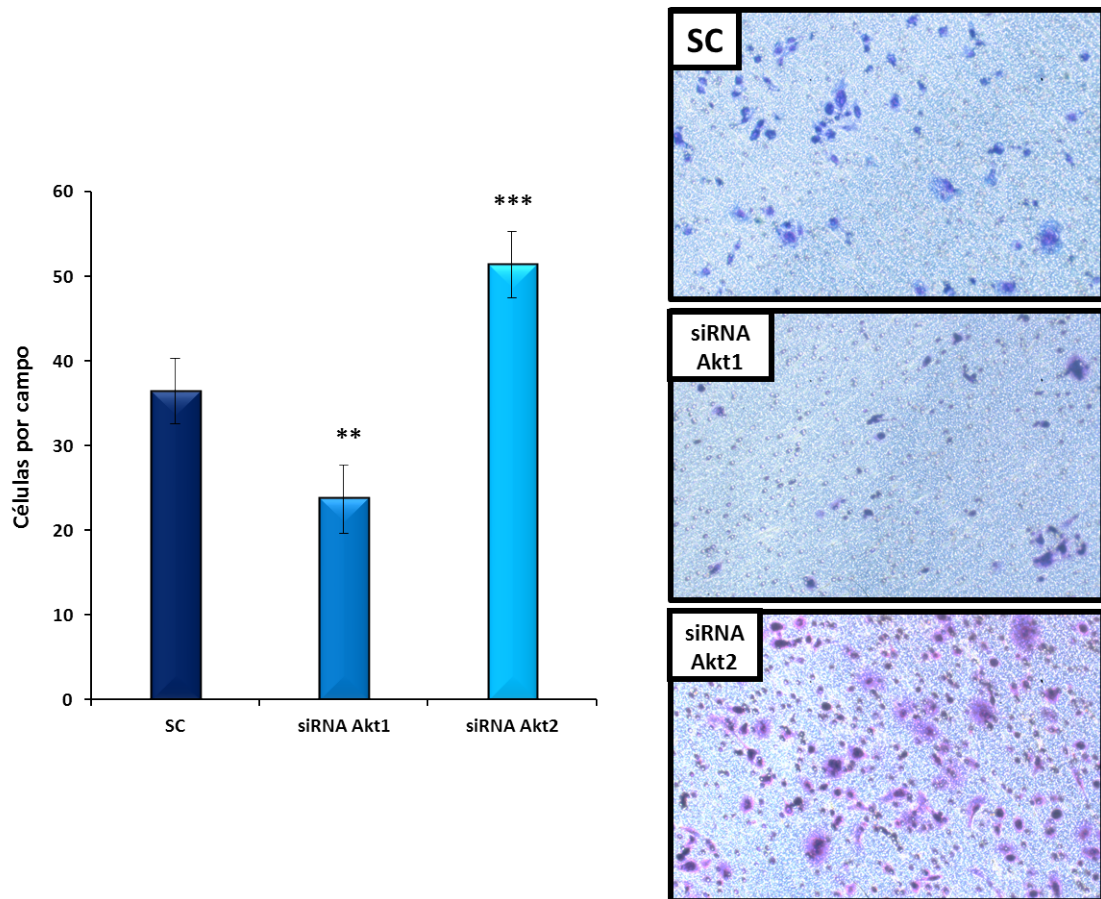


Figura 52: **Las isoformas de AKT controlan de modo diferencial el fenotipo migratorio en células tumorales prostáticas.** Se transfectoron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o específico de isoformas (siRNA AKT) y se realizaron ensayos de migración en "transwells". Posteriormente las células fueron teñidas y se fotografiaron al menos 3 campos aleatorios en cada ensayo. (A) El gráfico representa el número de células que han migrado por campo. Se representan valores promedios  $\pm$  DEM de tres experimentos independientes (NS  $p > 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  versus SC). (B) Se muestra un campo representativo de migraciones en células control (SC), siRNA AKT1 y siRNA AKT2.

Todos éstos datos pondrían de manifiesto una función diferencial de las isoformas de AKT sobre el dinamismo de la actina que, en última instancia, permitirá una regulación de procesos tales como la adhesión, extensión y migración celular.

## Regulación de efectores moleculares de la adhesión, la extensión y la migración por las isoformas de AKT.

Existen diferentes tipos de uniones entre la MEC y las células, siendo muchas de ellas generadas por contactos focales tempranos. En éste tipo de contactos juega un papel fundamental la quinasa de adhesión focal (FAK), la cual tras la interacción de las integrinas con la MEC permitirá la generación de una plataforma de señalización, sirviendo además de anclaje para diversas enzimas, entre las que destaca Src (cuya diana además es la propia FAK) <sup>181</sup>. El resultado será la transducción de señales desde el microambiente hacia el interior celular, promoviendo posteriormente la generación de nuevos contactos celulares, así como la migración y la propia supervivencia de las células.

Teniendo en cuenta la breve descripción anterior, nos planteamos analizar el estado de fosforilación de FAK al silenciar las isoformas de AKT.

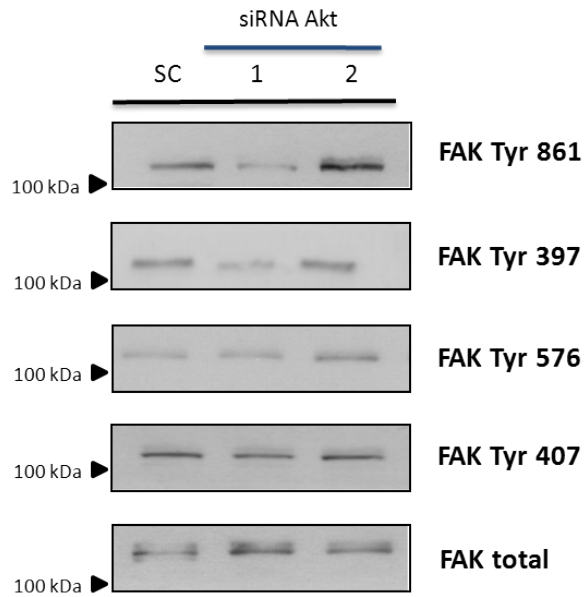


Figura 53: **Efecto del silenciamiento de isoformas de AKT sobre la fosforilación de tirosinas en FAK.** Se transfectaron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o un siRNA específico contra isoformas de AKT (siRNA AKT). A las 72 horas postransfección, se analizaron los niveles de fosforilación de las principales tirosinas de FAK, mediante *western blot*, utilizándose como control los niveles totales de dicha quinasa. En la figura se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 53, el silenciamiento de AKT1 provocó una disminución de un 40 % en los niveles de fosforilación de los residuos de tirosina 861 (implicado en la regulación de la capacidad migratoria celular) y de tirosina 397 (sitio de autofosforilación necesaria para la activación de FAK).

Por su parte, el silenciamiento de AKT2 aumentó en un 80 % la fosforilación del residuo Tyr861 sin provocar modificaciones en la fosforilación del residuo 397.

En cuanto al resto de fosforilaciones analizadas, no observamos diferencias estadísticamente significativas con respecto a los niveles de fosforilación de la situación control.

Dado que no podemos desvincular las actividades de FAK de las de Src, evaluamos el estado de fosforilación de sus dos residuos principales: la tirosina 419 (ampliamente aceptada como “activadora”) y la tirosina 530 (“inhibidora”) <sup>85</sup>.

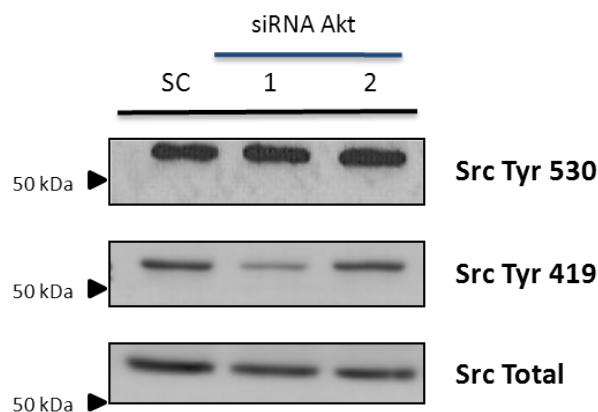


Figura 54: **Efecto de la anulación de isoformas de AKT sobre la fosforilación de tirosinas en Src.** Se transfectaron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o un siRNA específico contra isoformas de AKT (siRNA AKT). A las 72 horas postransfección, se analizaron los niveles de fosforilación de las principales tirosinas, mediante *western blot*, utilizándose como control los niveles totales de Src. En la figura se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

Como observamos en la figura 54, el silenciamiento de AKT1 provoca una drástica disminución en los niveles de fosforilación del residuo Tyr419, de aproximadamente un 40 %, no observándose cambios estadísticamente significativos al anular AKT2. Por otra parte, el silenciamiento de las isoformas 1 o 2 de AKT no parece afectar a la fosforilación del residuo Tyr530 de Src.

### Regulación de las GTPasas pequeñas RhoA y Rac1 por las isoformas de AKT.

Dado que las GTPasas pequeñas de la familia Rho, RhoA y Rac1 están reguladas por FAK, Src y PI3K y controlan la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de estructuras adhesivas, nos planteamos el estudio del estado de activación de dichas GTPasas al silenciar las isoformas 1 y 2 de AKT. Para ello utilizamos proteínas quiméricas que capturan las formas “activas” (unida a GTP) de cada GTPasa en cuestión, mediante ensayos de captura y unión (“pull down”).

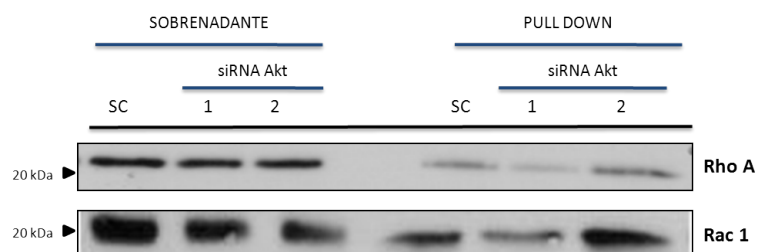


Figura 55: **Efecto de la anulación de isoformas de AKT sobre las activación de las GTPasas pequeñas de la familia Rho.** Las células PC-3 se transfectaron con un siRNA control ó específicos de isoformas. A las 72 horas posttransfección fueron lisadas y dichos lisados fueron puestos en contactos con proteínas de fusión que capturan las formas de RhoA y Rac1 unidas a GTP. Posteriormente fueron separadas mediante SDS-PAGE. La figura muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Como podemos observar en la figura 55, la anulación de AKT1 provocó una disminución en los niveles de RhoA y Rac1 activos (unidos a GTP). Por su parte, al silenciar la isoforma 2 observamos un aumento en los niveles de RhoA y Rac1 unidos a GTP.

La reorganización del citoesqueleto de actina es un complejo proceso molecular, fundamental para que las células puedan interactuar con la MEC, extenderse y posteriormente migrar. Por ello, quisimos analizar si los cambios en adhesión y migración detectados al silenciar las isoformas de AKT podrían deberse a modificaciones en la reorganización del citoesqueleto. Con éste fin, silenciamos dichas isoformas y marcamos los filamentos de actina utilizando faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC).



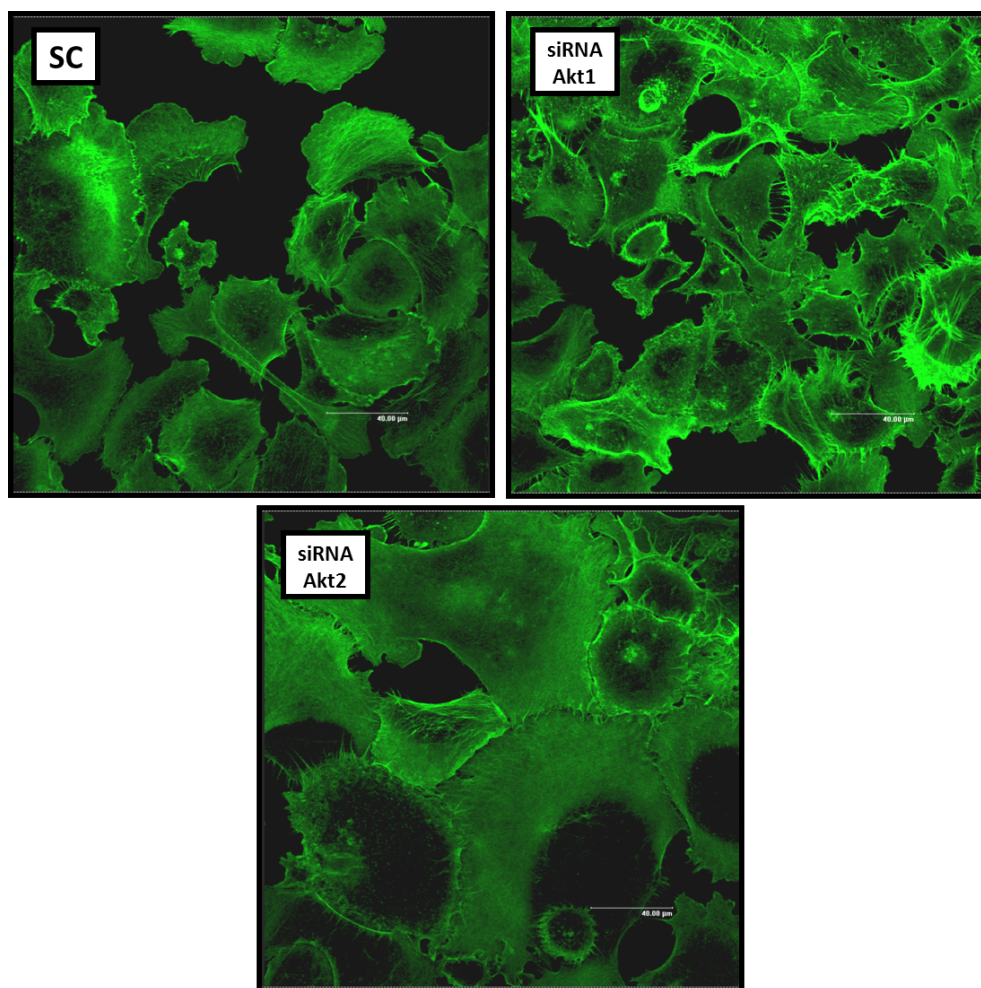


Figura 56: **La anulación de isoformas de AKT afecta de un modo diferencial al fenotipo celular.** Se transfectaron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o un siRNA específico contra isoformas de AKT (siRNA AKT). Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron a las 72 horas postransfección como se indica en Materiales y Métodos, adicionándose faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La imagen presenta un campo representativo y a los fines comparativos todos los campos se realizaron utilizando el mismo aumento.

Como podemos observar en la figura 56, la disminución de AKT1 provoca la formación de finas espículas así como una cierta concentración de actina cortical. Con respecto al silenciamiento de AKT2, observamos un llamativo aumento del tamaño celular, con pérdida de la forma mesenquimática (predominante en las células PC-3) y los límites celulares.

Éstos resultados parecen indicar que la inhibición de AKT1 y AKT2 afectan de modo importante la dinámica de reorganización de actina, disminuyendo las capacidades de las células para extenderse y posteriormente adherirse.

En conjunto, nuestros datos indican que el silenciamiento de AKT1 disminuyó las fosforilaciones indicadoras de activación de FAK y Src así como la actividad de las GTPasas pequeñas RhoA y Rac1. Todas estos cambios se asocian a una menor adhesión, extensión y migración celular así como a modificaciones del citoesqueleto de actina. Por el contrario, la anulación de AKT2 aumentó la fosforilación de FAK en el residuo Tyr861 y la migración celular, disminuyendo la extensión celular. En ésta situación también observamos modificaciones en el citoesqueleto de actina.

## Regulación de la vía PI3K/AKT por la fosfotirosina fosfatasa SHP-1.

### Interacción de SHP-1 con las isoformas de AKT.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha publicado que la fosfotirosina fosfatasa SHP-1 se asocia con la subunidad p85 de PI3K<sup>156</sup> (ANEXO 1). Para profundizar en el estudio de las relaciones generadas entre la vía PI3K/AKT y SHP-1, analizamos si ésta fosfatasa era también capaz de formar complejos con alguna de las isoformas de AKT.

Por lo tanto, realizamos ensayos de “pull down” de SHP-1 en células PC-3 evaluando la presencia de AKT total, así como la de cada una de sus isoformas. Nuestros resultados indican que AKT1, pero no AKT2, es la isoforma que interactúa con SHP-1 (figura 57).

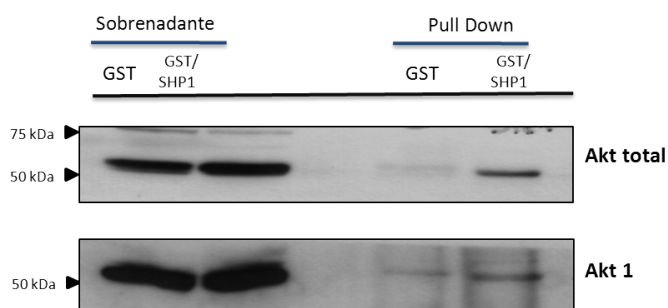


Figura 57: **Interacción entre SHP-1 y AKT1.** Las células PC-3 fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro siendo utilizado 1 mg de proteína total en ensayos de “pull-down”, mediante la proteína quimérica SHP-1-GST, unida a glutatión-sepharosa. Posteriormente, las proteínas unidas a la quimera fueron separadas mediante SDS-PAGE y reveladas utilizando anticuerpos específicos contra AKT total y contra sus distintas isoformas, con el fin de observar interacciones proteicas. La imagen muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Por otra parte, nos planteamos analizar si la disminución de SHP-1, tenía un reflejo cierto sobre la actividad de AKT1. Para ello, silenciamos SHP-1 con un siRNA específico, inmunoprecipitamos AKT1 y evaluamos el nivel de fosforilación de sus residuos Ser473 y Thr308.

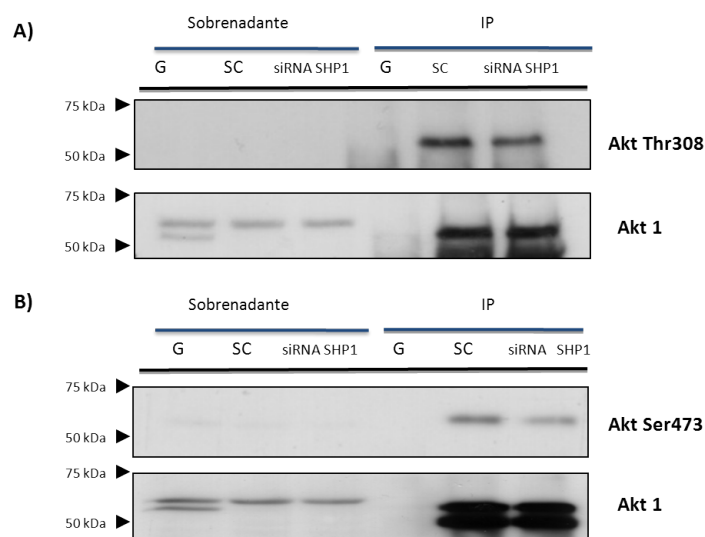


Figura 58: **Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la fosforilación de AKT1.** Las células PC-3 fueron transfectadas con un siRNA específico para SHP-1 ó una secuencia control. Tras 72 horas se inmunoprecipitó 1 mg de proteína utilizando un anticuerpo anti-AKT1 y cómo control de unión inespecífica se utilizó proteína G-sepharosa sin anticuerpo primario (indicado como "G" en la figura). Los inmunocomplejos fueron analizados mediante *western blot* utilizando anticuerpos contra los residuos Thr308 y Ser473 fosforilados. La imagen muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Como se muestra en la figura 58, el silenciamiento de SHP-1 disminuyó los niveles de fosforilación de los dos residuos de activación: en el caso de la Thr308, dicha disminución fue de un 30 % (figura 58A) y en el caso de la Ser473 la disminución fue de un 40 % (figura 58B).

Para confirmar que ésta menor activación de AKT1, ocurrida bajo la ausencia de SHP-1, tiene un significado biológico, analizamos la fosforilación de GSK3 $\beta$ , un sustrato conocido de AKT<sup>124</sup>. Para ello, transfectamos células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control ó un siRNA específico para SHP-1 y tras 72 horas evaluamos la fosforilación de GSK3 $\beta$ , mediante *western blot*.

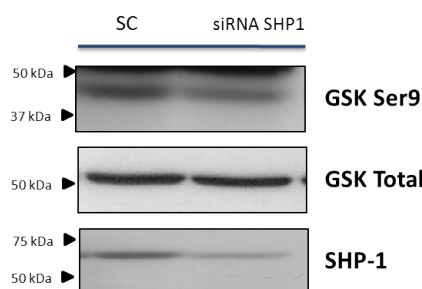


Figura 59: **Efecto de la disminución de SHP-1 sobre la fosforilación de GSK-3 $\beta$ .** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para SHP-1. Tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles de GSK fosforilado en la serina 9, mediante *western blot*, utilizándose como control de carga GSK total. Éstos resultados corresponden a un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

Como observamos en la figura 59, la disminución de SHP-1 tuvo como consecuencia una menor fosforilación del residuo Ser9 de GSK3 $\beta$ . Concretamente observamos una disminución en la fosforilación de dicho residuo de un 30 % aproximadamente.

## Regulación de PI3K y PDK1 por SHP-1.

Para que se produzca la activación de AKT1 es necesaria la generación de PIP3 por PI3K, que permitirán el anclaje a la membrana plasmática de dicha isoforma, tras lo cual podrá ser fosforilada por PDK1 y mTORC2/Rictor. Dado que SHP-1 interacciona con la subunidad p85 de PI3K y que previamente habíamos demostrado que al disminuir SHP-1, aumentaba la fosforilación en tirosina de la subunidad p110 (ver ANEXO 1), quisimos analizar las consecuencias de ésta modificación sobre la actividad de PI3K. Con este objeto, inmunoprecipitamos p85 y evaluamos mediante un ensayo radiactivo, la capacidad de PI3K para fosforilar al sustrato inositol, tanto en situación control como en ausencia de SHP-1. Como se observa en la figura 60B el silenciamiento de SHP-1 produce una disminución efectiva en la actividad quinasa de PI3K.

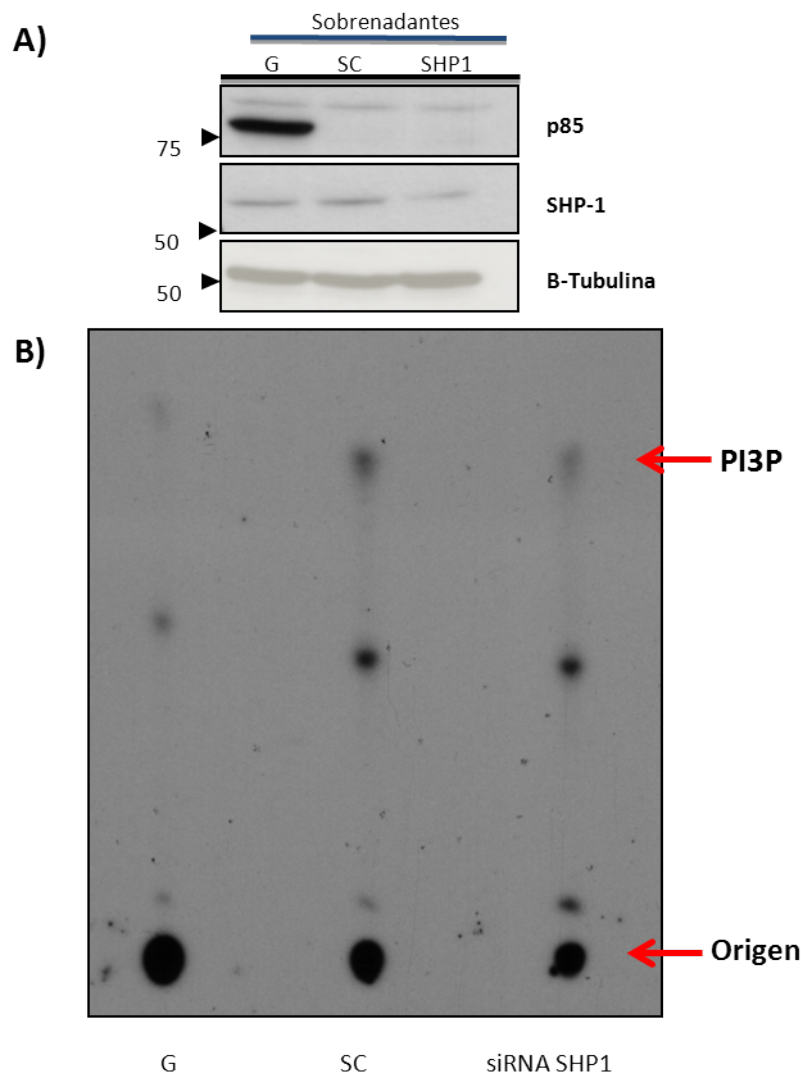


Figura 60: **Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la actividad quinasa de PI3K.** **A)** Las células PC-3 fueron transfectadas con un siRNA específico para SHP-1 ó una secuencia control. Tras 72 horas se inmunoprecipitó 1 mg de proteína utilizando un anticuerpo anti-p85 y como control de unión inespecífica se utilizó proteína G-sepharosa sin anticuerpo primario (indicado como "G" en la figura). **B)** Los inmunoprecipitados fueron utilizados para analizar la fosforilación del sustrato inositol mediante un ensayo quinasa radiactivo según se describe en Materiales y Métodos. La imagen muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que la menor actividad PI3K, promovida por el

silenciamiento de SHP-1, provoca una menor actividad de AKT1, la que finalmente se traduce en una menor capacidad de fosforilar a sus sustratos.

Tras el cambio de conformación de AKT, inducido por su unión a los PIP3, será fosforilado y activado por la quinasa PDK1. Recientemente se ha descrito que SHP-1 puede interactuar con PDK1<sup>182</sup>, y regular su localización subcelular por lo que nos planteamos analizar si la ausencia de SHP-1 podría regular a PDK1.

Con éste objeto, anulamos la expresión de SHP-1 durante 72 horas y analizamos mediante *western blot* la expresión de PDK1.

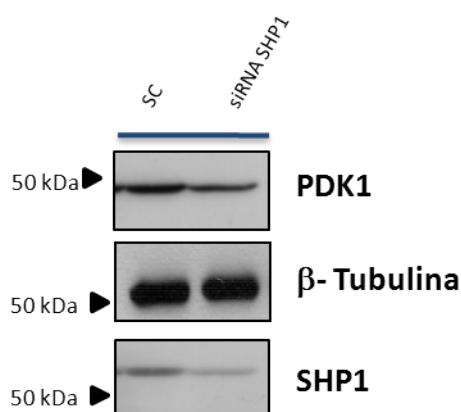


Figura 61: **Efecto del silenciamiento de SHP-1 sobre los niveles de PDK1.** Se transfectaron células PC-3 con un siRNA control (SC) ó un siRNA específico para SHP-1. Tras 72 horas de transfección se analizaron los niveles de PDK1 mediante *western blot*, utilizándose como control de carga  $\beta$ -tubulina. La imagen muestra un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes.

Como observamos en la figura 61, en ausencia de SHP-1 se produjo una disminución de un 30 % en los niveles proteicos de PDK1, con respecto a la situación control.

Posteriormente analizamos mediante inmunofluorescencia, la localización de PDK1 al anular SHP-1. Como se aprecia en la figura 62, a las 72 horas de silenciar SHP-1 observamos una marcada disminución en la señal nuclear de PDK1, sin observarse cambios importantes en la señal citoplasmática.

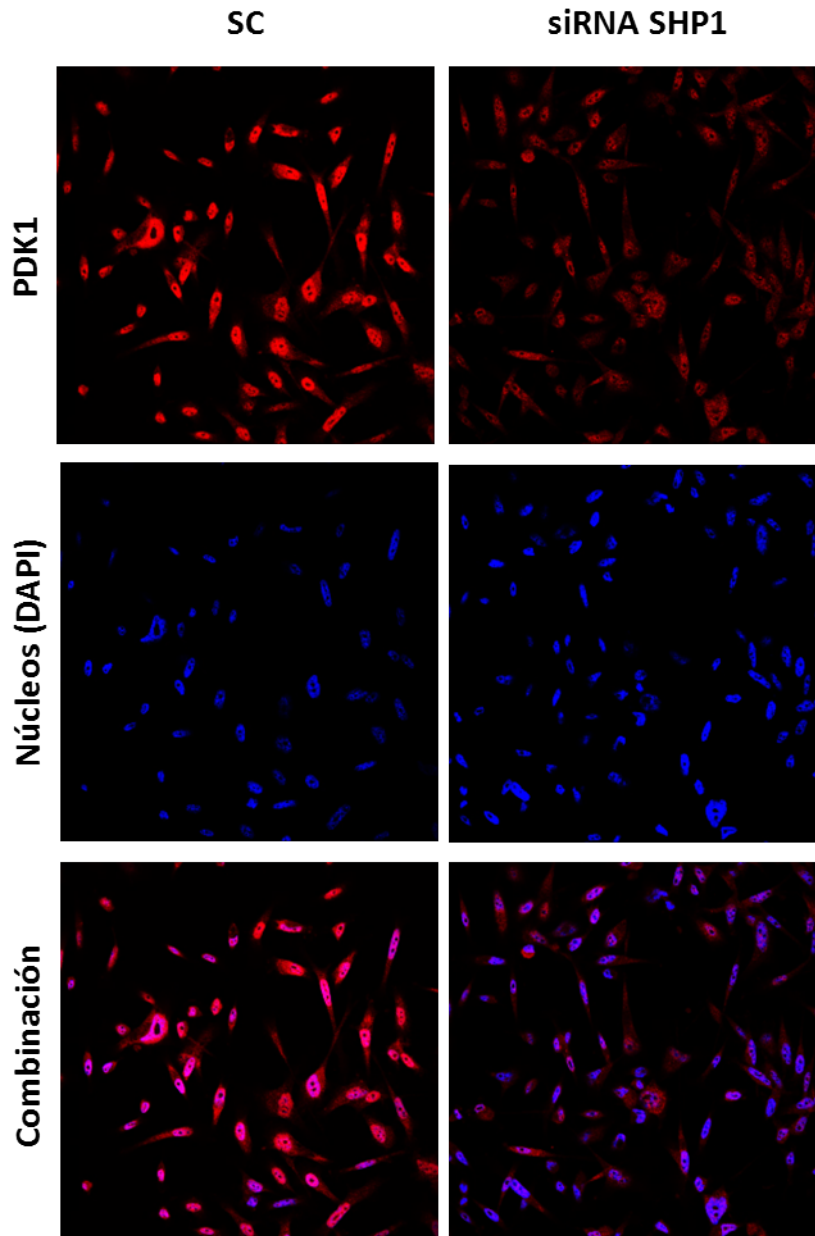


Figura 62: **Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la localización de PDK1.** Se transfectaron células PC-3 con 100 pmoles de un siRNA control (SC) o un siRNA específico contra SHP-1. Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron a las 72 horas postransfección como se indica en Materiales y Métodos. En rojo se ha marcado PDK1 y en azul los núcleos, adicionándose una tercera imagen de superposición de ambas.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que SHP-1 controla los niveles y la localización nuclear de PDK1. En conjunto, nuestras observaciones establecen una regulación, ejercida por SHP-1, tanto sobre la propia PI3K como sobre PDK1, encargada en última instancia de la transducción de las señales hasta el principal efector, AKT.

### **Regulación de las interacciones de las isoformas de AKT con otras moléculas mediada por SHP-1**

Considerando nuestros resultados con respecto a las funciones de las isoformas de AKT en la adhesión, extensión y migración celular, evaluamos la interacción de isoformas con sustratos implicados

en la regulación de estas características fenotípicas. Para ello, en primer lugar inmunoprecipitamos las isoformas 1 y 2 de AKT en células PC-3 y analizamos su interacción con FAK y con la subunidad p85 de PI3K.

Nuestros resultados (figura 63) indican que únicamente AKT1 interactúa habitualmente tanto con FAK como con p85.

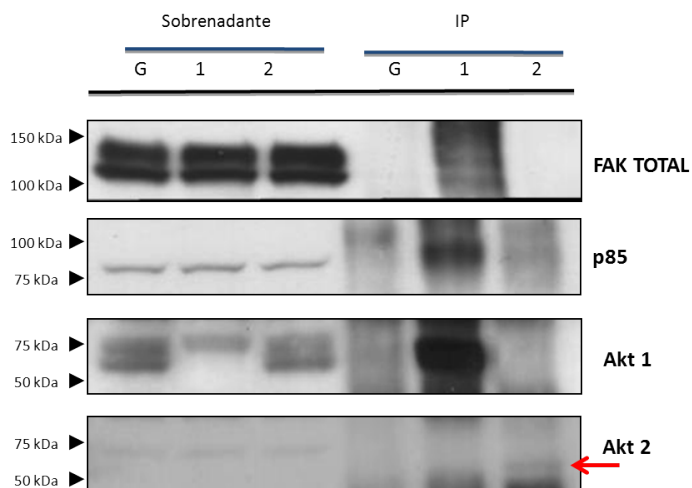


Figura 63: **Interacciones proteicas diferenciales de las isoformas de AKT.** Se sembraron células PC-3, se lisaron y los extractos proteicos obtenidos (1 mg) se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-AKT1 ó anti-AKT2 según se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Como control de unión inespecífica se utilizó el soporte (proteína G-sepharosa) sin anticuerpo primario (carril indicado como "G" en la figura). Los inmunocomplejos fueron analizados mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti-FAK ó anti-p85. La imagen muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Dado que observamos que SHP-1 interacciona con AKT1 y regula su actividad, nos interesó evaluar si la ausencia de SHP-1 podría afectar dichas uniones. Para ello, transfectamos células PC-3 con un siRNA control ó un siRNA específico para SHP-1 y posteriormente inmunoprecipitamos AKT1, evaluando la presencia de FAK ó p85. En éstos experimentos además incluimos a Src, con el objeto de confirmar la existencia de plataformas de señalización.

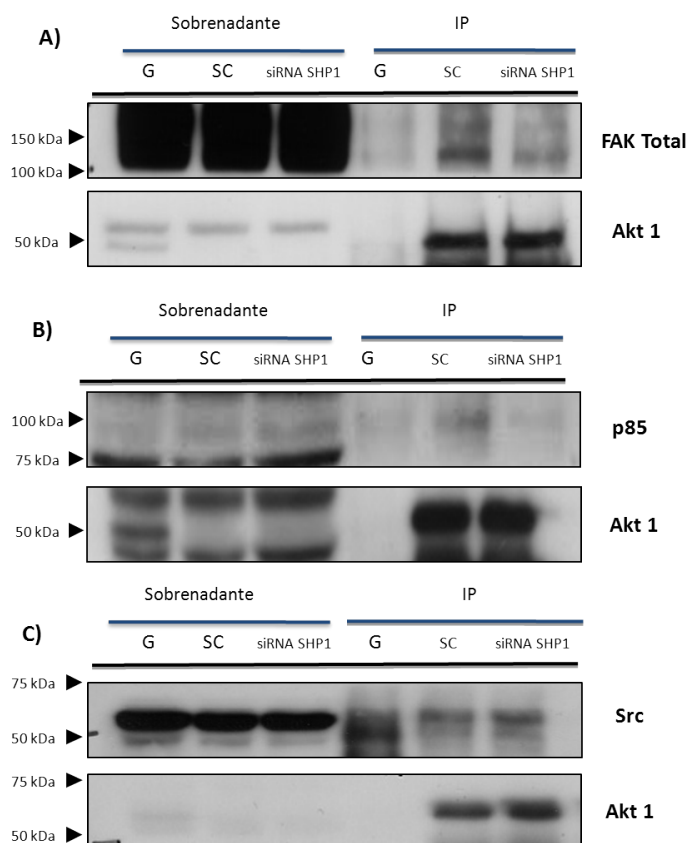


Figura 64: **Papel de SHP-1 en la regulación de interacciones proteicas diferenciales de AKT1.** Las células PC-3 fueron transfectadas con un siRNA específico para SHP-1 ó una secuencia control. Tras 72 horas se inmunoprecipitó 1 mg de proteína utilizando un anticuerpo anti-AKT1 y cómo control de unión inespecífica se utilizó proteína G-sepharosa sin anticuerpo primario (indicado como "G" en la figura). Los inmunocomplejos fueron analizados mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti-FAK ó anti-p85. La imagen muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Como observamos en la figura 64A, tras el silenciamiento de SHP-1, la interacción entre AKT1 y FAK disminuye. Una disminución aún mas notable se observa en la figura 64B, donde la interferencia por ARN de SHP-1, provoca una drástica bajada de los niveles de p85 unidos a AKT1. Por otra parte, como vemos en la figura 64C, la unión entre Src y AKT1 no parece modificarse en ausencia de SHP-1.

#### Efecto del silenciamiento de SHP-1 sobre la actividad de FAK y Src.

Hemos visto la formación de complejos de señalización en torno a AKT1, que incluyen a p85, FAK y Src. También hemos demostrado su desorganización bajo el silenciamiento de SHP-1. Dado que la ausencia de SHP-1 provoca una disminución de la actividad quinasa de PI3K, nos planteamos evaluar los efectos biológicos sobre los otros dos componentes implicados en ésta plataforma de señalización: FAK y Src. Para ello, sembramos células PC-3 y las transfectamos con un siRNA específico para SHP-1. Tras 72 horas de silenciamiento, evaluamos los niveles de fosforilación en los residuos de activación de FAK (tirosina 397) y Src (tirosina 419).



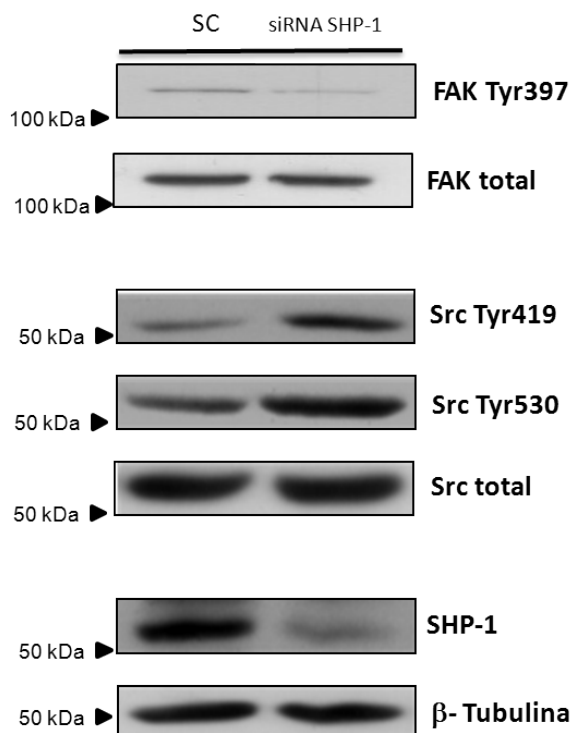


Figura 65: **Efecto del silenciamiento de SHP-1 sobre la actividad de FAK y Src.** Las células PC-3 fueron transfectadas con un siRNA específico para SHP-1 ó una secuencia control. Tras 72 horas se evaluó mediante *western blot* los niveles de fosforilación de los residuos indicadores de activación de FAK (tirosina 397) y de Src (tirosina 419), utilizando como controles de carga los niveles proteicos totales de cada una de ellas. También se evaluó la fosforilación de la tirosina 530 de Src. En la figura se incluye además un control del silenciamiento de SHP-1 alcanzado. La imagen muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Como se observa en la figura 65 la anulación de SHP-1 provocó una disminución de un 60 % en los niveles de fosforilación de FAK en su residuo de activación (tirosina 397). Con respecto a Src, la ausencia de SHP-1 provocó un aumento en los niveles de fosforilación tanto de la tirosina 419 (residuo “activador” de Src) como de la tirosina 530 (cuya fosforilación provoca la inhibición de Src). Dada ésta situación nos planteamos analizar la actividad enzimática de Src mediante un ensayo quinasa radiactivo.

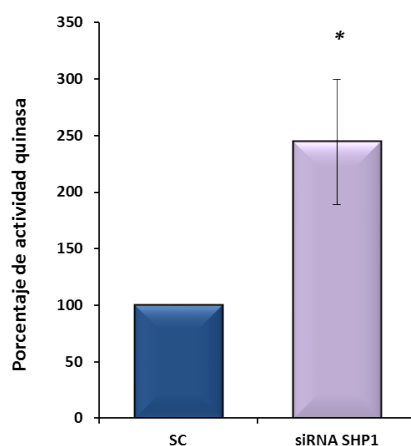


Figura 66: **Efecto del silenciamiento de SHP-1 sobre la actividad quinasa de Src.** Las células PC-3 fueron transfectadas con un siRNA específico para SHP-1 ó una secuencia control. Tras 72 horas se inmunoprecipitó Src y se evaluó su actividad quinasa sobre un sustrato artificial (*Raytide<sup>TM</sup>*) utilizando fósforo radiactivo. La imagen muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes (\*  $p < 0,05$  versus SC).

Como se observa en la figura 66, la ausencia de SHP-1 provoca un aumento estadísticamente

significativo de más de un 100 % en la actividad quinasa de Src, con respecto al control.

Estos resultados demuestran que AKT1 interacciona con FAK, p85 y Src constituyendo una plataforma de señalización celular cuya composición está regulada por SHP-1. La ausencia de ésta fosfatasa provoca una desorganización de éste complejo, desprendiéndose del mismo tanto FAK como p85 a la par que se observa una disminución en la activación de ambas. Sin embargo, Src permanece unido a AKT1 y su actividad quinasa se ve aumentada.

## DISCUSIÓN.

---

## **Papel diferencial de las isoformas de AKT en el control de la proliferación celular.**

El cáncer de próstata continuará siendo la patología maligna más frecuente entre los hombres europeos en general y españoles en particular, según proyecciones del informe GLOBOCAN 2008, al menos hasta 2015 (**OMS**, *International Agency for Research on Cancer*). Sin embargo, dada la lenta evolución de ésta patología, la generación de metástasis en sitios distales es la principal complicación y, en última instancia, la causa de la muerte de los pacientes. Debido a esto, es fundamental comprender en profundidad el papel que pueden jugar las vías de señalización en el proceso metastásico.

En el caso del cáncer de próstata, tanto en sus etapas iniciales como en la independiente de andrógenos, se ha demostrado que la expresión y fosforilación de AKT puede ser un biomarcador importante en el diagnóstico y pronóstico de la progresión tumoral. Actualmente no se cuenta con tratamientos eficaces para el cáncer de próstata metastásico y dado que AKT es un nodo central en el que convergen múltiples señales activadoras, su inhibición constituye un objetivo terapéutico de primer orden. Sin embargo, el éxito de ésta estrategia depende de conocer con precisión el papel de sus distintas isoformas. Establecer la relación "isoforma de AKT - efector - proceso celular" permitirá el desarrollo de inhibidores cada vez más específicos del proceso celular a tratar, acercándonos a la verdadera medicina personalizada.

En éste trabajo se demuestra que las isoformas de AKT regulan de modo diferencial distintos procesos celulares implicados en la proliferación de las células PC-3, un modelo de metástasis de cáncer de próstata. Cuando se realizaron silenciamientos específicos de cada isoforma, se observó que la anulación de AKT1 y AKT2 provocó una inhibición de la proliferación de esta línea. Sin embargo, solamente la anulación de AKT2 provocó una parada en el ciclo celular, en tanto que el silenciamiento de AKT1 no modificó la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular. Los resultados de nuestro trabajo implican claramente a la isoforma 2 de AKT como un regulador clave de las etapas iniciales del ciclo celular, ya que tras provocar su anulación se observó una reducción en los niveles de ciclina D1, CDK2, CDK6 y pRb así como un aumento de p27, todas ellas moléculas implicadas en el punto de control G1/S y el "punto de restricción" <sup>13</sup>. Estas observaciones son novedosas ya que, aunque Sasaki y cols. <sup>145</sup> demostraron que la inhibición de isoformas de AKT afecta el crecimiento de las tres principales líneas derivadas de metástasis prostáticas (PC-3, LNCaP y DU-145), su trabajo solamente se centra en dirigir siRNAs específicos de las isoformas de AKT en tumores generados en ratones, sin estudiar ningún efector molecular de las mismas u ofrecer alguna explicación a sus observaciones de la menor proliferación en las líneas celulares utilizadas.

Para que el ciclo celular progrese es necesaria la formación de los complejos ciclina D/CDK4-6, durante la fase G1 temprana. Entre los distintos reguladores de la expresión de ciclina D1 destaca el complejo mTORC-1, que por un lado promueve la transcripción de los mRNAs denominados 5'-TOPs

y por otro lado fosforila y activa a p70S6K, promoviendo la traducción proteica. Nosotros demostramos que en las células PC-3, únicamente AKT2 regula los niveles de ciclina D1 por un mecanismo que requiere mTORC-1 y p70S6K. Cuando se anuló AKT2 se observó una disminución en los niveles de ésta ciclina, así como una menor fosforilación en el residuo Thr389 de p70S6K similar a lo obtenido al tratar las células PC-3 con rapamicina, un inhibidor de mTORC1. Aunque ya en 2003, Gao y cols.<sup>183</sup> demostraron que el tratamiento de las células PC-3 con rapamicina, disminuía los niveles de ciclina D1 en ésta línea, su estudio se basó en la inhibición global de PI3K utilizando el fármaco LY294002, del cual recientemente se han demostrado sus múltiples efectos inespecíficos, por ejemplo sobre canales iónicos<sup>184</sup> o sobre la señalización mediada por calcio<sup>185</sup>, entre otros.

También se ha demostrado que el gen de ciclina D se encuentra reprimido por los factores de transcripción de la familia FOX-O<sup>27</sup> y que GSK-3 $\beta$  es fundamental para la degradación de esta ciclina, y dado que ambas moléculas son reconocidas dianas de AKT, no podríamos descartar que AKT2 controle también estos procesos, siendo esta posibilidad una clara continuación de nuestro trabajo.

Basándonos en el modelo propuesto por Sherr y cols.<sup>24</sup> es evidente que la disminución en los niveles de ciclina D1, unidos a la disminución de los niveles de CDK6 observados al anular AKT2, provocarán una reducción de los complejos que se forman entre las mismas, lo que en última instancia provocaría una menor fosforilación de pRb y, en consecuencia, un bloqueo de los factores de transcripción E2F, disminución de la expresión de ciclina E (así como de otros reguladores del ciclo celular) y parada del ciclo celular en G1/S. Sin embargo, los resultados de este trabajo demuestran que la anulación de AKT2, pero no de AKT1, produjo una drástica disminución en los niveles de pRb. En éstas circunstancias, E2F se encontraría libre, permitiendo la transcripción de ciclina E y la progresión del ciclo celular. De hecho, se observó un aumento en la transcripción y en los niveles de ciclina E. Sin embargo, la ciclina E generada es incapaz de generar complejos con su pareja funcional CDK2, ya que nuestros resultados demostraron que la anulación de AKT2 provocó una disminución en los niveles de ésta quinasa. Aunque no evaluamos directamente la actividad quinasa de CDK2, la disminución de la fosforilación en la Thr187 de p27 (evento que es catalizado por los complejos ciclina E/CDK2) al anular AKT2, confirman esta posibilidad.

La disminución en los niveles de pRb al anular AKT2, que explica directamente la menor fosforilación observada en los residuos que hemos estudiado, es un resultado que sería interesante profundizar, dada la trascendencia de pRb en el control del ciclo celular. En éste sentido, recientemente se demostró que en diferentes líneas celulares, incluyendo PC-3 y LNCaP, el promotor del gen *RB1* se encuentra hipermetilado y que dicho patrón podría llegar a ser un marcador útil en el pronóstico ó diagnóstico de tumores prostáticos<sup>186</sup>. Sin embargo, la regulación de los niveles de pRb podría ser mucho más compleja, dado que también se ha demostrado que los propios miembros de la familia pueden promover su expresión<sup>187</sup>.

De los resultados que se obtuvieron en este trabajo, destaca la regulación ejercida por AKT2 sobre el metabolismo de p27 en las células PC-3. Nuestros resultados demuestran que únicamente la

anulación de AKT2 provoca un aumento en los niveles totales de p27 y de su concentración en el núcleo donde ejerce su papel inhibitor sobre el ciclo celular. Ninguno de estos cambios se observaron al anular AKT1. Esta observación es trascendente, ya que la capacidad de p27 de inhibir los complejos ciclina/CDK va a depender de su concentración, de su perfil de fosforilación y de su localización subcelular<sup>188</sup>. En éste sentido, los resultados de este trabajo demuestran que cuando se anuló AKT2 hubo un aumento significativo en las cantidades de ARN mensajero de p27 así como una menor degradación de la proteína, que pueden ser responsables del aumento en los niveles de dicha proteína.

La proteólisis de este inhibidor se regula por dos mecanismos distintos: el primero requiere la fosforilación de la Thr187 por el complejo ciclina E/CDK2; la fosforilación de este residuo es necesaria para su reconocimiento por el complejo de ubiquitinación, en concreto por la ubiquitina ligasa Skp2 y su posterior degradación proteasomal. El segundo requiere la salida de p27 del núcleo para lo cual es fosforilado en su residuo Ser10 y una vez en el citoplasma es degradado por KPC (*Kip1 ubiquitination-promoting complex*)<sup>59</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la anulación de AKT2 aumentó la estabilidad proteica de p27 debido a una clara disminución en la fosforilación del residuo Thr187, sin observarse cambios en la fosforilación del residuo de Ser10. Por lo tanto AKT2, pero no AKT1, disminuye los niveles de p27 promoviendo su degradación proteasomal por un mecanismo dependiente de ciclina E/CDK2/Skp2 pero independiente de KPC.

Un resultado llamativo en éste punto es que también se observó una clara disminución en la fosforilación del residuo Thr187 al anular AKT1. Se ha descrito que Src fosforila a p27 en residuos de tirosina, lo que evita la acción de éste inhibidor sobre CDK2, permitiéndose así que esta quinasa fosforile a p27 en su residuo Thr187<sup>189</sup>. En éste sentido, nuestros resultados demuestran que en ausencia de AKT1 se produce una disminución en la actividad de Src (lo que podría explicar la menor fosforilación del residuo Thr187 de p27), pero no observamos una disminución en los niveles totales de p27 bajo ésta condición. Para intentar explicar ésta última observación debemos indicar que recientemente se ha demostrado que el silenciamiento de AKT1 puede afectar a la maquinaria de degradación proteica. En condiciones fisiológicas, p27 es fosforilado en su residuo Thr187 y posteriormente reconocido por la ligasa de ubiquitinas, Skp2, que se encuentra activa en el núcleo. Sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación de Skp2 por AKT1, pero no por AKT2, permite la localización citoplasmática de Skp2<sup>190</sup>. Por lo tanto es posible que al anular AKT1 la actividad de Src disminuya, no pudiendo fosforilar residuos de tirosina de p27 lo que facilitaría que éste inhibidor actúe sobre CDK2. En estas condiciones, CDK2 no fosforilaría a p27 en su residuo Thr187, impidiendo su degradación y provocando un aumento de sus niveles totales. Pero paralelamente, la anulación de AKT1 podría favorecer la localización nuclear de Skp2 y, en consecuencia, la degradación de p27. Es decir, la menor fosforilación de la Thr187, que reduciría la degradación de p27, se vería compensada por el aumento de Skp2 en el núcleo y en consecuencia no observaríamos cambios en los niveles totales de p27. Esta hipótesis forma parte de la continuación de nuestro trabajo.

Los resultados de éste trabajo también demuestran que la anulación de AKT2 provocó un aumento

de la localización nuclear de p27. Este incremento podría explicarse teniendo en cuenta que únicamente bajo la disminución de AKT2 se observó un descenso en la fosforilación del residuo Thr157 de p27. Dado que se ha demostrado que la proteína 14-3-3 interacciona con éste residuo fosforilado, suprimiendo la traslocación nuclear de p27<sup>63</sup>, el descenso en la fosforilación de p27 en la Thr157 al disminuir los niveles de AKT2 en las células PC-3 podría inducir una disociación de éste inhibidor de las proteínas 14-3-3, favoreciéndose así su traslocación al núcleo.

Diversos trabajos en la literatura recogen las distintas regulaciones de la vía PI3K/AKT sobre p27, pero poco se ha estudiado acerca de la especificidad molecular de dichas regulaciones. Aunque en 2006, Nacusi y cols.<sup>191</sup> implicaran a AKT1 en la fosforilación de p27 en fibroblastos, nosotros demostramos que en la línea celular PC-3, AKT2 es la isoforma encargada de regular la expresión, localización y degradación de éste inhibidor. La diferente distribución de isoformas de AKT entre los distintos tejidos ó bien su diferente distribución entre compartimentos podría ser una explicación a la diferencia observada, aunque en la publicación de Nacusi y cols. no se menciona la localización de isoformas en la célula objeto de estudio.

En nuestro trabajo también se demostró que en células LNCaP la anulación tanto de AKT1 como de AKT2 provocó una disminución en la proliferación celular, aunque nuevamente este efecto fue mayor al anular AKT2. Sin embargo, ésta menor proliferación fue acompañada con un claro aumento en la apoptosis celular. Aunque ya se ha demostrado que las células LNCaP dependen de la vía PI3K/AKT para su supervivencia, la mayoría de los estudios se basan en la inhibición farmacológica de PI3K (ya sea con LY294002 ó wortmanina)<sup>192,193</sup>, en éste trabajo demostramos que ambas isoformas están implicadas en asegurar la supervivencia de ésta línea.

En la línea DU-145, la anulación de AKT1 ó AKT2 no modificó la proliferación ni la apoptosis celular. Estos resultados podrían explicarse debido a la presencia de la fosfatasa PTEN, presente en DU-145, por lo que la vía PI3K/AKT no se encontraría constitutivamente activa y la dependencia de la célula con respecto a dicha vía sería mucho menor.

En la figura 67 recogemos un modelo propuesto de las regulaciones ejercidas por AKT2 sobre el control del ciclo celular, apoyado por nuestros resultados.

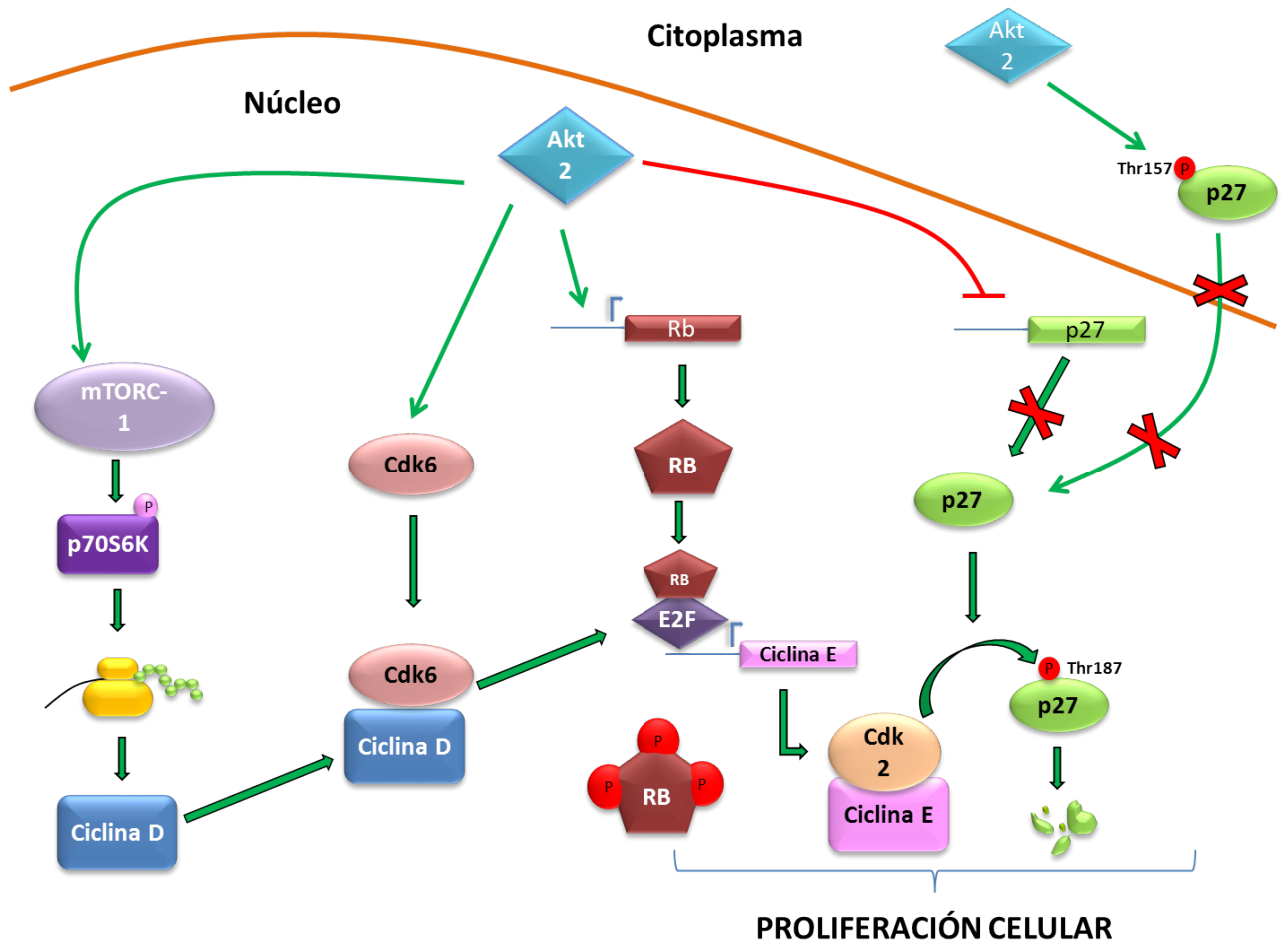


Figura 67: **Implicación de AKT2 en la regulación de la proliferación celular.** AKT2 es específicamente responsable de la activación de mTORC-1. A su vez, la fosforilación de p70S6K (mediada por mTORC-1) promueve la síntesis de ciclina D1. La formación de los complejos ciclina D/CDK6 será crucial para la fosforilación de pRb y la posterior promoción de la síntesis de ciclina E. CDK2 formará complejos con dicha ciclina promoviendo la degradación del inhibidor p27. Dicho inhibidor se encuentra regulado directamente por AKT2: por un lado, provocando una disminución en los niveles de su mRNA; y por otro fosforilando el residuo Thr157 y evitando su ingreso al núcleo. Como resultado de estas regulaciones AKT2 actuaría como un modulador positivo de la proliferación celular.



## **Implicación de las isoformas de AKT en la regulación de la adhesión, extensión y migración celular.**

La generación de metástasis requiere no solo de un aumento de la proliferación celular, sino también de cambios en la adhesión y migración celular. Durante el proceso migratorio se establece una interacción compleja entre el citoesqueleto de actina y los sitios de adhesión celular. Este proceso de recambio dinámico requiere de la participación de numerosas moléculas, entre las que se encuentran quinasas como FAK, Src y las GTPasas pequeñas de la familia Rho. Como indicamos, a las integrinas se unen proteínas de anclaje a las que posteriormente se une FAK, que tras su autofosforilación permite la unión y activación de Src. A su vez, Src fosforilará a FAK en nuevos residuos de tirosina permitiendo su máxima activación. A los complejos FAK/Src formados se unirán nuevas proteínas que a su vez verán modificadas su actividad y/o localización.

Los resultados de éste trabajo demuestran que en células PC-3, la anulación de AKT1 provocó una menor adhesión y migración celular, acompañado de una disminución en la capacidad de extensión celular. Desde el punto de vista molecular, se observó una menor fosforilación en el residuo Tyr397, en la Tyr861 y en menor proporción en la Tyr576 de FAK así como en la Tyr419 de Src. La menor fosforilación de la Tyr397 de FAK disminuiría la unión y posterior activación de Src, lo que explicaría el descenso en la fosforilación de otros residuos de FAK.

Como consecuencia de la desactivación global de FAK se generarán menos complejos FAK/Src, lo que dará como resultado una incapacidad de unión de p130Cas. Es esperable que en consecuencia disminuya la fosforilación de esta última, lo que provocará una menor unión de proteínas adaptadoras de la familia Crk que regulan, junto con la propia FAK, los GAFs y GEFs responsables de los ciclos de activación y desactivación de las GTPasas pequeñas de la familia Rho<sup>80</sup>. De hecho, nuestros resultados demuestran que la anulación de AKT1 provocó una disminución en los niveles de RhoA y Rac1 unidas a GTP ("activas"), lo que afectará claramente a la reorganización del citoesqueleto de actina. Todas éstas alteraciones moleculares pueden ser responsables de la pérdida de adhesión así como de la disminución en la extensión y la migración celular que se observó al anular AKT1.

Clásicamente se ha aceptado que AKT es un efector indirecto de FAK ya que p85 se une a FAK fosforilado activándose así PI3K y, en consecuencia, AKT<sup>194</sup>. Sin embargo, nuestros datos demuestran que FAK y Src pueden ser también efectores de AKT, más concreto de AKT1. En realidad las dos posibilidades serían factibles ya que nosotros mostramos que todas éstas quinasas, es decir, FAK, Src y la subunidad p85 de PI3K y AKT1 forman un complejo de señalización. La generación de ésta plataforma permitirá múltiples interacciones entre las proteínas implicadas que podrían funcionar no sólo como quinasas, sino como proteínas de anclaje.

En este sentido, recientemente se ha descrito que, en células de cáncer colorrectal, la formación de complejos entre AKT, FAK y Src permite aumentar la fosforilación en tirosinas de FAK, en un proceso

que depende de Src<sup>195</sup>. A su vez, también se ha demostrado que AKT fosforila a FAK en residuos de serina<sup>196</sup>. Por otra parte, también se ha descrito que AKT requiere fosforilación en tirosinas para su completa activación<sup>107</sup>, y que Src puede ejercer funciones de regulación sobre la propia AKT<sup>197</sup>. Incrementando la complejidad del núcleo de señalización que parece formarse, debemos recordar que se ha demostrado que PI3K regula la familia de GTPasas Rho, sobre todo actuando sobre distintos GEFs y GAPs y que también se ha propuesto a FAK como un interruptor molecular en la regulación de dichos factores<sup>94</sup>.

Por todo lo indicado anteriormente, no parece extraño que la generación de una plataforma de señalización, compuesta por varias proteínas, sea más importante que la regulación directa entre sustrato y efector. Así, AKT1 podría tanto interactuar como servir de anclaje para otras proteínas, como FAK y Src. Éstas últimas, convenientemente cercanas, podrían fosforilarse y activarse, a la vez que podrían regular a la propia AKT1. En consecuencia, la ausencia de esta isoforma puede provocar una desorganización global de las plataformas generadas, dando como resultado una incapacidad de conexión entre las señales externas y el interior celular que, en última instancia, lleva al desprendimiento de las células acompañada de una mayor sensibilidad a sufrir algún fenómeno de muerte celular.

Con respecto al último punto, nuestros resultados indican que las células donde se produjo la inhibición de AKT1, no sólo se desprendieron más de su sustrato, sino que fueron más sensibles a *anoikis* ó muerte por pérdida de adhesión. Éste proceso puede ser responsable de la inhibición de la proliferación celular detectada al anular AKT1, que no implicaba modificación del ciclo celular. Las células PC-3 presentan una elevada resistencia a la muerte tras desprenderse de su sustrato, proceso que depende de algunas moléculas claves como Src ó FAK<sup>198</sup>. En éste sentido, se ha demostrado que el estado de oxidorreducción desregulado en PC-3 lleva a una activación constitutiva de Src que podría permitir a la célula sobrevivir en suspensión<sup>199</sup>. Por su parte, también se ha demostrado que en células PC-3, FAK debe ser fosforilado para que las mismas no mueran al estar en suspensión<sup>200</sup>. Finalmente, Liu y cols.<sup>201</sup> demostraron que, en fibroblastos, la ausencia de AKT1 inhibe el crecimiento independiente de anclaje. Considerando estos datos, así como los resultados de nuestro trabajo, podemos postular que la resistencia de las células PC-3 a sufrir apoptosis tras desprenderse de su sustrato depende de AKT1 y de las interacciones generadas en la plataforma de señalización integrada por FAK, Src y la propia AKT1.

Por su parte, y al contrario que AKT1, en la células PC-3 la anulación de AKT2 incrementó la migración y disminuyó la extensión celular, sin provocar cambios en la adhesión, ni en la resistencia al *anoikis*. Con respecto a los efectores moleculares, únicamente se observó un aumento la fosforilación de FAK en la Tyr861, sin modificaciones en la fosforilación de Src.

Ya en 2001, se demostró que la fosforilación del residuo Tyr861 de FAK se asocia a la alta capacidad migratoria que presentan las células PC-3<sup>81</sup>. Además ésta una modificación de suma importancia para la interacción de FAK con p130Cas. A ésta última se unirá la proteína adaptadora Crk que reclutará a la proteína DOCK180, una GEF que finalmente promueve la activación de Rac1<sup>202</sup>. En concordancia,

nuestros resultados demuestran que cuando se anuló AKT2 hubo un aumento en los niveles de Rac1 activa.

En éste trabajo también se observó un ligero aumento en los niveles de RhoA activo al anular AKT2. Aunque se han propuesto algunas acciones opuestas entre RhoA y Rac1 con respecto a la migración celular, se ha demostrado que la activación de RhoA es esencial para la transcripción de genes, dependientes del factor de transcripción NF $\kappa$ B, implicados en el fenotipo invasivo de las células PC-3<sup>203</sup>.

Es evidente que el silenciamiento de AKT2, en comparación con el de AKT1, provoca solo ligeros cambios en la maquinaria migratoria; además la localización de esta isoforma en el núcleo no parece estar en concordancia con la regulación de las GTPasas y/o efectores de localización citoplasmática. Sin embargo, debemos tener en cuenta que recientemente se ha demostrado que ciclina D y p27, cuyos niveles se ven drásticamente modificados al silenciar AKT2, están directamente implicadas en el control de la migración celular y aunque el efecto producido y el mecanismo utilizado no esta claro, parece que estarían implicadas RhoA y Rac<sup>53,204</sup>.

## Interrelación entre las vías PI3K/AKT y la fosfotirosina fosfatasa SHP-1.

En 2010, nuestro grupo demostró que SHP-1 interaccionaba con la subunidad p85 de PI3K y que el silenciamiento de éstas fosfotirosina fosfatasa aumentaba la fosforilación en tirosina de la subunidad p110 de la citada quinasa lo que provocaba la disminución de la actividad de AKT <sup>156</sup>.

En esta tesis nosotros confirmamos que la mayor fosforilación de p110 provocó una disminución en la actividad de PI3K, como ya sugería la menor fosforilación de AKT, pero además demostramos que SHP-1 controla la vía de PI3K/AKT a otros niveles. En primer lugar, nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de SHP-1 disminuye los niveles totales de la quinasa PDK1 así como su localización nuclear. Por lo tanto SHP-1 controla la actividad de PI3K y PDK1, las dos quinasas responsables de la activación de AKT.

En segundo lugar, demostramos por primera vez que SHP-1 también interacciona específicamente con AKT1 y estabiliza la plataforma de señalización anteriormente descrita integrada por p85, FAK y Src. El efecto estabilizador que ejerce SHP-1 se demuestra cuando observamos que la anulación de SHP-1 provoca una menor interacción de FAK y p85 con AKT-1 sin modificar la unión de Src. La disgregación de esta plataforma provoca drásticas modificaciones en la actividad de las enzimas implicadas: la actividad de Src aumenta, pero la actividad de PI3K, FAK y AKT-1 disminuye.

Por lo tanto, SHP-1 no sólo controla la actividad de AKT-1 regulando la actividad y/o localización de PI3K y PDK1, quinasas responsables de su estimulación, sino que también define los posibles efectores de esta isoforma de AKT estabilizando complejos de señalización en los que se integra esta isoforma y que controlarían los procesos de adhesión y migración celular (figura 68).

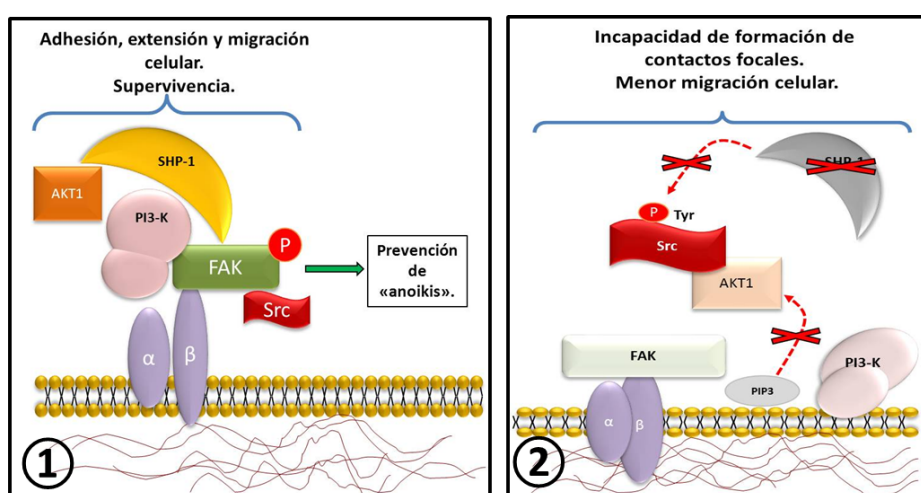


Figura 68: **Interrelación entre la vía de PI3K/AKT y la fosfotirosina fosfatasa SHP-1 en plataformas de señalización en las células PC-3.** 1) Nuestros resultados demuestran que existe una plataforma de señalización integrada, inicialmente, por AKT-1, p85, FAK, Src y SHP-1. De las regulaciones ejercidas por los distintos miembros del complejo sobre los otros componentes dependen el fenotipo migratorio y adhesivo, así como la resistencia al *anoikis* que presentan éstas células. 2) Hemos demostrado el efecto estabilizador de SHP-1 sobre éstos complejos, ya que en su ausencia se separan de AKT1 tanto FAK como p85, aunque permanece unido Src. Estas separaciones dan como resultado una menor activación de FAK, en tanto que la ausencia de actividad fosfatasa de SHP-1 en la plataforma permite un aumento en la actividad de Src. Además en ausencia de SHP-1 existe una menor actividad quinasa de p85. En consecuencia, ni FAK ni AKT1 podrán actuar sobre GEFs ó GAPs de las GTPasas pequeñas de la familia Rho, provocándose una menor adhesión y una disminución en la resistencia al *anoikis*.

Analizando la literatura existente, hay un elemento que puede actuar como aglutinador de estas interacciones y es que todas las moléculas que hemos descrito que interaccionan se encuentran en *rafts* lipídicos.

Los *rafts* lipídicos son microdominios de membrana ricos en colesterol y otros lípidos que secuestran proteínas de señalización constituyendo plataformas para la transducción de señales<sup>205</sup>. Se ha demostrado que AKT1 está presente en estos *rafts* en las células PC3 y LNCaP y que su actividad depende de la integridad de estos dominios<sup>206,207</sup>. Asimismo Src, FAK y PI3K se encuentran también en estos dominios de membrana y esta localización controla su actividad y acceso a sus sustratos<sup>208,209</sup>. En cuanto a SHP-1, recientemente se ha demostrado en células T que entre el 20 y el 30 % de los niveles totales de esta fosfatasa se encuentran de forma constitutiva en los *rafts* lipídicos, sin modificarse dicha cantidad durante la activación de las células T<sup>165,210</sup>. Por el contrario, en leucocitos polimorfonucleares SHP-1 también está presente en *rafts* lipídicos pero es desplazada temporalmente después de la estimulación con GM-CSF, aparentemente para permitir la señalización<sup>211</sup>. Por lo tanto, es plausible pensar en una plataforma de señalización integrada por distintas quinasas y una fosfatasa como SHP-1 interaccionando mutuamente y regulando sus actividades por procesos de fosforilación-defosforilación.

Aunque no conseguimos demostrar que SHP-1 interaccione con AKT2, resultados previos de nuestro grupo indican que la anulación de SHP-1 provocaba un fenotipo similar en algunos aspectos con el obtenido al silenciar AKT2: inhibición de la proliferación celular debida a parada en el ciclo celular en la fase G0/G1 y modificaciones en el metabolismo de p27. En éste sentido, observamos una coincidencia total al anular AKT2 ó SHP-1 sobre el metabolismo de éste inhibidor: en ambas situaciones aumentan sus niveles proteicos totales, los niveles de su mensajero y disminuye su degradación, con cambios en su localización subcelular.

La concordancia indicada es llamativa por lo que nos interesó encontrar un vínculo que relacionara a AKT2 y SHP-1 en las regulaciones observadas. Además de la posibilidad de una desactivación global de PI3K, con una consecuente menor generación de PIP3 (como confirmamos en el presente trabajo), nuestros resultados demuestran que al anular SHP-1 disminuyeron los niveles totales de la quinasa PDK1 y además el marcaje nuclear proveniente de la misma disminuyó drásticamente. Es plausible pensar que tras la interacción y la importación nuclear, PDK1 podría activar a AKT2, isoforma que en células PC-3 se ubica en dicho compartimiento. Cabe recordar que la traslocación nuclear de PDK1 se ha propuesto como un mecanismo fundamental en la regulación de las funciones de esta quinasa<sup>212</sup> y que recientemente se ha publicado que SHP-1 puede interactuar con PDK1, siendo capaz de traslocarlo al núcleo<sup>182</sup>.

Si esto fuera cierto, al anular SHP-1 se produciría una menor generación de PIP3, lo que implicaría una menor activación de PDK1 (cuyos niveles además disminuirían), a la par que se afectaría la traslocación de esta quinasa al núcleo. Ambas situaciones provocarían una menor activación de AKT2 nuclear la cual, entre otras funciones, ya no fosforilaría a los factores de transcripción FOX-O, permitiendo la transcripción y el consiguiente aumento en los niveles proteicos totales de p27. Faltaría, para

apoyar éstos resultados, realizar ensayos de actividad nuclear de AKT2 confirmando que la anulación de SHP-1 provoca una disminución de la actividad quinasa de AKT2, sin olvidar que además existe la posibilidad de una regulación de PI3K nuclear mediada directamente por SHP-1.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que AKT1 y AKT2 regulan de forma diferencial e incluso opuesta procesos celulares implicados en la progresión tumoral prostática. AKT1 estimula la adhesión y la migración celular y es responsable de la resistencia al *anoikis*, mientras que AKT2 estimula la proliferación pero inhibe la migración celular. Estas diferencias pueden deberse a la diferente distribución subcelular de las dos isoformas con AKT1 localizada principalmente en el citoplasma y AKT2 en el núcleo; esta localización determinará a su vez importantes interacciones diferenciales de las isoformas con otros sustratos. Pero también será importante el contexto subcelular ya que en otras líneas celulares prostáticas como LNCaP y DU-145, aunque AKT1 y AKT2 presentan una localización celular similar desempeñan funciones distintas a las descritas en PC-3. Por último, aunque no menos importante, la fosfotirosina fosfatasa SHP-1 regula de forma diferencial ambas isoformas: puede controlar la actividad de ambas a través de PI3K y PDK1, pero sólo interacciona con AKT1. En la figura 69 proponemos un modelo integrado de las regulaciones demostradas en este trabajo, apoyado por nuestros resultados.

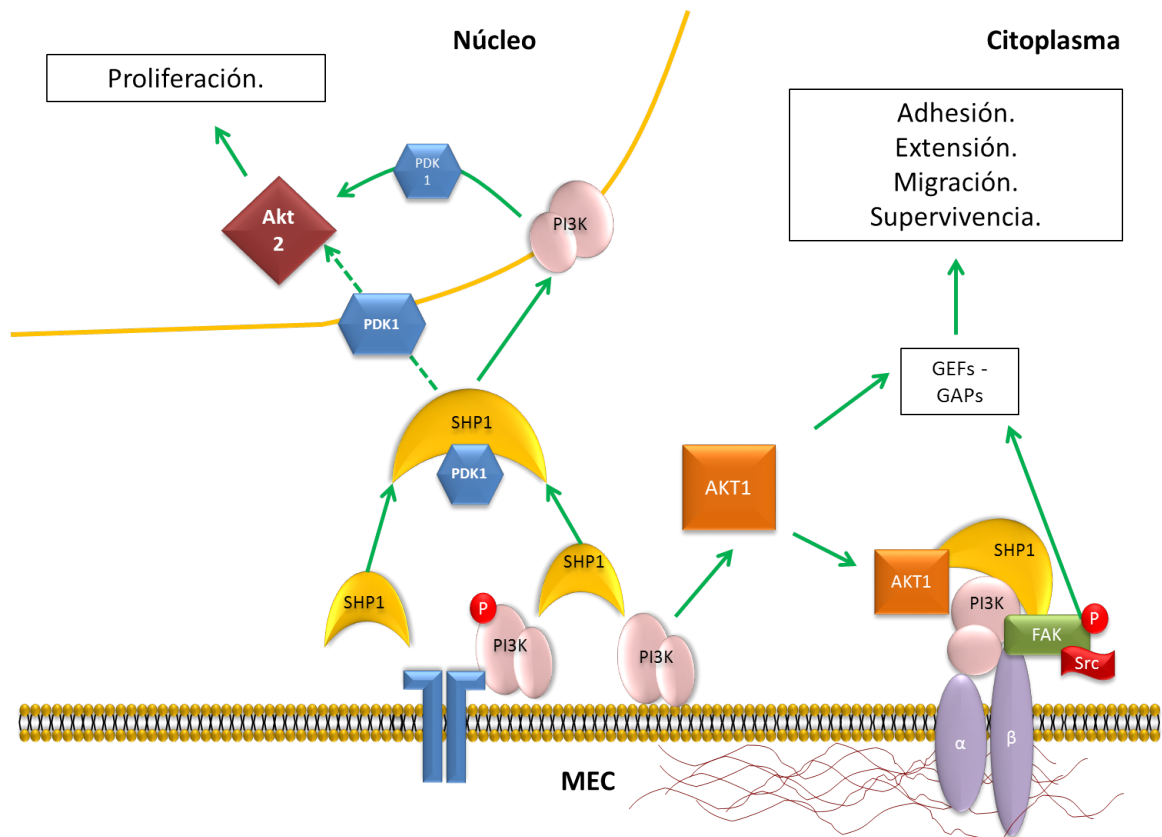


Figura 69: **Modelo integrado propuesto para explicar la interrelación entre la fosfotirosina fosfatasa SHP-1 y la vía PI3K/AKT.**

El papel diferencial de las isoformas de AKT subraya la importancia de determinar los niveles y el estado de activación de AKT1 y AKT2 en pacientes con cáncer de próstata y apoya la necesidad de

diseñar inhibidores específicos de cada una de las isoformas. Un mejor conocimiento de las funciones específicas de cada una de estas isoformas permitirá el desarrollo de terapias cada vez más eficaces contra una diana clave en la progresión del cáncer de próstata.

## CONCLUSIONES.

---



---

Las conclusiones del presente trabajo son:

- ♦ Las isoformas AKT1 y AKT2 se expresan en las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3, LNCaP y DU-145 aunque presentan diferente localización subcelular: AKT1 se localiza principalmente en el citosol mientras que AKT2 en el núcleo.
- ♦ AKT1 y AKT2 son moduladores positivos de la proliferación de las células PC-3 pero utilizando distintos mecanismos.
- ♦ AKT1 promueve la proliferación celular aumentando la resistencia al *anoikis* o muerte por pérdida de contacto.
- ♦ AKT2 promueve la proliferación de las células PC-3 modulando la transición G1/S del ciclo celular. En concreto, AKT2 aumenta los niveles de ciclina D1, CDK6, CDK2 y pRb, en tanto que disminuye los de p27.
- ♦ AKT2 dificulta la acción inhibitoria de p27 sobre el ciclo celular de dos formas: reduciendo sus niveles, al favorecer su degradación e impidiendo su localización nuclear.
- ♦ AKT1 y AKT2 son necesarias para la supervivencia de las células LNCaP pero no para asegurar ni la proliferación ni la supervivencia de las células DU-145.
- ♦ AKT1 es un modulador positivo de los procesos de extensión, adhesión y migración celular; en tanto que la isoforma AKT2 ejerce una regulación negativa sobre la migración celular. Estos efectos opuestos se deben a una regulación diferencial en las fosforilaciones y actividades de Src, FAK y las GTPasas pequeñas RhoA y Rac1.
- ♦ La fosfotirosina fosfatasa SHP-1 regula, indirectamente, AKT controlando la actividad y la localización de PI3K y PDK1, las dos quinasas responsables de fosforilar y activar AKT.
- ♦ La fosfotirosina fosfatasa SHP-1 regula directa y específicamente la actividad de AKT1 controlando la integridad del complejo formado por esta isoforma con la subunidad p85 de PI3K, FAK y Src. La ausencia de SHP-1 disminuye la interacción de p85 y de FAK con AKT1 pero no modifica la unión de Src. La modificación de estas interacciones provoca drásticas alteraciones en la actividad de las enzimas implicadas: la actividad de Src aumenta, pero la actividad de PI3K, FAK y AKT-1 disminuye.
- ♦ El papel diferencial de AKT1 y AKT2 en células de cáncer de próstata puede deberse a la distinta localización subcelular de estas isoformas lo que determinaría los sustratos a los que tienen acceso y a la regulación ejercida por otras enzimas como SHP-1.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

## Bibliografía

---

- [1] Ferlay, J; Parkin, DM; Steliarova-Foucher, E: *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008*. Eur J Cancer **46(4)**:765–781 (2010).
- [2] Marzo, AMD; Platz, EA; Sutcliffe, S; Xu, J; Grönberg, H; Drake, CG; Nakai, Y; Isaacs, WB; Nelson, WG: *Inflammation in prostate carcinogenesis*. Nat Rev Cancer **7(4)**:256–269 (2007).
- [3] Crawford, ED: *Complementary medicine, chemoprevention, and staging of prostate cancer*. Rev Urol **5 Suppl 6**:S23–S32 (2003).
- [4] Tenta, R; Sotiriou, E; Pitulis, N; Thyphronitis, G; Koutsilieris, M: *Prostate cancer cell survival pathways activated by bone metastasis microenvironment*. J Musculoskelet Neuronal Interact **5(2)**:135–144 (2005).
- [5] Reddi, AH; Roodman, D; Freeman, C; Mohla, S: *Mechanisms of tumor metastasis to the bone: challenges and opportunities*. J Bone Miner Res **18(2)**:190–194 (2003).
- [6] Langley, RR; Fidler, IJ: *Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis*. Endocr Rev **28(3)**:297–321 (2007).
- [7] Volpert, OV; Dameron, KM; Bouck, N: *Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity*. Oncogene **14(12)**:1495–1502 (1997).
- [8] Murphy, G; Nagase, H: *Progress in matrix metalloproteinase research*. Mol Aspects Med **29(5)**:290–308 (2008).
- [9] Sierra, A: *Metastases and their microenvironments: linking pathogenesis and therapy*. Drug Resist Updat **8(4)**:247–257 (2005).
- [10] Meeran, SM; Katiyar, SK: *Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents*. Front Biosci **13**:2191–2202 (2008).
- [11] Tyson, JJ; Novak, B: *Temporal organization of the cell cycle*. Curr Biol **18(17)**:R759–R768 (2008).
- [12] Vermeulen, K; Bockstaele, DRV; Berneman, ZN: *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif **36(3)**:131–149 (2003).
- [13] Shackelford, RE; Kaufmann, WK; Paules, RS: *Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress*. Environ Health Perspect **107 Suppl 1**:5–24 (1999).

- [14] Rao, PN; Johnson, RT: *Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis*. Nature **225(5228)**:159–164 (1970).
- [15] Hanks, SK; Rao, PN: *Initiation of DNA synthesis in the prematurely condensed chromosomes of G1 cells*. J Cell Biol **87(1)**:285–291 (1980).
- [16] Dorée, M; Hunt, T: *From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner?* J Cell Sci **115(Pt 12)**:2461–2464 (2002).
- [17] Assoian, RK; Yung, Y: *A reciprocal relationship between Rb and Skp2: implications for restriction point control, signal transduction to the cell cycle and cancer*. Cell Cycle **7(1)**:24–27 (2008).
- [18] Fisher, RP: *Secrets of a double agent: Cdk7 in cell-cycle control and transcription*. J Cell Sci **118(Pt 22)**:5171–5180 (2005).
- [19] Malumbres, M; Barbacid, M: *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci **30(11)**:630–641 (2005).
- [20] Sherr, CJ; Roberts, JM: *Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases*. Genes Dev **18(22)**:2699–2711 (2004).
- [21] Malumbres, M; Sotillo, R; Santamaría, D; Galán, J; Cerezo, A; Ortega, S; Dubus, P; Barbacid, M: *Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6*. Cell **118(4)**:493–504 (2004).
- [22] Kozar, K; Ciemerych, MA; Rebel, VI; Shigematsu, H; Zagozdzon, A; Sicinska, E; Geng, Y; Yu, Q; Bhattacharya, S; Bronson, RT; Akashi, K; Sicinski, P: *Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins*. Cell **118(4)**:477–491 (2004).
- [23] mi Lee, Y; Sicinski, P: *Targeting cyclins and cyclin-dependent kinases in cancer: lessons from mice, hopes for therapeutic applications in human*. Cell Cycle **5(18)**:2110–2114 (2006).
- [24] Sherr, CJ; Roberts, JM: *Cdk inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev **13(12)**:1501–1512 (1999).
- [25] Fu, M; Wang, C; Li, Z; Sakamaki, T; Pestell, RG: *Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions*. Endocrinology **145(12)**:5439–5447 (2004).
- [26] Zhao, J; Pestell, R; Guan, JL: *Transcriptional activation of cyclin D1 promoter by FAK contributes to cell cycle progression*. Mol Biol Cell **12(12)**:4066–4077 (2001).
- [27] Huang, H; Tindall, DJ: *Dynamic FOXO transcription factors*. J Cell Sci **120(Pt 15)**:2479–2487 (2007).

- [28] Hashemolhosseini, S; Nagamine, Y; Morley, SJ; Desrivieres, S; Mercep, L; Ferrari, S: *Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability*. J Biol Chem **273(23)**:14.424–14.429 (1998).
- [29] Gingras, AC; Raught, B; Sonenberg, N: *Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR*. Genes Dev **15(7)**:807–826 (2001).
- [30] Hidalgo, M; Rowinsky, EK: *The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy*. Oncogene **19(56)**:6680–6686 (2000).
- [31] Diehl, JA; Cheng, M; Roussel, MF; Sherr, CJ: *Glycogen synthase kinase-3-beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes Dev **12(22)**:3499–3511 (1998).
- [32] Germain, D; Russell, A; Thompson, A; Hendley, J: *Ubiquitination of free cyclin D1 is independent of phosphorylation on threonine 286*. J Biol Chem **275(16)**:12.074–12.079 (2000).
- [33] Barbash, O; Egan, E; Pontano, LL; Kosak, J; Diehl, JA: *Lysine 269 is essential for cyclin D1 ubiquitylation by the SCF(Fbx4/alphaB-crystallin) ligase and subsequent proteasome-dependent degradation*. Oncogene **28(49)**:4317–4325 (2009).
- [34] Ying, H; Xiao, ZXJ: *Targeting retinoblastoma protein for degradation by proteasomes*. Cell Cycle **5(5)**:506–508 (2006).
- [35] Du, W; Pogoriler, J: *Retinoblastoma family genes*. Oncogene **25(38)**:5190–5200 (2006).
- [36] Nevins, JR: *The Rb/E2F pathway and cancer*. Hum Mol Genet **10(7)**:699–703 (2001).
- [37] Knudsen, ES; Wang, JY: *Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites*. J Biol Chem **271(14)**:8313–8320 (1996).
- [38] Knudsen, ES; Knudsen, KE: *Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle*. Exp Biol Med (Maywood) **231(7)**:1271–1281 (2006).
- [39] Zhang, HS; Gavin, M; Dahiya, A; Postigo, AA; Ma, D; Luo, RX; Harbour, JW; Dean, DC: *Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF*. Cell **101(1)**:79–89 (2000).
- [40] Donnellan, R; Chetty, R: *Cyclin E in human cancers*. FASEB J **13(8)**:773–780 (1999).
- [41] Won, KA; Reed, SI: *Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E*. EMBO J **15(16)**:4182–4193 (1996).
- [42] Grim, JE; Gustafson, MP; Hirata, RK; Hagar, AC; Swanger, J; Welcker, M; Hwang, HC; Ericsson, J; Russell, DW; Clurman, BE: *Isoform- and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase*. J Cell Biol **181(6)**:913–920 (2008).

- [43] Mazumder, S; DuPree, EL; Almasan, A: *A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy*. *Curr Cancer Drug Targets* **4(1)**:65–75 (2004).
- [44] Minella, AC; Loeb, KR; Knecht, A; Welcker, M; Varnum-Finney, BJ; Bernstein, ID; Roberts, JM; Clurman, BE: *Cyclin E phosphorylation regulates cell proliferation in hematopoietic and epithelial lineages in vivo*. *Genes Dev* **22(12)**:1677–1689 (2008).
- [45] Welcker, M; Clurman, B: *Cell cycle: how cyclin E got its groove back*. *Curr Biol* **15(19)**:R810–R812 (2005).
- [46] Delk, NA; Hunt, KK; Keyomarsi, K: *Altered subcellular localization of tumor-specific cyclin E isoforms affects cyclin-dependent kinase 2 complex formation and proteasomal regulation*. *Cancer Res* **69(7)**:2817–2825 (2009).
- [47] Kiyokawa, H; Ray, D: *In vivo roles of CDC25 phosphatases: biological insight into the anti-cancer therapeutic targets*. *Anticancer Agents Med Chem* **8(8)**:832–836 (2008).
- [48] Ray, D; Kiyokawa, H: *Cdc25a levels determine the balance of proliferation and checkpoint response*. *Cell Cycle* **6(24)**:3039–3042 (2007).
- [49] Roussel, MF: *The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer*. *Oncogene* **18(38)**:5311–5317 (1999).
- [50] Gonzalez, S; Serrano, M: *A new mechanism of inactivation of the INK4/ARF locus*. *Cell Cycle* **5(13)**:1382–1384 (2006).
- [51] Vervoorts, J; Lüscher, B: *Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(kip1)*. *Cell Mol Life Sci* **65(20)**:3255–3264 (2008).
- [52] Wu, FY; Wang, SE; Sanders, ME; Shin, I; Rojo, F; Baselga, J; Arteaga, CL: *Reduction of cytosolic p27(kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity*. *Cancer Res* **66(4)**:2162–2172 (2006).
- [53] Besson, A; Gurian-West, M; Schmidt, A; Hall, A; Roberts, JM: *p27kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation*. *Genes Dev* **18(8)**:862–876 (2004).
- [54] Borriello, A; Cucciolla, V; Oliva, A; Zappia, V; Ragione, FD: *p27kip1 metabolism: a fascinating labyrinth*. *Cell Cycle* **6(9)**:1053–1061 (2007).
- [55] Weidinger, C; Krause, K; Klagge, A; Karger, S; Fuhrer, D: *Forkhead box-O transcription factor: critical conductors of cancer's fate*. *Endocr Relat Cancer* **15(4)**:917–929 (2008).
- [56] Dijkers, PF; Medema, RH; Pals, C; Banerji, L; Thomas, NS; Lam, EW; Burgering, BM; Raaijmakers, JA; Lammers, JW; Koenderman, L; Coffey, PJ: *Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(kip1)*. *Mol Cell Biol* **20(24)**:9138–9148 (2000).

- [57] Kamura, T; Hara, T; Matsumoto, M; Ishida, N; Okumura, F; Hatakeyama, S; Yoshida, M; Nakayama, K; Nakayama, KI: *Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(kip1) at G1 phase*. Nat Cell Biol **6(12)**:1229–1235 (2004).
- [58] Nakayama, KI; Hatakeyama, S; Nakayama, K: *Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27kip1*. Biochem Biophys Res Commun **282(4)**:853–860 (2001).
- [59] Susaki, E; Nakayama, KI: *Multiple mechanisms for p27(kip1) translocation and degradation*. Cell Cycle **6(24)**:3015–3020 (2007).
- [60] Reed, SI: *Keeping p27(kip1) in the cytoplasm: a second front in cancer's war on p27*. Cell Cycle **1(6)**:389–390 (2002).
- [61] Liang, J; Zubovitz, J; Petrocelli, T; Kotchetkov, R; Connor, MK; Han, K; Lee, JH; Ciarallo, S; Catzavelos, C; Beniston, R; Franssen, E; Slingerland, JM: *PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest*. Nat Med **8(10)**:1153–1160 (2002).
- [62] Fujita, N; Sato, S; Katayama, K; Tsuruo, T: *Akt-dependent phosphorylation of p27kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization*. J Biol Chem **277(32)**:28.706–28.713 (2002).
- [63] Sekimoto, T; Fukumoto, M; Yoneda, Y: *14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(kip1)*. EMBO J **23(9)**:1934–1942 (2004).
- [64] Ishida, N; Kitagawa, M; Hatakeyama, S; Nakayama, K: *Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(kip1), increases its protein stability*. J Biol Chem **275(33)**:25.146–25.154 (2000).
- [65] LaBaer, J; Garrett, MD; Stevenson, LF; Slingerland, JM; Sandhu, C; Chou, HS; Fattaey, A; Harlow, E: *New functional activities for the p21 family of cdk inhibitors*. Genes Dev **11(7)**:847–862 (1997).
- [66] Friedl, P; Wolf, K: *Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model*. J Cell Biol **188(1)**:11–19 (2010).
- [67] Parsons, JT; Horwitz, AR; Schwartz, MA: *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. Nat Rev Mol Cell Biol **11(9)**:633–643 (2010).
- [68] Schwartz, MA; Horwitz, AR: *Integrating adhesion, protrusion, and contraction during cell migration*. Cell **125(7)**:1223–1225 (2006).
- [69] Worth, DC; Parsons, M: *Adhesion dynamics: mechanisms and measurements*. Int J Biochem Cell Biol **40(11)**:2397–2409 (2008).
- [70] Friedl, P; Wolf, K: *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer **3(5)**:362–374 (2003).

- [71] Desgrosellier, JS; Cheresh, DA: *Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities*. Nat Rev Cancer **10(1)**:9–22 (2010).
- [72] Lo, SH: *Focal adhesions: what's new inside*. Dev Biol **294(2)**:280–291 (2006).
- [73] Jones, RJ; Brunton, VG; Frame, MC: *Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI3-kinase*. Eur J Cancer **36(13 Spec No)**:1595–1606 (2000).
- [74] van Nimwegen, MJ; van de Water, B: *Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy*. Biochem Pharmacol **73(5)**:597–609 (2007).
- [75] Chang, YM; Kung, HJ; Evans, CP: *Nonreceptor tyrosine kinases in prostate cancer*. Neoplasia **9(2)**:90–100 (2007).
- [76] Cooper, LA; Shen, TL; Guan, JL: *Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction*. Mol Cell Biol **23(22)**:8030–8041 (2003).
- [77] Eide, BL; Turck, CW; Escobedo, JA: *Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60Src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK*. Mol Cell Biol **15(5)**:2819–2827 (1995).
- [78] Hildebrand, JD; Schaller, MD; Parsons, JT: *Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions*. J Cell Biol **123(4)**:993–1005 (1993).
- [79] Schlaepfer, DD; Hanks, SK; Hunter, T; van der Geer, P: *Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase*. Nature **372(6508)**:786–791 (1994).
- [80] Mitra, SK; Hanson, DA; Schlaepfer, DD: *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol **6(1)**:56–68 (2005).
- [81] Slack, JK; Adams, RB; Rovin, JD; Bissonette, EA; Stoker, CE; Parsons, JT: *Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells*. Oncogene **20(10)**:1152–1163 (2001).
- [82] Ingley, E: *Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways*. Biochim Biophys Acta **1784(1)**:56–65 (2008).
- [83] Tatosyan, AG; Mizenina, OA: *Kinases of the Src family: structure and functions*. Biochemistry (Mosc) **65(1)**:49–58 (2000).
- [84] Schwartzberg, PL: *The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase*. Oncogene **17(11 Reviews)**:1463–1468 (1998).



- [85] Fizazi, K: *The role of Src in prostate cancer*. Ann Oncol **18(11)**:1765–1773 (2007).
- [86] Bustelo, XR; Sauzeau, V; Berenjano, IM: *GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo*. Bioessays **29(4)**:356–370 (2007).
- [87] Hall, A: *Rho GTPases and the control of cell behaviour*. Biochem Soc Trans **33(Pt 5)**:891–895 (2005).
- [88] Zaidel-Bar, R; Ballestrem, C; Kam, Z; Geiger, B: *Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells*. J Cell Sci **116(Pt 22)**:4605–4613 (2003).
- [89] Berrier, AL; Yamada, KM: *Cell-matrix adhesion*. J Cell Physiol **213(3)**:565–573 (2007).
- [90] Higgs, HN; Pollard, TD: *Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex*. J Cell Biol **150(6)**:1311–1320 (2000).
- [91] Etienne-Manneville, S: *Cdc42—the centre of polarity*. J Cell Sci **117(Pt 8)**:1291–1300 (2004).
- [92] Schwartz, M: *Rho signalling at a glance*. J Cell Sci **117(Pt 23)**:5457–5458 (2004).
- [93] Iiizumi, M; Bandyopadhyay, S; Pai, SK; Watabe, M; Hirota, S; Hosobe, S; Tsukada, T; Miura, K; Saito, K; Furuta, E; Liu, W; Xing, F; Okuda, H; Kobayashi, A; Watabe, K: *RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer*. Cancer Res **68(18)**:7613–7620 (2008).
- [94] Tomar, A; Schlaepfer, DD: *Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility*. Curr Opin Cell Biol **21(5)**:676–683 (2009).
- [95] Broussard, JA; Webb, DJ; Kaverina, I: *Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells*. Curr Opin Cell Biol **20(1)**:85–90 (2008).
- [96] Raftopoulou, M; Hall, A: *Cell migration: Rho GTPases lead the way*. Dev Biol **265(1)**:23–32 (2004).
- [97] Glading, A; Lauffenburger, DA; Wells, A: *Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility*. Trends Cell Biol **12(1)**:46–54 (2002).
- [98] Pugacheva, EN; Roegiers, F; Golemis, EA: *Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling*. Curr Opin Cell Biol **18(5)**:507–515 (2006).
- [99] Osaki, M; Oshimura, M; Ito, H: *PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer*. Apoptosis **9(6)**:667–676 (2004).
- [100] Vanhaesebroeck, B; Guillermet-Guibert, J; Graupera, M; Bilanges, B: *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol **11(5)**:329–341 (2010).
- [101] Geering, B; Cutillas, PR; Vanhaesebroeck, B: *Regulation of class IA PI3Ks: is there a role for monomeric PI3K subunits?* Biochem Soc Trans **35(Pt 2)**:199–203 (2007).

- [102] Vivanco, I; Sawyers, CL: *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer **2(7)**:489–501 (2002).
- [103] Jiang, BH; Liu, LZ: *PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis*. Adv Cancer Res **102**:19–65 (2009).
- [104] Knowles, MA; Platt, FM; Ross, RL; Hurst, CD: *Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer*. Cancer Metastasis Rev **28(3-4)**:305–316 (2009).
- [105] Palmieri, G; Capone, M; Ascierto, ML; Gentilcore, G; Stroncek, DF; Casula, M; Sini, MC; Palla, M; Mozzillo, N; Ascierto, PA: *Main roads to melanoma*. J Transl Med **7**:86 (2009).
- [106] Li, DM; Sun, H: *PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A **95(26)**:15.406–15.411 (1998).
- [107] Conus, NM; Hannan, KM; Cristiano, BE; Hemmings, BA; Pearson, RB: *Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase*. J Biol Chem **277(41)**:38.021–38.028 (2002).
- [108] Chen, R; Kim, O; Yang, J; Sato, K; Eisenmann, KM; McCarthy, J; Chen, H; Qiu, Y: *Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem **276(34)**:31.858–31.862 (2001).
- [109] Du, K; Tschlis, PN: *Regulation of the Akt kinase by interacting proteins*. Oncogene **24(50)**:7401–7409 (2005).
- [110] Fayard, E; Tintignac, LA; Baudry, A; Hemmings, BA: *Protein kinase B/Akt at a glance*. J Cell Sci **118(Pt 24)**:5675–5678 (2005).
- [111] Sarbassov, DD; Guertin, DA; Ali, SM; Sabatini, DM: *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR complex*. Science **307(5712)**:1098–1101 (2005).
- [112] Mora, A; Komander, D; van Aalten, DMF; Alessi, DR: *PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction*. Semin Cell Dev Biol **15(2)**:161–170 (2004).
- [113] Currie, RA; Walker, KS; Gray, A; Deak, M; Casamayor, A; Downes, CP; Cohen, P; Alessi, DR; Lucocq, J: *Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*. Biochem J **337 ( Pt 3)**:575–583 (1999).
- [114] Ding, Z; Liang, J; Li, J; Lu, Y; Ariyaratna, V; Lu, Z; Davies, MA; Westwick, JK; Mills, GB: *Physical association of PDK1 with AKT1 is sufficient for pathway activation independent of membrane localization and phosphatidylinositol 3 kinase*. PLoS One **5(3)**:e9910 (2010).
- [115] Song, G; Ouyang, G; Bao, S: *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med **9(1)**:59–71 (2005).

- [116] Foster, DA; Toschi, A: *Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all*. Cell Cycle **8(7)**:1026–1029 (2009).
- [117] Huang, J; Manning, BD: *A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes*. Biochem Soc Trans **37(Pt 1)**:217–222 (2009).
- [118] Datta, SR; Dudek, H; Tao, X; Masters, S; Fu, H; Gotoh, Y; Greenberg, ME: *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell **91(2)**:231–241 (1997).
- [119] Cardone, MH; Roy, N; Stennicke, HR; Salvesen, GS; Franke, TF; Stanbridge, E; Frisch, S; Reed, JC: *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science **282(5392)**:1318–1321 (1998).
- [120] Kops, GJ; Burgering, BM: *Forkhead transcription factors are targets of signalling by the proto-oncogene PKB (c-Akt)*. J Anat **197 Pt 4**:571–574 (2000).
- [121] Luo, JL; Kamata, H; Karin, M: *IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death—a new approach to cancer therapy*. J Clin Invest **115(10)**:2625–2632 (2005).
- [122] Madrid, LV; Mayo, MW; Reuther, JY; Baldwin, AS: *Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappa B through utilization of the ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38*. J Biol Chem **276(22)**:18.934–18.940 (2001).
- [123] Mayo, LD; Donner, DB: *A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A **98(20)**:11.598–11.603 (2001).
- [124] Cross, DA; Alessi, DR; Cohen, P; Andjelkovich, M; Hemmings, BA: *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature **378(6559)**:785–789 (1995).
- [125] Liu, Z; Roberts, TM: *Human tumor mutants in the p110alpha subunit of PI3K*. Cell Cycle **5(7)**:675–677 (2006).
- [126] Vasudevan, KM; Barbie, DA; Davies, MA; Rabinovsky, R; McNear, CJ; Kim, JJ; Hennessy, BT; Tseng, H; Pochanard, P; Kim, SY; Dunn, IF; Schinzler, AC; Sandy, P; Hoersch, S; Sheng, Q; Gupta, PB; Boehm, JS; Reiling, JH; Silver, S; Lu, Y; Stemke-Hale, K; Dutta, B; Joy, C; Sahin, AA; Gonzalez-Angulo, AM; Lluch, A; Rameh, LE; Jacks, T; Root, DE; Lander, ES; Mills, GB; Hahn, WC; Sellers, WR; Garraway, LA: *Akt-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer*. Cancer Cell **16(1)**:21–32 (2009).
- [127] Graff, JR; Konicek, BW; McNulty, AM; Wang, Z; Houck, K; Allen, S; Paul, JD; Hbaiu, A; Goode, RG; Sandusky, GE; Vessella, RL; Neubauer, BL: *Increased Akt activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27kip1 expression*. J Biol Chem **275(32)**:24.500–24.505 (2000).

- [128] Ghosh, PM; Malik, S; Bedolla, R; Kreisberg, JI: *Akt in prostate cancer: possible role in androgen-independence*. *Curr Drug Metab* **4(6)**:487–496 (2003).
- [129] Kreisberg, JI; Malik, SN; Prihoda, TJ; Bedolla, RG; Troyer, DA; Kreisberg, S; Ghosh, PM: *Phosphorylation of Akt (ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer*. *Cancer Res* **64(15)**:5232–5236 (2004).
- [130] Kwabi-Addo, B; Giri, D; Schmidt, K; Podsypanina, K; Parsons, R; Greenberg, N; Ittmann, M: *Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98(20)**:11.563–11.568 (2001).
- [131] Bedolla, R; Prihoda, TJ; Kreisberg, JI; Malik, SN; Krishnegowda, NK; Troyer, DA; Ghosh, PM: *Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation*. *Clin Cancer Res* **13(13)**:3860–3867 (2007).
- [132] Dummler, B; Hemmings, BA: *Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease*. *Biochem Soc Trans* **35(Pt 2)**:231–235 (2007).
- [133] Cho, H; Thorvaldsen, JL; Chu, Q; Feng, F; Birnbaum, MJ: *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. *J Biol Chem* **276(42)**:38.349–38.352 (2001).
- [134] Gonzalez, E; McGraw, TE: *Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106(17)**:7004–7009 (2009).
- [135] George, S; Rochford, JJ; Wolfrum, C; Gray, SL; Schinner, S; Wilson, JC; Soos, MA; Murgatroyd, PR; Williams, RM; Acerini, CL; Dunger, DB; Barford, D; Umpleby, AM; Wareham, NJ; Davies, HA; Schafer, AJ; Stoffel, M; O'Rahilly, S; Barroso, I: *A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2*. *Science* **304(5675)**:1325–1328 (2004).
- [136] Tschopp, O; Yang, ZZ; Brodbeck, D; Dummler, BA; Hemmings-Mieszczak, M; Watanabe, T; Michaelis, T; Frahm, J; Hemmings, BA: *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. *Development* **132(13)**:2943–2954 (2005).
- [137] Stambolic, V; Woodgett, JR: *Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration*. *Trends Cell Biol* **16(9)**:461–466 (2006).
- [138] Zhou, GL; Tucker, DF; Bae, SS; Bhatheja, K; Birnbaum, MJ; Field, J: *Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration*. *J Biol Chem* **281(47)**:36.443–36.453 (2006).
- [139] Arboleda, MJ; Lyons, JF; Kabbinar, FF; Bray, MR; Snow, BE; Ayala, R; Danino, M; Karlan, BY; Slamon, DJ: *Overexpression of Akt2/protein kinase B beta leads to up-regulation of beta-1*

- integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. Cancer Res* **63(1)**:196–206 (2003).
- [140] Jiang, P; Enomoto, A; Jijiwa, M; Kato, T; Hasegawa, T; Ishida, M; Sato, T; Asai, N; Murakumo, Y; Takahashi, M: *An actin-binding protein girdin regulates the motility of breast cancer cells. Cancer Res* **68(5)**:1310–1318 (2008).
- [141] Park, BK; Zeng, X; Glazer, RI: *Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. Cancer Res* **61(20)**:7647–7653 (2001).
- [142] Yoeli-Lerner, M; Toker, A: *Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion. Cell Cycle* **5(6)**:603–605 (2006).
- [143] Gonzalez, E; McGraw, TE: *The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. Cell Cycle* **8(16)**:2502–2508 (2009).
- [144] Nakatani, K; Thompson, DA; Barthel, A; Sakaue, H; Liu, W; Weigel, RJ; Roth, RA: *Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. J Biol Chem* **274(31)**:21.528–21.532 (1999).
- [145] Sasaki, T; Nakashiro, KI; Tanaka, H; Azuma, K; Goda, H; Hara, S; Onodera, J; Fujimoto, I; Tanji, N; Yokoyama, M; Hamakawa, H: *Knockdown of Akt isoforms by RNA silencing suppresses the growth of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun* **399(1)**:79–83 (2010).
- [146] Koseoglu, S; Lu, Z; Kumar, C; Kirschmeier, P; Zou, J: *AKT1, AKT2 and AKT3-dependent cell survival is cell line-specific and knockdown of all three isoforms selectively induces apoptosis in 20 human tumor cell lines. Cancer Biol Ther* **6(5)**:755–762 (2007).
- [147] Page, CL; Koumakpayi, IH; Alam-Fahmy, M; Mes-Masson, AM; Saad, F: *Expression and localization of Akt-1, Akt-2 and Akt-3 correlate with clinical outcome of prostate cancer patients. Br J Cancer* **94(12)**:1906–1912 (2006).
- [148] Wu, C; Sun, M; Liu, L; Zhou, GW: *The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer. Gene* **306**:1–12 (2003).
- [149] Alonso, A; Sasin, J; Bottini, N; Friedberg, I; Friedberg, I; Osterman, A; Godzik, A; Hunter, T; Dixon, J; Mustelin, T: *Protein tyrosine phosphatases in the human genome. Cell* **117(6)**:699–711 (2004).
- [150] Ostman, A; Hellberg, C; Böhmer, FD: *Protein-tyrosine phosphatases and cancer. Nat Rev Cancer* **6(4)**:307–320 (2006).
- [151] Julien, SG; Dubé, N; Hardy, S; Tremblay, ML: *Inside the human cancer tyrosine phosphatome. Nat Rev Cancer* **11(1)**:35–49 (2011).

- [152] Soulsby, M; Bennett, AM: *Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases*. Physiology (Bethesda) **24**:281–289 (2009).
- [153] Chong, ZZ; Maiese, K: *The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury*. Histol Histopathol **22(11)**:1251–1267 (2007).
- [154] Jin, YJ; Yu, CL; Burakoff, SJ: *Human 70-kDa SHP-1L differs from 68-kDa SHP-1 in its C-terminal structure and catalytic activity*. J Biol Chem **274(40)**:28.301–28.307 (1999).
- [155] Poole, AW; Jones, ML: *A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail*. Cell Signal **17(11)**:1323–1332 (2005).
- [156] Rodríguez-Ubreva, FJ; Cariaga-Martinez, AE; Cortés, MA; Pablos, MRD; Ropero, S; López-Ruiz, P; Colás, B: *Knockdown of protein tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits G1/S progression in prostate cancer cells through the regulation of components of the cell-cycle machinery*. Oncogene **29(3)**:345–355 (2010).
- [157] Lorenz, U; Ravichandran, KS; Pei, D; Walsh, CT; Burakoff, SJ; Neel, BG: *Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine t cells*. Mol Cell Biol **14(3)**:1824–1834 (1994).
- [158] Minoo, P; Zadeh, MM; Rottapel, R; Lebrun, JJ; Ali, S: *A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling*. Blood **103(4)**:1398–1407 (2004).
- [159] Kon-Kozlowski, M; Pani, G; Pawson, T; Siminovitch, KA: *The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells*. J Biol Chem **271(7)**:3856–3862 (1996).
- [160] Yang, W; Tabrizi, M; Berrada, K; Yi, T: *SHP-1 phosphatase c-terminus interacts with novel substrates p32/p30 during erythropoietin and interleukin-3 mitogenic responses*. Blood **91(10)**:3746–3755 (1998).
- [161] Uchida, T; Matozaki, T; Noguchi, T; Yamao, T; Horita, K; Suzuki, T; Fujioka, Y; Sakamoto, C; Kasuga, M: *Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains*. J Biol Chem **269(16)**:12.220–12.228 (1994).
- [162] Frank, C; Burkhardt, C; Imhof, D; Ringel, J; Zschörnig, O; Wieligmann, K; Zacharias, M; Böhmer, FD: *Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1*. J Biol Chem **279(12)**:11.375–11.383 (2004).

- [163] Brumell, JH; Chan, CK; Butler, J; Borregaard, N; Siminovitch, KA; Grinstein, S; Downey, GP: *Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C.* J Biol Chem **272(2)**:875–882 (1997).
- [164] Frank, C; Keilhack, H; Opitz, F; Zschörnig, O; Böhmer, FD: *Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation.* Biochemistry **38(37)**:11.993–12.002 (1999).
- [165] Fawcett, VCJ; Lorenz, U: *Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus.* J Immunol **174(5)**:2849–2859 (2005).
- [166] Neel, BG; Gu, H; Pao, L: *The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling.* Trends Biochem Sci **28(6)**:284–293 (2003).
- [167] Tsui, FWL; Martin, A; Wang, J; Tsui, HW: *Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1.* Immunol Res **35(1-2)**:127–136 (2006).
- [168] Matsubara, H; Shibasaki, Y; Okigaki, M; Mori, Y; Masaki, H; Kosaki, A; Tsutsumi, Y; Uchiyama, Y; Fujiyama, S; Nose, A; Iba, O; Tateishi, E; Hasegawa, T; Horiuchi, M; Nahmias, C; Iwasaka, T: *Effect of angiotensin II type 2 receptor on tyrosine kinase Pyk2 and c-Jun NH2-terminal kinase via SHP-1 tyrosine phosphatase activity: evidence from vascular-targeted transgenic mice of AT2 receptor.* Biochem Biophys Res Commun **282(5)**:1085–1091 (2001).
- [169] Han, Y; Amin, HM; Franko, B; Frantz, C; Shi, X; Lai, R: *Loss of SHP1 enhances JAK3/STAT3 signaling and decreases proteasome degradation of JAK3 and NPM-ALK in ALK+ anaplastic large-cell lymphoma.* Blood **108(8)**:2796–2803 (2006).
- [170] Hayslip, J; Montero, A: *Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review.* Mol Cancer **5**:44 (2006).
- [171] Beauchemin, N; Kunath, T; Robitaille, J; Chow, B; Turbide, C; Daniels, E; Veillette, A: *Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells.* Oncogene **14(7)**:783–790 (1997).
- [172] Yu, Z; Su, L; Hoglinger, O; Jaramillo, ML; Banville, D; Shen, SH: *SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase.* J Biol Chem **273(6)**:3687–3694 (1998).
- [173] Valencia, AM; Oliva, JL; Bodega, G; Chiloeches, A; López-Ruiz, P; Prieto, JC; Susini, C; Colás, B: *Identification of a protein-tyrosine phosphatase (SHP1) different from that associated with acid phosphatase in rat prostate.* FEBS Lett **406(1-2)**:42–48 (1997).

- [174] Zapata, PD; Ropero, RM; Valencia, AM; Buscail, L; López, JI; Martín-Orozco, RM; Prieto, JC; Angulo, J; Susini, C; López-Ruiz, P; Colás, B: *Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1*. J Clin Endocrinol Metab **87(2)**:915–926 (2002).
- [175] Kaighn, ME; Narayan, KS; Ohnuki, Y; Lechner, JF; Jones, LW: *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol **17(1)**:16–23 (1979).
- [176] Irie, HY; Pearline, RV; Grueneberg, D; Hsia, M; Ravichandran, P; Kothari, N; Natesan, S; Brugge, JS: *Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Biol **171(6)**:1023–1034 (2005).
- [177] Zhang, Z; Gao, N; He, H; Huang, C; Hua Jiang, B; Jia, L; Shi, X: *The role of phosphatidylinositol-3 kinase in vanadate-promoted S phase entry*. Mol Cell Biochem **255(1-2)**:239–245 (2004).
- [178] Blomen, VA; Boonstra, J: *Cell fate determination during G1 phase progression*. Cell Mol Life Sci **64(23)**:3084–3104 (2007).
- [179] Lee, J; Kim, SS: *The function of p27kip1 during tumor development*. Exp Mol Med **41(11)**:765–771 (2009).
- [180] Viglietto, G; Motti, ML; Bruni, P; Melillo, RM; D'Alessio, A; Califano, D; Vinci, F; Chiappetta, G; Tsihchlis, P; Bellacosa, A; Fusco, A; Santoro, M: *Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer*. Nat Med **8(10)**:1136–1144 (2002).
- [181] Cary, LA; Guan, JL: *Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling*. Front Biosci **4**:D102–D113 (1999).
- [182] Sephton, CF; Zhang, D; Lehmann, TM; Pennington, PR; Scheid, MP; Mousseau, DD: *The nuclear localization of 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 is dependent on its association with the protein tyrosine phosphatase SHP-1*. Cell Signal **21(11)**:1634–1644 (2009).
- [183] Gao, N; Zhang, Z; Jiang, BH; Shi, X: *Role of PI3K/Akt/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer*. Biochem Biophys Res Commun **310(4)**:1124–1132 (2003).
- [184] El-Kholy, W; Macdonald, PE; Lin, JH; Wang, J; Fox, JM; Light, PE; Wang, Q; Tsushima, RG; Wheeler, MB: *The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 potently blocks K(V) currents via a direct mechanism*. FASEB J **17(6)**:720–722 (2003).
- [185] Tolloczko, B; Turkewitsch, P; Al-Chalabi, M; Martin, JG: *LY-294002 [2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4h-1-benzopyran-4-one] affects calcium signaling in airway smooth muscle cells independently of phosphoinositide 3-kinase inhibition*. J Pharmacol Exp Ther **311(2)**:787–793 (2004).



- [186] Mishra, DK; Chen, Z; Wu, Y; Sarkissyan, M; Koeffler, HP; Vadgama, JV: *Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells*. *Mol Cancer Ther* **9(1)**:33–45 (2010).
- [187] Burkhardt, DL; Ngai, LK; Roake, CM; Viatour, P; Thangavel, C; Ho, VM; Knudsen, ES; Sage, J: *Regulation of rb transcription in vivo by RB family members*. *Mol Cell Biol* **30(7)**:1729–1745 (2010).
- [188] Chu, IM; Hengst, L; Slingerland, JM: *The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy*. *Nat Rev Cancer* **8(4)**:253–267 (2008).
- [189] Chu, I; Sun, J; Arnaout, A; Kahn, H; Hanna, W; Narod, S; Sun, P; Tan, CK; Hengst, L; Slingerland, J: *p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2*. *Cell* **128(2)**:281–294 (2007).
- [190] Gao, D; Inuzuka, H; Tseng, A; Wei, W: *Akt finds its new path to regulate cell cycle through modulating Skp2 activity and its destruction by APC/Cdh1*. *Cell Div* **4**:11 (2009).
- [191] Nacusi, LP; Sheaff, RJ: *Akt1 sequentially phosphorylates p27kip1 within a conserved but non-canonical region*. *Cell Div* **1**:11 (2006).
- [192] Shukla, S; Maclennan, GT; Hartman, DJ; Fu, P; Resnick, MI; Gupta, S: *Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion*. *Int J Cancer* **121(7)**:1424–1432 (2007).
- [193] Bertram, J; Peacock, JW; Tan, C; Mui, ALF; Chung, SW; Gleave, ME; Dedhar, S; Cox, ME; Ong, CJ: *Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase pathway promotes autocrine Fas-induced death of phosphatase and tensin homologue-deficient prostate cancer cells*. *Cancer Res* **66(9)**:4781–4788 (2006).
- [194] Chen, HC; Guan, JL: *Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91(21)**:10.148–10.152 (1994).
- [195] Turecková, J; Vojtechová, M; Krausová, M; Sloncová, E; Korínek, V: *Focal adhesion kinase functions as an Akt downstream target in migration of colorectal cancer cells*. *Transl Oncol* **2(4)**:281–290 (2009).
- [196] Wang, S; Basson, MD: *Akt directly regulates focal adhesion kinase through association and serine phosphorylation: implication for pressure-induced colon cancer metastasis*. *Am J Physiol Cell Physiol* **300(3)**:C657–C670 (2011).
- [197] Jiang, T; Qiu, Y: *Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation*. *J Biol Chem* **278(18)**:15.789–15.793 (2003).
- [198] Sakamoto, S; Kyprianou, N: *Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis*. *Mol Aspects Med* **31(2)**:205–214 (2010).

- [199] Giannoni, E; Fiaschi, T; Ramponi, G; Chiarugi, P: *Redox regulation of anoikis resistance of metastatic prostate cancer cells: key role for Src and EGFRbi-mediated pro-survival signals*. *Oncogene* **28(20)**:2074–2086 (2009).
- [200] Johnson, TR; Khandrika, L; Kumar, B; Venezia, S; Koul, S; Chandhoke, R; Maroni, P; Donohue, R; Meacham, RB; Koul, HK: *Focal adhesion kinase controls aggressive phenotype of androgen-independent prostate cancer*. *Mol Cancer Res* **6(10)**:1639–1648 (2008).
- [201] Liu, X; Shi, Y; Han, EK; Chen, Z; Rosenberg, SH; Giranda, VL; Luo, Y; Ng, SC: *Downregulation of Akt1 inhibits anchorage-independent cell growth and induces apoptosis in cancer cells*. *Neoplasia* **3(4)**:278–286 (2001).
- [202] Feller, SM: *Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles*. *Oncogene* **20(44)**:6348–6371 (2001).
- [203] Hodge, JC; Bub, J; Kaul, S; Kajdacsy-Balla, A; Lindholm, PF: *Requirement of RhoA activity for increased nuclear factor kappaB activity and PC-3 human prostate cancer cell invasion*. *Cancer Res* **63(6)**:1359–1364 (2003).
- [204] Neumeister, P; Pixley, FJ; Xiong, Y; Xie, H; Wu, K; Ashton, A; Cammer, M; Chan, A; Symons, M; Stanley, ER; Pestell, RG: *Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages*. *Mol Biol Cell* **14(5)**:2005–2015 (2003).
- [205] Lingwood, D; Simons, K: *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*. *Science* **327(5961)**:46–50 (2010).
- [206] Cinar, B; Mukhopadhyay, NK; Meng, G; Freeman, MR: *Phosphoinositide 3-kinase-independent non-genomic signals transit from the androgen receptor to Akt1 in membrane raft microdomains*. *J Biol Chem* **282(40)**:29.584–29.593 (2007).
- [207] Adam, RM; Mukhopadhyay, NK; Kim, J; Vizio, DD; Cinar, B; Boucher, K; Solomon, KR; Freeman, MR: *Cholesterol sensitivity of endogenous and myristoylated Akt*. *Cancer Res* **67(13)**:6238–6246 (2007).
- [208] Baillat, G; Siret, C; Delamarre, E; Luis, J: *Early adhesion induces interaction of FAK and Fyn in lipid domains and activates raft-dependent Akt signaling in SW480 colon cancer cells*. *Biochim Biophys Acta* **1783(12)**:2323–2331 (2008).
- [209] Liang, X; Nazarian, A; Erdjument-Bromage, H; Bornmann, W; Tempst, P; Resh, MD: *Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction*. *J Biol Chem* **276(33)**:30.987–30.994 (2001).
- [210] Sankarshanan, M; Ma, Z; Iype, T; Lorenz, U: *Identification of a novel lipid raft-targeting motif in Src homology 2-containing phosphatase 1*. *J Immunol* **179(1)**:483–490 (2007).

- 
- [211] Fortin, CF; Larbi, A; Lesur, O; Douziech, N; Fulop, T: *Impairment of SHP-1 down-regulation in the lipid rafts of human neutrophils under GM-CSF stimulation contributes to their age-related altered functions.* J Leukoc Biol **79(5)**:1061–1072 (2006).
- [212] Lim, MA; Kikani, CK; Wick, MJ; Dong, LQ: *Nuclear translocation of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1): a potential regulatory mechanism for PDK-1 function.* Proc Natl Acad Sci U S A **100(24)**:14.006–14.011 (2003).

ANEXO.

---

## ORIGINAL ARTICLE

**Knockdown of protein tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits G1/S progression in prostate cancer cells through the regulation of components of the cell-cycle machinery**FJ Rodríguez-Ubreva<sup>1</sup>, AE Cariaga-Martínez<sup>1</sup>, MA Cortés<sup>1</sup>, M Romero-De Pablos<sup>2</sup>, S Ropero<sup>1</sup>, P López-Ruiz<sup>1</sup> and B Colás<sup>1</sup><sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain and <sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

**SHP-1, a haematopoietic cell-specific tyrosine phosphatase, is also expressed in human prostate. In this study, we report that SHP-1 depletion in PC-3 cells induced by small interfering RNAs causes G1 phase cell-cycle arrest accompanied by changes in some components of the cell-cycle machinery. SHP-1 knockdown increases p27<sup>Kip1</sup> (p27) protein stability, its nuclear localization and p27 gene transcription. These effects could be mediated by PI3K-AKT pathway as SHP-1 interacts with PI3K regulating its activity and p110 catalytic subunit phosphorylation. The increase in p27 protein stability could also be because of reduced cyclin-dependent kinase (CDK2) activity. SHP-1 knockdown decreases the CDK6 levels, inducing retinoblastoma protein hypophosphorylation, downregulation of cyclin E and thereby a decrease in the CDK2 activity. However, the codepletion of SHP-1 and p27 does not produce re-entry into the cycle, implying that p27 is not required to maintain cell-cycle arrest induced by SHP-1 depletion. The maintenance of the PC-3 cell anti-proliferative response after p27 loss could be because of mislocalization of CDK2 induced by SHP-1 knockdown. This study shows that SHP-1 depletion promotes cell-cycle arrest by modulating the activity of cell-cycle regulators and suggests that SHP-1 may be required for the proper functioning of events governing cell-cycle progression.**

*Oncogene* advance online publication, 19 October 2009; doi:10.1038/onc.2009.329

**Keywords:** prostate cancer; cell cycle; p27; CDK2; SHP-1

**Introduction**

The tyrosine phosphatase SHP-1 is a cytosolic protein containing two N-terminal-located SH2 domains that are expressed at high levels in haematopoietic cells and

moderately in many other cell types, including prostate epithelial cells (Valencia *et al.*, 1997; Zapata *et al.*, 2002).

The essential role of SHP-1 as a negative regulator of signal transduction is consistent with the multiple defects in haematopoietic cells observed in moth eaten mice characterized by the loss of SHP-1 activity (Yi and Ihle, 1993; Yi *et al.*, 1993; Pani *et al.*, 1995, 1996; Chen *et al.*, 1996). SHP-1 is also present in normal prostate, benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia and well-differentiated adenocarcinoma but not in poorly differentiated prostate cancer and seems to be involved in somatostatin-mediated inhibition of human prostate adenocarcinoma cell line PC-3 proliferation (Zapata *et al.*, 2002). SHP-1 is, thus, generally considered to be a negative regulator of cell proliferation. However, the current understanding of the highly complex function of SHP-1 has matured to encompass a less simplistic view of the influence of this protein on cell signalling pathways, whereby the enzyme, depending on its target molecules and cell type, may function either as a positive or negative mediator. Thus, it has been reported that SHP-1 is positively involved in EGF- and INF- $\gamma$ -induced STAT activation in non-haematopoietic HeLa cells (You and Zhao, 1997). Furthermore, overexpression of a catalytically inactive mutant of SHP-1 in HEK293 cells strongly suppresses mitogen-activated pathways and reduces cell growth and DNA synthesis (Su *et al.*, 1996).

Progression through the cycle of cell division is regulated by the coordinated activities of cyclin, cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK inhibitors (Malumbres and Barbacid, 2009). CDK4 and CDK6 form complexes with one of several D-type cyclins and function early in the G1 phase. CDK2 complexed with cyclins A and E is essential for the DNA replication and G1/S transition, respectively (Sherr, 1994).

One of the critical targets of cyclin-CDK complexes is the retinoblastoma gene product (Rb), which acts as a transcriptional repressor. In its hypophosphorylated form, it binds to the E2F family of cell-cycle transcription factors during G1 phase and inhibits E2F activity. Rb is inactivated by CDK phosphorylation in the mid- to late-G1 phase of the cell cycle and dissociates from E2F, leading to the activation of genes containing E2F sites and the progression from G1 to S phase (Harbour and Dean, 2000).

Correspondence: Dr B Colás, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Ctra., Madrid-Barcelona km. 33,600, Alcalá de Henares, Madrid E-28871, Spain.

E-mail: begona.colas@uah.es

Received 16 March 2009; revised 3 July 2009; accepted 30 August 2009

Another level of regulation of CDK activity arises from the action of CDK inhibitors (Sherr and Roberts, 1999; Besson *et al.*, 2008). In mammalian cells, the CDK inhibitor p27 binds and inhibits cyclin E/CDK2 and thereby negatively regulates entry into S phase. To traverse G1, cellular p27 levels must decrease. A major mechanism that enables this regulation involves ubiquitin-dependent p27 proteolysis (Pagano *et al.*, 1995; Hengst and Reed, 1996). Two rate-limiting steps for this process include phosphorylation at Thr 187 by CDK2 and recognition of Thr 187-phospho-p27 by the SCFskp2 ubiquitination system (Sheaff *et al.*, 1997; Slingerland and Pagano, 2000). Evidence also exists for transcriptional regulation of p27 (Inoue *et al.*, 1999). Synthesis of p27 mRNA is governed by the Forkhead transcription factor family (Medema *et al.*, 2000), which is negatively regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt growth signalling pathway.

The involvement of p27 in the negative regulation of cell proliferation has been linked to SHP-1, but contradictory results have been obtained. It has been shown in CHO cells (Pages *et al.*, 1999) that the somatostatin analogue RC160 promotes G1 cell-cycle arrest of insulin-treated cells by a mechanism involving the stimulation of SHP-1 and the consequent upregulation of p27. SHP-1 also mediates the anti-proliferative activity of metalloproteinase-2 tissue inhibitor in human microvascular endothelial cells, increasing *de novo* synthesis of p27 with a concomitant inhibition of CDK4 and CDK2 activity (Seo *et al.*, 2006). However, the treatment of human ovarian cancer cells with a PTP inhibitor progressively stopped their ability to form tumours and increases the intracellular levels of CDK2/p27 and CDK2/SHP-1 complex (Caron *et al.*, 2008), suggesting that inhibitors of protein tyrosine phosphatase could be used as potential anti-tumour agents. Thus, the role of SHP-1 in the regulation of the cell cycle is far from clear and no studies have yet been performed that clarify the mechanism by which SHP-1 could modulate the levels, location and activity of proteins involved in cell-cycle control.

In this study, we used small interfering RNAs (siRNAs) to knock down the expression of SHP-1 in PC-3 cells and thereby to analyse its relationship with the cell cycle.

## Results

### *Effect of SHP-1 knockdown on PC-3 cell proliferation*

As knowledge of the intracellular distribution of SHP-1 may provide an insight into their cellular function and regulation we carried out immunofluorescence staining assays to determine the subcellular location of SHP-1 in PC-3 cells. Examination of these cells using confocal microscopy revealed that SHP-1 is present in the nucleus and cytoplasm (Supplementary Figure S1), suggesting that this phosphatase can control processes in both cellular compartments. To gain insight into the molecular roles of SHP-1, we used siRNAs to knock down

the expression of SHP-1 and then analysed the effects on cell proliferation and cell-cycle regulators governing G1/S transition. Western blot analysis shows that the expression of SHP-1 decreased by up to 75% (Figure 1a). The analysis of the effects of SHP-1 knockdown on PC-3 cell proliferation showed that the depletion of SHP-1 resulted in a significant reduction (22%) in the proliferation rates (Figure 1b) that was associated with a significant inhibition of DNA synthesis (35%) compared with the control, as measured by the incorporation of thymidine-<sup>3</sup>H (Figure 1c).

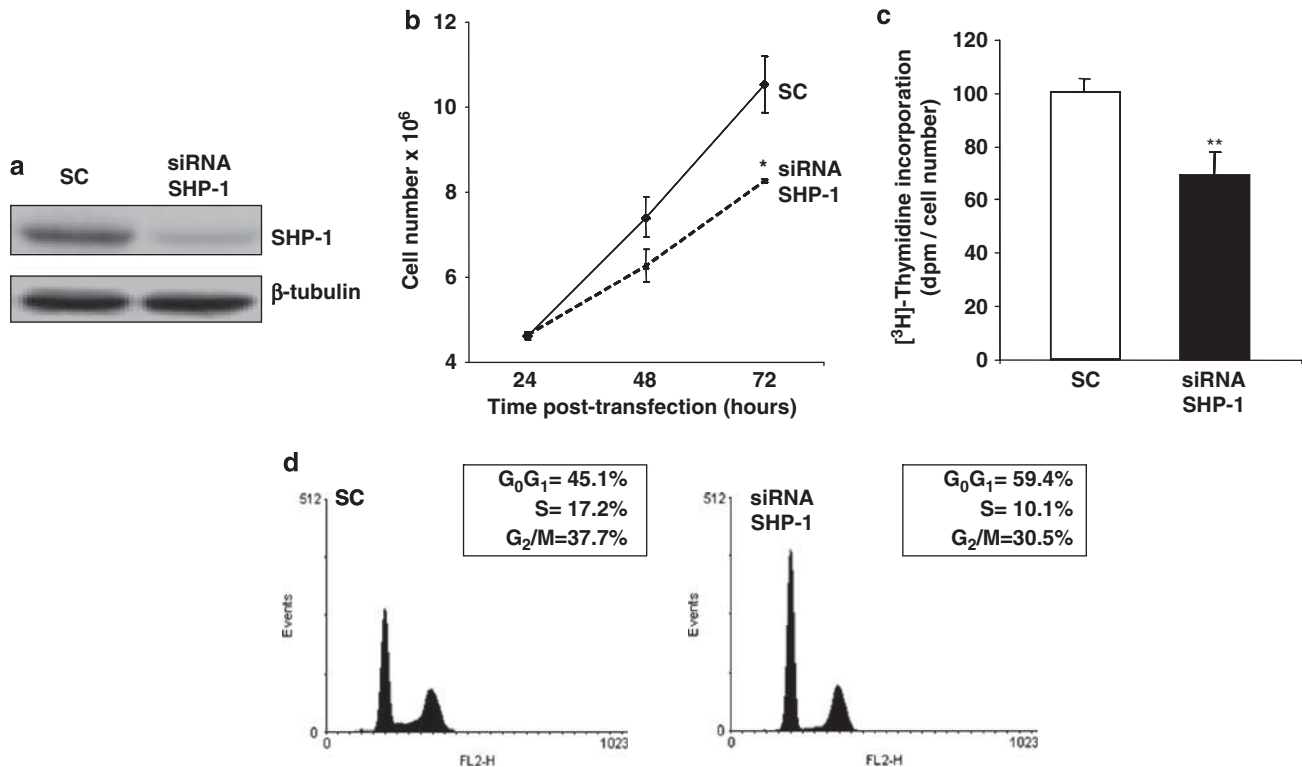
SHP-1 knockdown-induced growth suppression was associated with cell-cycle arrest. As shown in Figure 1d, the loss of SHP-1 expression led to a 31% increase in the G1-phase fraction and a concomitant decrease in the S- and G2/M-phase fractions. These results show that the decrease in SHP-1 inhibits PC-3 cell proliferation owing to the block of progression from G1 to S phase.

### *Effect of SHP-1 knockdown on p27 protein levels and subcellular localization*

To establish whether p27 participates in the anti-proliferative effect induced by depletion of SHP-1, we measured p27 protein expression in SHP-1-depleted cells and found a dramatic increase in the p27 levels in SHP-1 knockdown cells compared with that of control siRNA (Figure 2a, top). A similar result was observed in LNCaP and DU145 human prostate cancer cells (Supplementary Figure S2), suggesting that p27 upregulation induced by SHP-1 depletion is a general event in human prostate carcinogenesis.

We further analysed the effect of SHP-1 on p27 expression at the transcriptional level. We observed that the knockdown of SHP-1 induced a twofold increase in p27 mRNA (Figure 2a, bottom). To further explore whether the SHP-1 knockdown-mediated p27 mRNA induction could be caused by activation of the p27 transcriptional promoter, PC-3 cells were transiently transfected with a cDNA vector containing luciferase reporter gene, controlled by promoter regions of human p27 (p27 Luc, from -3568 to -549) or with the empty vector as a control. As shown in Figure 2b, the knockdown of SHP-1 induced a threefold activation of p27 promoter, as measured by luciferase activity, indicating that the regulation of p27 protein levels by SHP-1 could be, at least partially, explained by the regulation of its promoter activity.

To evaluate whether SHP-1 also regulates p27 protein stability, we blocked translation of p27 mRNA with cycloheximide in SHP-1-depleted cells. The half-life of p27 protein increased from ~4.5 h in control cells to more than 6 h in SHP-1-silenced cells, clearly indicating that p27 protein was more stable in SHP-1 knockdown cells (Figure 2c). As p27 degradation is controlled by Thr 187 phosphorylation we analysed the effect of SHP-1 knockdown on the phosphorylation status of p27-Thr 187. The results shown in Figure 2d show that siRNA-mediated knockdown of SHP-1 causes a dramatic reduction (78%) in p27 phosphorylation on Thr 187, as shown by the decrease in the ratio of Thr 187-phospho-p27 to total p27.



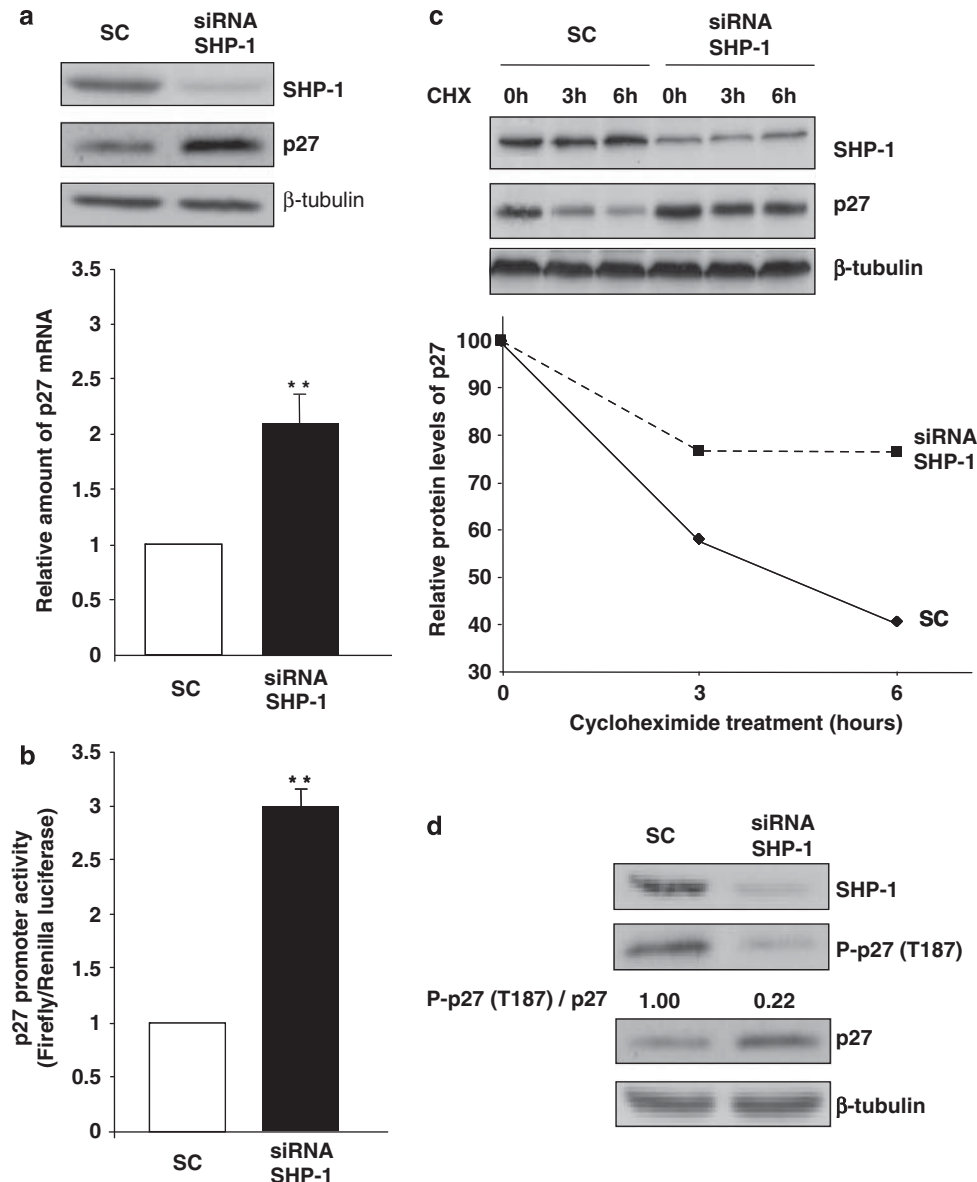
**Figure 1** RNA interference-mediated depletion of SHP-1 inhibits PC-3 cell proliferation. (a) PC-3 cells were transfected with siRNA against SHP-1 (siRNA SHP-1) or control RNA (SC) 72 h post transfection, SHP-1 protein levels were analysed by western blot. (b) Cell number was counted at 24, 48 and 72 h post siRNA transfection. (c) Seventy-two hours post siRNA transfection, cells were incubated with [<sup>3</sup>H]-thymidine to quantify DNA synthesis. The average of three separate experiments is shown. Error bars represent the s.e. \* and \*\* indicate  $P < 0.05$  and  $< 0.01$ , respectively, in comparisons with control cells (*t*-test). (d) Seventy-two hours post siRNA transfection, cells were fixed, stained with propidium iodide and the DNA content measured by flow cytometry. Three separate experiments were carried out, all of which exhibited similar trends. The results of one experiment are shown.

Together these data clearly show that accumulation of p27 protein induced by the loss of SHP-1 is due to the increase in p27 gene transcription and to the decrease in p27 protein degradation arising, at least in part, from the lower level of phosphorylation of Thr 187.

The block of cell cycle mediated by SHP-1 knock-down could be explained not only by the upregulation of p27 protein levels under these conditions but also by changes in its subcellular location. To explore this idea, we first carried out immunofluorescence staining assays to determine cellular location of p27 in PC-3 cells after knockdown of SHP-1. We observed that the depletion of SHP-1 induced an increase in p27 in the nucleus compared with control cells (Figure 3a). Moreover, when we performed a cell fractionation assay we also found an increase in p27 levels in nuclear compartments (Figure 3b). p27 phosphorylation at Ser 10 or Thr 157 facilitates the nuclear-to-cytoplasmic redistribution of p27 (Boehm *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2002). We observed that the increase in nuclear localization of p27 induced by SHP-1 knockdown was associated with a decrease in 55% in p27 Thr 157 phosphorylation, as demonstrated by the decrease in the ratio of Thr 157-phospho-p27 to total p27 (Figure 3c). Changes in p27 Ser 10 phosphorylation were not detected (Figure 3c).

It is well established that the PI3K-AKT pathway regulates p27 transcription, stability and subcellular

localization (Medema *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2002). In this sense, we have shown that inhibition of PI3K with LY-294002 increases the p27 levels in PC-3 cells (Supplementary Figures S3). To address the potential role of this pathway in the effects induced by SHP-1 depletion, we analysed the possible functional interaction between SHP-1 and PI3K. As shown in Figure 4a, the p85 regulatory subunit of PI3K coprecipitates with SHP-1. This interaction was confirmed by the pull-down assay (Figure 4b). To further examine whether SHP-1 modifies tyrosine phosphorylation of p85 and, thus, PI3K activity, we immunoprecipitated (IP) p85 in SHP-1-depleted cells and analysed the tyrosine phosphorylation profile (Figure 4c). Interestingly, in SHP-1-depleted cells, the tyrosine phosphorylation of a band with a molecular mass of approximately 110 kDa was increased in comparison with the control cells. This band was proven to be the p110 catalytic subunit of PI3K by immunoblotting the same samples with an anti-p110 antibody. The amount of p110 that coprecipitated with p85 was not modified by SHP-1 knockdown. To determine whether these changes in the tyrosine phosphorylation of p110 are associated with a change in PI3K activity, we measured the AKT Ser473 phosphorylation as a surrogate indicator of this activity (Andjelkovic *et al.*, 1997). As indicated in Figure 4d, SHP-1 knockdown induced a decrease in the AKT Ser



**Figure 2** SHP-1 knockdown increases p27 levels. PC-3 cells were transfected with siRNA against SHP-1 (siRNA SHP-1) or control RNA (SC) 72 h post transfection. (a) p27 protein levels were analysed by western blot (top) and the relative amount of p27 mRNA was quantified by real time RT-PCR (bottom). (b) After 24 h of siRNA transfection, cells were transiently transfected with p27 luciferase reporter construct or with control empty vector, and a *Renilla* luciferase reporter to normalize transfection efficiency. After 48 h, luciferase activity was determined with a luciferase assay system kit. (c) Seventy-two hours post siRNA transfection, cells were treated with cycloheximide (100  $\mu$ g/ml) for 3 or 6 h and the cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. (d) Seventy-two hours post siRNA transfection, SHP-1, p27, phospho-p27 (T187) and  $\beta$ -tubulin protein levels were analysed by western blot. The phosphorylation levels of p27 (T187) were quantified as the ratio of phospho-p27(T187) to p27 expression. \*\* indicates  $P < 0.01$  in comparisons with control cells (Wilcoxon test). Error bars represent the s.e.

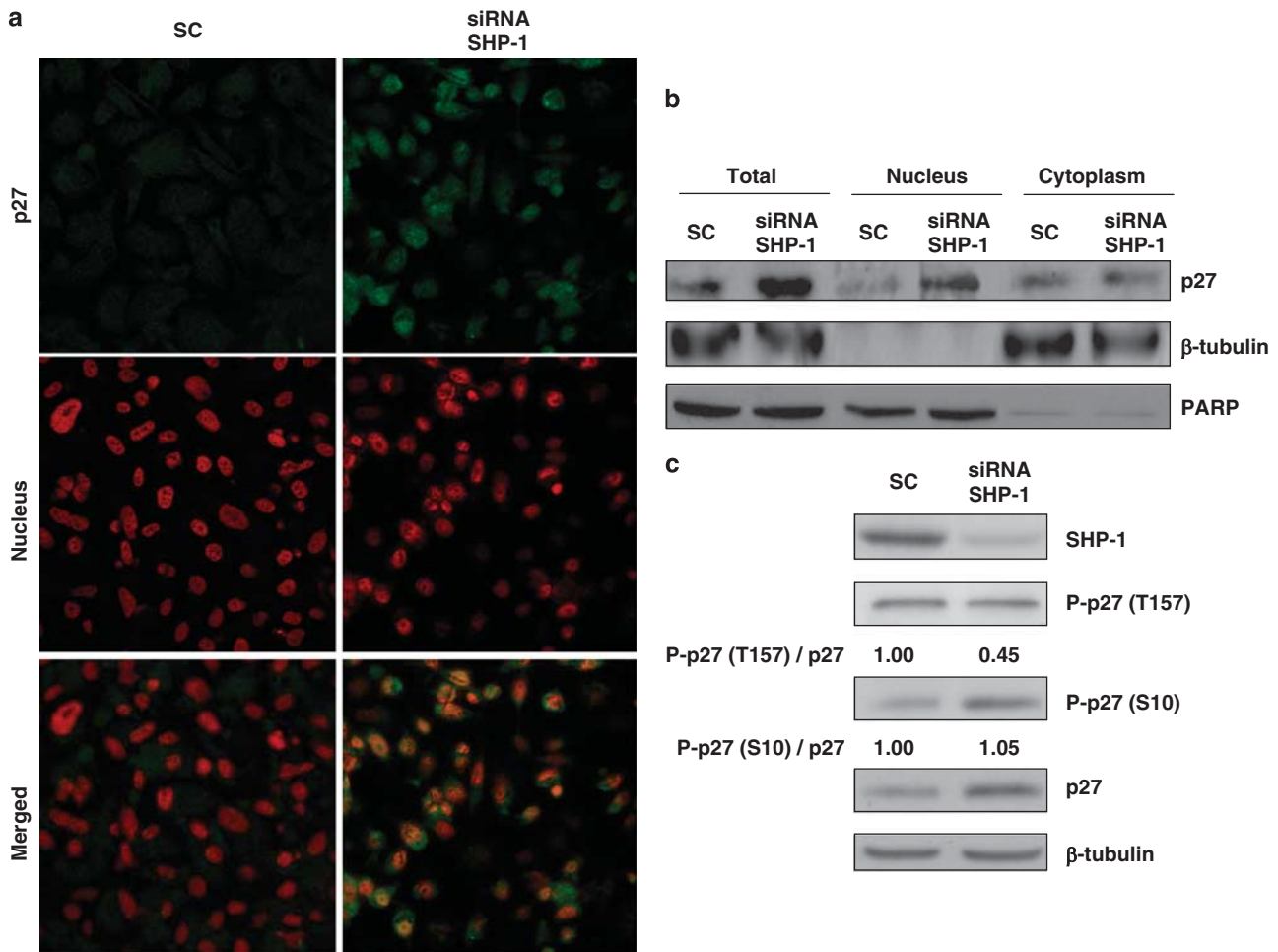
473 phosphorylation. These data indicate a role for SHP-1 in regulating not only p110 phosphorylation but also PI3K activation.

#### Contribution of p27 to cell proliferation inhibition induced by SHP-1 knockdown

To test whether the SHP-1 knockdown-induced growth arrest was mediated by upregulation of the p27 protein, we depleted SHP-1 and p27, individually or together,

and analysed cell proliferation by thymidine- $^3$ H incorporation assay. As we expected, reduced p27 expression resulted in a slight increase in cell proliferation, whereas SHP-1 knockdown induced a significant decrease in this proliferation. However, the codepletion of p27 and SHP1 did not revert the inhibitory effect caused by SHP-1 removal (Figure 5). This result seems to indicate that p27 is not the only factor involved in the growth arrest induced by the decrease in SHP-1 levels.





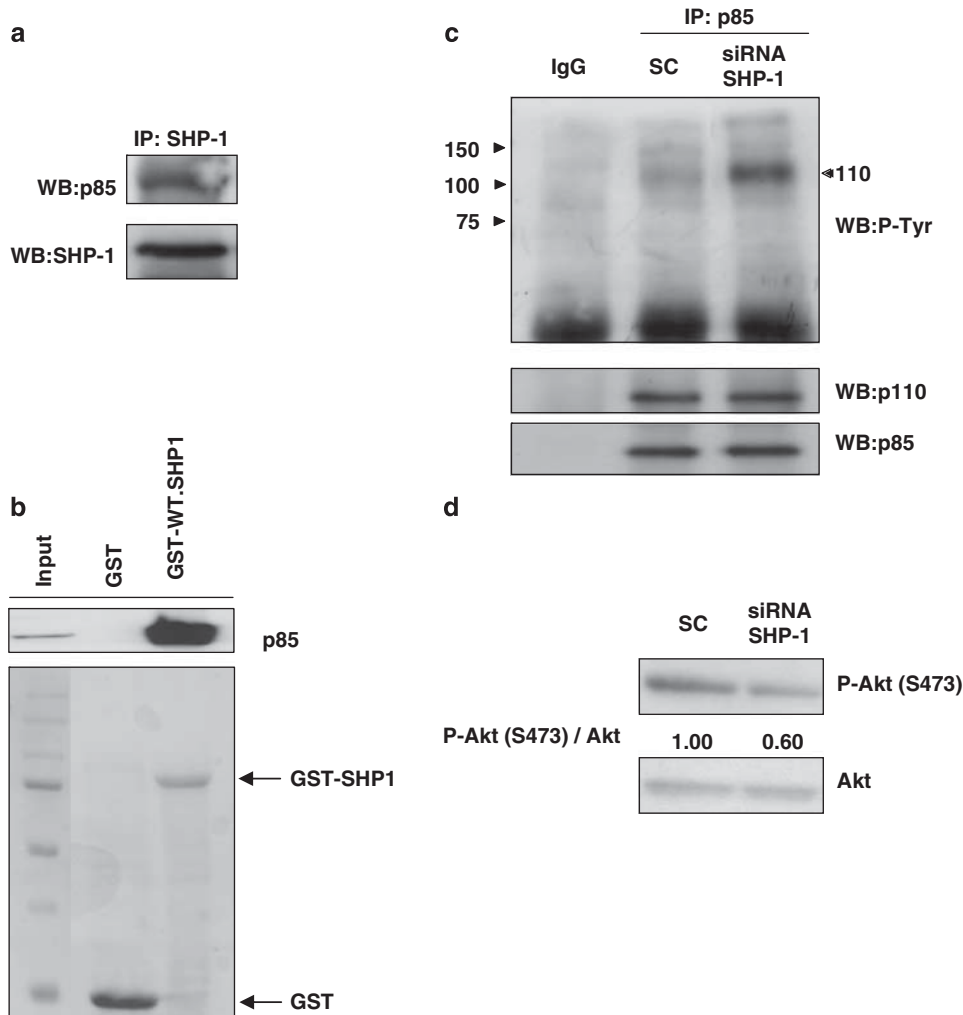
**Figure 3** SHP-1 knockdown increases p27 nuclear location. PC-3 cells were transfected with siRNA against SHP-1 (siRNA SHP-1) or siRNA control (SC). After transfection for 72 h (a), PC-3 cells were fixed and immunostained with anti-p27 antibody and propidium iodide (nucleus). Representative images of three independent experiments are shown. (b) The extractions of total cell lysates, cytosolic, and nuclear fractions were performed and these fractions were immunoblotted with anti-p27 antibody.  $\beta$ -tubulin was used as a cytosolic fraction loading control and PARP as a nuclear fraction loading control. (c) Total cell lysates were immunoblotted with the antibodies indicated. The phosphorylation levels of p27 (T157) and p27 (S10) were quantified as the ratio of phospho-p27 (T157) to p27 expression or phospho-p27 (S10) to p27 expression, respectively. Representative images of three independent experiments are shown.

*Effect of SHP-1 knockdown on the function of G1/S-related cell-cycle regulators*

As p27 accumulation is not essential for inhibiting PC-3 cell proliferation induced by SHP-1 knockdown we analysed the effect of SHP-1 siRNA on cell-cycle regulators that act at the G1/S-phase transition. First, we determined the function of cyclin E–CDK2 complex. p27 is both an inhibitor and a substrate of this complex (Besson *et al.*, 2008). CDK2 kinase activity was measured in CDK2 immunoprecipitates prepared from cells treated with control or SHP-1 siRNA. As shown in Figure 6a, SHP-1 depletion resulted in a significant inhibition of CDK2 activity. The depletion of SHP-1 did not affect the abundance of CDK2 but decreased levels of its partner, cyclin E (Figure 6b). For CDK2 to be fully activated, newly synthesized CDK2 must translocate into the nucleus (Sebastian *et al.*, 1993; Hoffmann *et al.*, 1994). To test whether the SHP-1-mediated effects on CDK2 kinase activity might involve regulation of

CDK2 localization, control and SHP-1 siRNA-treated PC-3 cells were subjected to immunofluorescence staining of CDK2. Examination of these cells, using confocal microscopy, revealed that knockdown of SHP-1 induces the accumulation of CDK2 in the cytoplasm compared with control cells (Figure 6c). We also immunofluorescently stained cyclin E and did not observe changes in its localization (data not shown). To understand the mechanism responsible for the CDK2 mislocalization, we next determined whether this kinase interacts with SHP-1. Using glutathione *S*-transferase (GST)–SHP-1 pull-down assay we found that CDK2 interacts with SHP-1 (Figure 6d). These results suggest that SHP-1 knockdown reduces CDK2 activity by two mechanisms: one that reduces amounts of cyclin E and another that causes CDK2 mislocalization.

Cyclin E is under the control of the E2F family transcriptional factors, which are blocked by hypophosphorylated Rb protein (pRb). The phosphorylation of

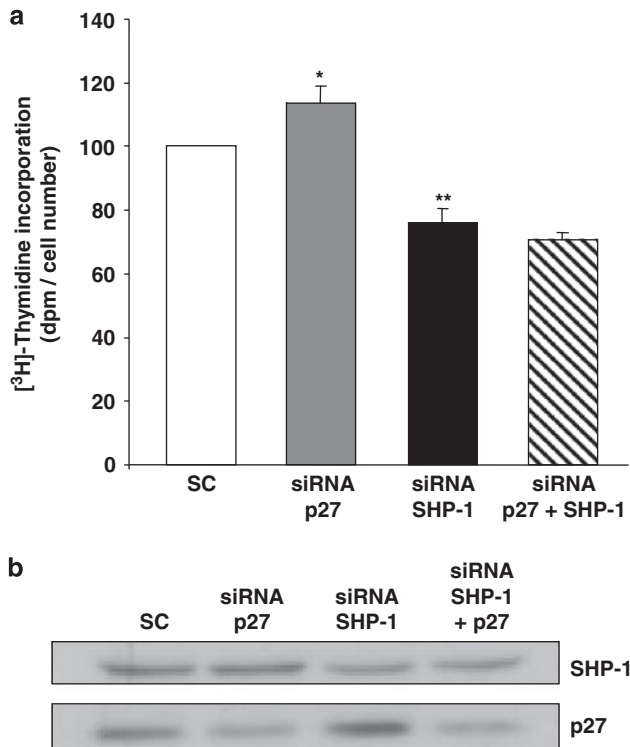


**Figure 4** SHP-1 regulates PI3K-AKT pathway. PC-3 cells were transfected with siRNA against SHP-1 (siRNA SHP-1) or siRNA control (SC), left for 72 h and then lysed. **(a)** Total cell lysates were IP with anti-SHP-1 and immunoblotted with anti-p85 and anti-SHP-1 antibodies. **(b)** Total cell lysates were mixed with either GST alone or GST-SHP-1 fusion proteins immobilized *O*-glutathione-sepharose beads. Bound proteins were immunoblotted with anti-p85. **(c)** Total cell lysates were IP with anti-p85 and immunoblotted with anti-phosphotyrosine, anti-p110 and anti-p85 antibodies. The positions of the protein molecular mass markers are indicated in kilodaltons (kDa). **(d)** Total cell lysates were immunoblotted with anti-pAKT Ser 473 or anti-AKT antibodies. Representative images of three independent experiments are shown.

pRb is initially catalysed by the complexes formed by cyclin D and CDK4 or CDK6 (Harbour and Dean, 2000). As shown in Figure 7a, SHP-1 knockdown induces a reduction of CDK6 levels without causing changes in the cyclin D levels. To determine whether this modification in CDK6 levels affected cyclin D-CDK6 complex activity, we studied the phosphorylation status of pRb and found a decrease in the phosphorylation of pRb at Ser 795, 807 and 811, without changes in the total level of pRb (Figure 7b). These residues have been identified as being phosphorylated initially by cyclin D-CDK4/6 complexes (Zarkowska and Mittnacht, 1997) and thus its lower phosphorylation level implies that the cyclin D-CDK6 complex is less active. These results indicate that SHP-1 knockdown decreases the activity of cyclin D-CDK6 by inducing pRb hypophosphorylation and thereby downregulating cyclin E.

## Discussion

In this study, we report, for the first time, that SHP-1 depletion inhibits PC-3 cell proliferation by regulating the levels and activity of components within the machinery that governs the G1/S transition. SHP-1 depletion resulted in a significant accumulation of p27, a decrease in CDK6 levels, pRb hypophosphorylation, a decrease in cyclin E levels associated with a significant inhibition of cyclin E-CDK2 activity and cell-cycle arrest. Taken together, these findings strongly suggest the following sequence of events: the decrease in CDK6 expression observed in SHP-1-depleted cells reduces the formation of the cyclin D-CDK6 complex, resulting in reduced pRb phosphorylation. It is well known that hypophosphorylated pRb can repress the activity of E2F family members by inhibiting, among other



**Figure 5** SHP-1 depletion-mediated cell-cycle arrest is not attenuated by p27 knockdown. **(a)** PC-3 cells were transfected with siRNA against SHP-1 (siRNA SHP-1), p27 (siRNA p27), with both (siRNA SHP-1 + p27) or with siRNA control (SC). Seventy-two hours post siRNA transfection, cells were incubated with [<sup>3</sup>H]-thymidine to quantify DNA synthesis. The average of three separate experiments is shown. Error bars represent the s.e. \* and \*\* indicate  $P < 0.05$  and  $< 0.01$ , respectively, from comparisons with control cells (*t*-test). **(b)** At the same time, SHP-1, p27 and  $\beta$ -tubulin protein levels were analysed by western blot.

activities, cyclin E transcription that would be the responsible for the reduced CDK2 activity. We also made the novel observation that SHP-1 depletion decreases the nuclear localization of CDK2, and thus, its full activation, contributing to prevent cyclin E-CDK2 activation. The end result is a decrease in p27 phosphorylation on Thr 187, which increases its stability and accumulation in the cell. Furthermore, SHP-1 knockdown also increases p27 gene transcription and promotes its nuclear localization.

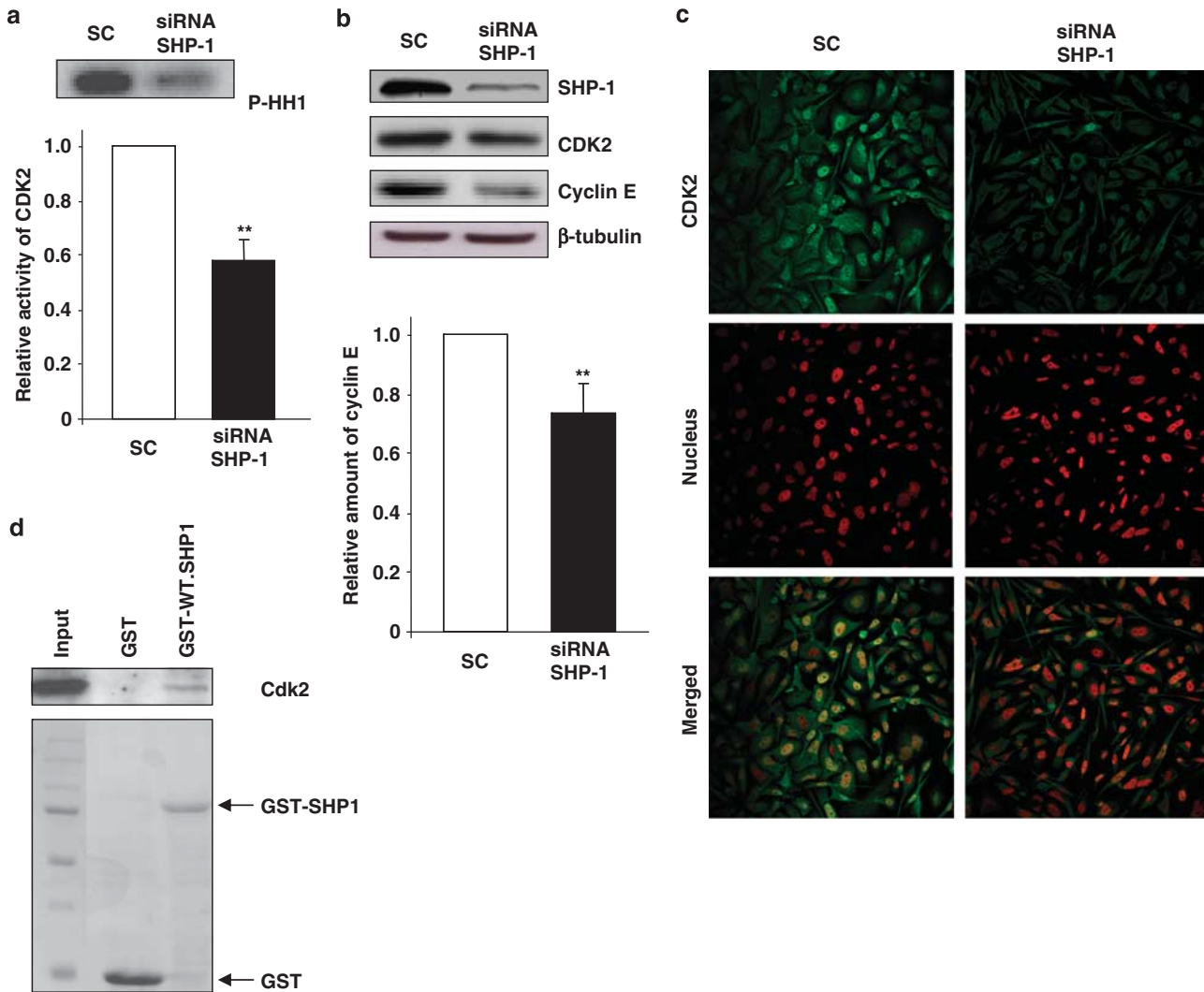
The PI3K-AKT pathway is one of the main regulators of p27 levels. Akt is known to phosphorylate p27 at Thr 187 and Thr 157, contributing to its degradation and promoting its cytoplasmic localization, respectively (Fujita *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2002). Moreover, AKT also downregulates p27 transcription by phosphorylation-dependent inhibition of the Forkhead family of transcription factors (Medema *et al.*, 2000). In this sense, we have shown that inhibition of this pathway by LY-294002 increases the p27 levels in PC-3 cells. Thus, it is plausible to think that SHP-1 regulates the levels and subcellular localization of p27 through PI3K-AKT. Our data support this hypothesis. First, we have shown a functional interaction between SHP-1

and PI3K. Second, SHP-1 depletion increases tyrosine phosphorylation of p110 decreasing AKT activity. Several authors have shown that SHP-1 negatively regulates PI3K-AKT signalling by decreasing tyrosine phosphorylation of the p85 subunit (Yu *et al.*, 1998; Cuevas *et al.*, 2001). However, in this study, we show, for the first time, that SHP-1 may positively regulate PI3K-AKT by modulating tyrosine phosphorylation of the p110 subunit of the PI3K. In this sense, other authors have shown that tyrosine phosphorylation of p110 subunit of inhibits its kinase activity (Nakagawa *et al.*, 2001).

Very recently, it has been shown that tyrosine phosphorylation of p27 by oncogenic tyrosine kinases such as Src, Lyn or BCR-ABL triggers CDK2-mediated Thr 187 phosphorylation and initiates proteolysis of p27 (Chu *et al.*, 2007; Grimmmer *et al.*, 2007). It is tempting to speculate that SHP-1 may directly dephosphorylate p27, controlling its levels; however, we have not found any interaction between these two proteins. As SHP-1 regulate Src activity (Somani *et al.*, 1997), this phosphatase might control tyrosine phosphorylation of p27 through Src.

The increase in p27 levels induced by SHP-1 depletion has also been observed in other prostate cancer cells, such as LNCaP and DU145, suggesting that this event is not specific to PC-3 cells but is rather a general event in human prostate carcinogenesis. Our results, however, suggest that p27 upregulation induced by SHP-1 depletion is not directly responsible for cell-cycle arrest. Several recent reports have shown that p27 has cell-cycle-independent functions, such as the regulation of cell migration that may be oncogenic under certain circumstances (Besson *et al.*, 2004). It is tempting to speculate that SHP-1-mediated modulation of the subcellular localization and stability of p27 may lead to the specific loss or gain of some of its functions.

CDK2 mislocalization may be the key event in the SHP-1 knockdown-mediated growth inhibition of PC-3 cells and may be responsible, at least in part, for the maintenance of the anti-proliferative response after p27 loss. Although p27 knockdown decreases p27 accumulation induced by SHP-1 depletion, which frees CDK2 from inhibition, the cytoplasmic localization of CDK2 would impair its activation and also the transition from the G1 to the S phase. The mechanism responsible for CDK2 translocation from the cytoplasm to the nucleus is still poorly understood. CDK2 does not contain a typical 'nuclear localization signal' sequence, so its translocation to the nucleus may depend on its association with partner or carrier proteins that contain this sequence, such as cyclin E (Moore *et al.*, 1999). Our data strongly suggest, for the first time, that SHP-1 contribute to nuclear translocation of CDK2, as shown by the following two complementary lines of evidence: (i) CDK2 interacts with SHP-1 and (ii) SHP-1 depletion decreases the nuclear localization of CDK2 but does not modify the subcellular localization of cyclin E, implying that the CDK2 nuclear localization is, at least in part, independent of cyclin E and dependent on SHP-1. This phosphatase has a nuclear localization signal at its

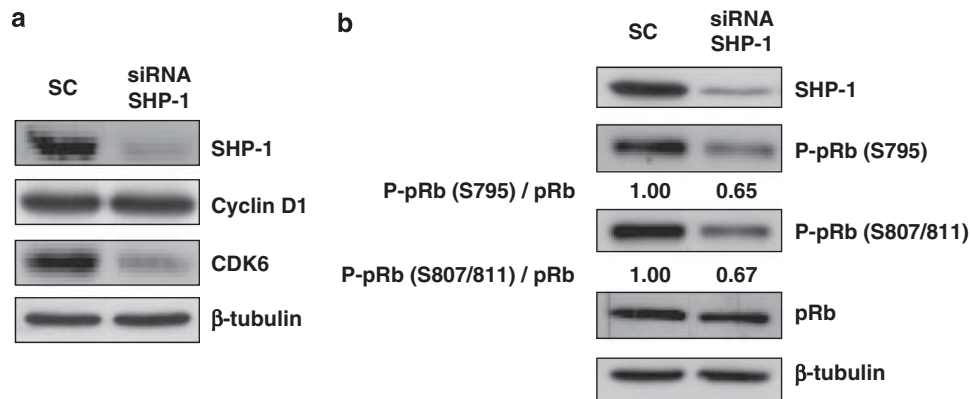


**Figure 6** SHP-1 regulates cyclin E expression and CDK2 activity and location. PC-3 cells were transfected with siRNA against SHP-1 (siRNA SHP-1) or siRNA control (SC) and left 72 h. **(a)** Total cell lysates IP with CDK2 and the activity of CDK2 was determined by [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP incorporation into histone H1 as described in Materials and methods ( $n=3$ ). **(b)** Total cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies ( $n=3$ ). **(c)** PC-3 cells were fixed and immunostained with anti-CDK2 antibody and propidium iodide (nucleus). **(d)** Total cell lysates were mixed with either GST alone or GST-SHP-1 fusion proteins immobilized *O*-glutathione-sepharose beads. Bound proteins were immunoblotted with anti-CDK2. Amido black stained gel is shown (bottom panel). Representative images of three independent experiments are shown. \*\* indicates  $P<0.01$  from comparisons with control cells (*t*-test). Error bars represent the s.e.

C-terminal domain (Craggs and Kellie, 2001) and we and other authors have shown that SHP-1 is localized in both subcellular compartments (Ram and Waxman, 1997; Tenev *et al.*, 2000). Therefore, SHP-1 could substitute for cyclin E and contribute to the shuttling of CDK2 between the cytoplasm and the nucleus. Recently, it has been shown that SHP-1 can associate with CDK2, although in neither case did this interaction directly modify the tyrosine phosphorylation of CDK2 or its kinase activity (Caron *et al.*, 2008; Simoneau *et al.*, 2008). In the light of our results, we suggest that SHP-1 can directly modify CDK2 activity and its substrate specificity (such as its ability to interact with p27) by regulating the cellular localization of this kinase.

The role of SHP-1 in non-haematopoietic cells has been a matter of controversy. Several reports have

described positive effects of SHP-1 on mitogenic signalling (Su *et al.*, 1996; You and Zhao, 1997) whereas other authors, including previous results from our group, claim that SHP-1 mediates the anti-proliferative effect of different peptides (Pages *et al.*, 1999; Zapata *et al.*, 2002). The source of these apparent contradictions may be diverse. First, many earlier studies on the role of SHP-1 in cell signalling have used overexpressing dominant negative mutants, which may have non-specific effects. Second, catalytically inactive SHP-1 retains its ability as a scaffold protein and the presence of this mutant can modify the catalytic functions but not those that depend on the presence of the protein. Both functions are modified in our experimental system using siRNA against SHP-1. Third, SHP-1 is present in the cytoplasm and nucleus of PC-3 cells. Therefore, the



**Figure 7** SHP-1 regulates pRb activity and CDK6 but not cyclin D1 expression. PC-3 cells were transfected with siRNA against SHP-1 (siRNA SHP-1) or siRNA control (SC). (a) After transfection for 72 h, total cell lysates were immunoblotted with the antibodies indicated. (b) The phosphorylation levels of pRb (S795) and pRb (S807/811) were quantified as the ratio of phospho-pRb (S795) to pRb expression, and phospho-pRb (S807/811) to pRb expression, respectively. Representative images of three independent experiments are shown.

shuttling of SHP-1 between the nucleus and the cytoplasm may constitute a new level of regulation of SHP-1 activity and function. We can speculate that, in a similar way to p27 (Besson *et al.*, 2008), SHP-1 may have different, even conflicting, functions depending on its subcellular localization, interactions with other proteins and cellular stimuli. The importance of the function and the regulation of SHP-1 in epithelial cells are just beginning to be appreciated, and much work remains to be carried out before we have a full understanding of the regulation of this protein.

Taken together, our results provide new insights into how SHP-1 could modulate the activity of cell-cycle regulators. We have shown a functional interaction between SHP-1 and PI3K-AKT, which may be responsible for the changes in p27 levels and localization induced by SHP-1 depletion. On the other hand, SHP-1 associates with CDK2 and regulates the shuttling of this kinase between the cytoplasm and nucleus, which is necessary for its activation. Our data strongly indicate that SHP-1 may be required for the correct regulation of events governing cell-cycle progression.

## Materials and methods

### Cell lines and culture conditions

The prostate cancer cell lines PC-3, LNCaP and DU145 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and were cultured in RPMI medium containing antibiotics and 10% foetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in the case of PC-3 and DU145, or 7% in the case of LNCaP.

### Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.1% TritonX-100 in PBS for 10 min and stained with primary antibodies indicated followed by Alexa Fluor 633-conjugated anti-rabbit antibody or Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse antibody (Invitrogen). To perform nuclear staining, cells were incubated with propidium iodide. In some cases,

F-actin was stained using Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin (Invitrogen). The fluorescent images were acquired using a confocal microscopy Leica TCS-SL.

### Transfection of siRNAs

The siRNAs targeting SHP-1 and p27 genes were synthesized by Ambion Inc. (Austin, TX, USA). Transfection were performed using Oligofectamin (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Target sequences of the siRNAs for SHP-1 knockdown were sense 5'-GCA UGA CAC AAC CGA AUA Ctt-3' and anti-sense 5'-GUA UUC GGU UGU GUC AUG Ctc-3' for exon 10 and sense 5'-GGU GAC CCA UAU UCG GAU Ctt-3' and anti-sense 5'-GAU CCG AAU AUG GGU CAC Ctg-3' for exon 3. Previously, we compared the effects produced by these siRNAs separately or simultaneously. In all cases, the levels of SHP-1 decreased with a concurrent increase in p27 (Supplementary Figure. S4). Therefore, all experiments were made using both siRNAs simultaneously. Target sequences of the siRNAs for p27 knockdown were sense 5'-CGU AAA CAG CUC GAA UUA Att-3' and anti-sense 5'-UUA AUU CGA GCU GUU UAC Gtt-3'.

### Cell growth assay and DNA synthesis assay

Cell growth was measured by counting cells in a Neubauer chamber, after their treatment with 0.05% trypsin and 0.02% EDTA and trypan blue exclusion. For DNA synthesis assay, 72 h after siRNA transfection, cells were pulsed with 1 ml [<sup>3</sup>H]-thymidine (0.4 μCi/ml) (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) for 4 h at 37 °C. After washing three times with PBS, cells were incubated with 1 ml ice-cold 5% TCA for 15 min at 4 °C, washed three times with absolute methanol, air dried and the TCA-precipitable fraction was solubilized in 500 μl of 0.1 M NaOH-1% SDS. [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was determined with a scintillation counter (Wallac, Turku, Finland).

### Cell-cycle analysis

Seventy-two hours after siRNA transfection, cells were washed with PBS and collected by trypsinization. After fixing with cold 75% ethanol for 30 min at 4 °C, cells were treated with 30 μg/ml RNase A for 30 min at 37 °C and then stained with 50 μg/ml propidium iodide. Cell DNA content was determined by flow cytometry using a Becton Dickinson FACScalibur cytometer (BD Biosciences, Bedford, MA, USA).

### GST pull-down assay

Whole cell lysate was prepared as described earlier (Martin-Orozco *et al.*, 2007) and were precleared by incubation with glutathione-sepharose (GE Healthcare); 25 µg of GST-SHP-1 wild type (kindly provided by Dr FD. Böhmer) were bounded to 20 µl of glutathione-sepharose and were then incubated with the precleared PC-3 cell lysate for 1 h at 4 °C. The associated proteins were visualized by SDS-PAGE and immunoblotting.

### Immunoprecipitation and western blot analysis

Total cell lysates were obtained and immunoprecipitation and western blot were performed as described earlier (Martin-Orozco *et al.*, 2007). The following antibodies were used anti-phospho-tyrosines, anti-CDK2, anti-CDK6, anti-AKT, anti-cyclin D1, anti-cyclin E, anti-p27, anti-phospho-p27 (S10), anti-p110 and anti-phospho-p27 (T187), obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-phospho-pRb (S795), anti-phospho-pRb (S807/811), anti-pRb and anti-phospho-AKT (S473) (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA); anti-phospho-p27 (T157) (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA); anti-p85 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA); anti-PARP and anti-SHP-1 (BD Biosciences).

### Transient transfection and luciferase reporter assays

Human p27 promoter containing luciferase reporter construct (p27PF) and control empty vector were gifts from Dr T Sakai. Twenty-four hours after siRNA transfection, PC-3 cells were transfected using Lipofectamine Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations, with a mixture including p27PF or control empty vector. To normalize transfection efficiency *Renilla* luciferase reporters were included in the transfection. Luciferase activity was measured 48 h post transfection using Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

### CDK2 activity assay

Seventy-two hours after siRNA transfection, cells were lysed and equal amounts of proteins were IP with anti-CDK2 antibody at 4 °C overnight. After washing twice with lysis buffer and twice with kinase buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, o-vanadate 1 mM, PMSF 0.1 mM), immunoprecipitates were incubated at 37 °C for 30 min in 10 µl of reaction mixture containing ATP 4 µM, (<sup>32</sup>P)-ATP 5 µCi (Amersham), histone-H1 2.5 µg and 6 µl kinase buffer. The reaction mixtures were resolved by SDS-PAGE. CDK2 activity was determined by autoradiography of the dried gels.

## References

- Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M *et al.* (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* **272**: 31515–31524.
- Besson A, Assoian RK, Roberts JM. (2004). Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat Rev Cancer* **4**: 948–955.
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* **14**: 159–169.
- Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ *et al.* (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase

### Subcellular fractionation

Seventy-two hours after siRNA transfection, cells were lysed using NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions, to isolate nuclear and cytoplasmic proteins.

### Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from PC-3 cells 72 h post transfection by using TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations, and cDNA was produced with the SuperScript II reverse transcription kit (Invitrogen). Real-time RT-PCR was performed using the Universal ProbeLibrary (Roche, Basel, Switzerland) and the following primers: p27 primers: sense, 5'-TCAAAGCAAGCTCTTCATA CCC-3', and anti-sense 5'-GCACATAAACTTTGGGGAAG G-3'; and 18S primers: sense, 5'-TCGGGAGTGGGTAATTG C-3', anti-sense 5'-GGAGAGGGAGCCTGAGAAAC-3'. All assays were performed using three separate samples of reverse transcriptase product. The mRNA expression of p27 was normalized using the standard curve method (Larionov *et al.*, 2005).

### Data analysis

Data are presented as mean ± standard error (s.e.) of three independent experiments, which were compared using a paired-sample *t*-test. A Wilcoxon test for paired samples was used to compare real-time PCR data. In both test, differences are considered statistically significant for values at *P* < 0.05.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements

We are very grateful to Dr T Sakai (Department of Molecular-Targeting Cancer Prevention, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan) for providing human p27 promoter containing luciferase reporter construct (p27PF) and control empty vector and also to Dr FD Böhmer (Institute of Molecular Cell Biology, Medical Faculty, Friedrich Schiller University, Jena, Germany) for providing GST-SHP-1 wild type. This work was supported by Consejería de Sanidad de Castilla-La Mancha grant (04077-00); Fundación de Investigación Mutua Madrileña grant; Instituto de Salud Carlos III grant (PI060109); FPI fellowship, Comunidad de Madrid (FJ Rodríguez-Ubreva); Fundación Carolina and FPI fellowship Consejería de Educación de Castilla-La Mancha (AE Cariaga-Martinez).

phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J* **21**: 3390–3401.

- Caron D, Savard PE, Doillon CJ, Olivier M, Shink E, Lussier JG *et al.* (2008). Protein tyrosine phosphatase inhibition induces anti-tumor activity: evidence of Cdk2/p27 kip1 and Cdk2/SHP-1 complex formation in human ovarian cancer cells. *Cancer Lett* **262**: 265–275.
- Craggs G, Kellie S. (2001). A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1. *J Biol Chem* **276**: 23719–23725.
- Cuevas BD, Lu Y, Mao M, Zhang J, LaPushin R, Siminovitch K *et al.* (2001). Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory

- activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **276**: 27455–27461.
- Chen HE, Chang S, Trub T, Neel BG. (1996). Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* **16**: 3685–3697.
- Chu I, Sun J, Arnaout A, Kahn H, Hanna W, Narod S *et al.* (2007). p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell* **128**: 281–294.
- Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T. (2002). Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* **277**: 28706–28713.
- Grimmler M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB *et al.* (2007). Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* **128**: 269–280.
- Harbour JW, Dean DC. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**: 2393–2409.
- Hengst L, Reed SI. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* **271**: 1861–1864.
- Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J* **13**: 4302–4310.
- Inoue T, Kamiyama J, Sakai T. (1999). Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J Biol Chem* **274**: 32309–32317.
- Larionov A, Krause A, Miller W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6**: 62.
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K *et al.* (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* **8**: 1153–1160.
- Malumbres M, Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**: 153–166.
- Martin-Orozco RM, Almaraz-Pro C, Rodríguez-Ubrea FJ, Cortes MA, Ropero S, Colomer R *et al.* (2007). EGF prevents the neuroendocrine differentiation of LNCaP cells induced by serum deprivation: the modulator role of PI3K/Akt. *Neoplasia* **9**: 614–624.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**: 782–787.
- Moore JD, Yang J, Truant R, Kornbluth S. (1999). Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J Cell Biol* **144**: 213–224.
- Nakagawa H, Mutoh T, Kumano T, Kuriyama M. (2001). Tyrosine phosphorylation of the catalytic subunit p110 of phosphatidylinositol-3 kinase induced by HMG-CoA reductase inhibitor inhibits its kinase activity in L6 myoblasts. *FEBS Lett* **508**: 53–56.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V *et al.* (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269**: 682–685.
- Pages P, Benali N, Saint-Laurent N, Esteve JP, Schally AV, Tkaczuk J *et al.* (1999). sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27(Kip1). Evidence for the role of SHP-1. *J Biol Chem* **274**: 15186–15193.
- Pani G, Fischer KD, Mlinaric-Rascan I, Siminovitch KA. (1996). Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTPIC tyrosine phosphatase. *J Exp Med* **184**: 839–852.
- Pani G, Kozlowski M, Cambier JC, Mills GB, Siminovitch KA. (1995). Identification of the tyrosine phosphatase PTPIC as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J Exp Med* **181**: 2077–2084.
- Ram PA, Waxman DJ. (1997). Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* **272**: 17694–17702.
- Sebastian B, Kakizuka A, Hunter T. (1993). Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3521–3524.
- Seo DW, Li H, Qu CK, Oh J, Kim YS, Diaz T *et al.* (2006). Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **281**: 3711–3721.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* **11**: 1464–1478.
- Sherr CJ. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551–555.
- Sherr CJ, Roberts JM. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501–1512.
- Simoneau M, Boulanger J, Coulombe G, Renaud MA, Duchesne C, Rivard N. (2008). Activation of Cdk2 stimulates proteasome-dependent truncation of tyrosine phosphatase SHP-1 in human proliferating intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **283**: 25544–25556.
- Slingerland J, Pagano M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* **183**: 10–17.
- Somani AK, Bignon JS, Mills GB, Siminovitch KA, Branch DR. (1997). Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **272**: 21113–21119.
- Su L, Zhao Z, Bouchard P, Banville D, Fischer EH, Krebs EG *et al.* (1996). Positive effect of overexpressed protein-tyrosine phosphatase PTPIC on mitogen-activated signaling in 293 cells. *J Biol Chem* **271**: 10385–10390.
- Tenev T, Bohmer SA, Kaufmann R, Frese S, Bittorf T, Beckers T *et al.* (2000). Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells. *Eur J Cell Biol* **79**: 261–271.
- Valencia AM, Oliva JL, Bodega G, Chiloeches A, Lopez-Ruiz P, Prieto JC *et al.* (1997). Identification of a protein-tyrosine phosphatase (SHP1) different from that associated with acid phosphatase in rat prostate. *FEBS Lett* **406**: 42–48.
- Yi T, Ihle JN. (1993). Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol Cell Biol* **13**: 3350–3358.
- Yi T, Mui AL, Krystal G, Ihle JN. (1993). Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol Cell Biol* **13**: 7577–7586.
- You M, Zhao Z. (1997). Positive effects of SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 on epidermal growth factor- and interferon-gamma-stimulated activation of STAT transcription factors in HeLa cells. *J Biol Chem* **272**: 23376–23381.
- Yu Z, Su L, Hoglinger O, Jaramillo ML, Banville D, Shen SH. (1998). SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **273**: 3687–3694.
- Zapata PD, Ropero RM, Valencia AM, Buscail L, Lopez JI, Martin-Orozco RM *et al.* (2002). Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 915–926.
- Zarkowska T, Mittnacht S. (1997). Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* **272**: 12738–12746.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)